





Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Mecanisme d'acció del nou fàrmac antitumoral ABTL0812: rol de la pseudoquinasa TRIB3, l'estrès reticular i els esfingolípidis en la mort mediada per autofàgia**

**Pau Muñoz Guardiola**

**TESI DOCTORAL**

**Bellaterra, 2018**











**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Bioquímica i  
Biologia Molecular.**  
**Unitat de Medicina**



**Mecanisme d'acció del nou fàrmac antitumoral ABTL0812: rol de la pseudoquinasa TRIB3, l'estrès reticular i els esfingolípidis en la mort mediada per autofàgia**

**Pau Muñoz Guardiola**

**TESI DOCTORAL**

**Bellaterra, 2018**





Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i  
Biologia Molecular.  
Unitat de Medicina



## **Mecanisme d'acció del nou fàrmac antitumoral ABTL0812: rol de la pseudoquinasa TRIB3, l'estrès reticular i els esfingolípidis en la mort mediada per autofàgia**

Memòria de tesi doctoral presentada per Pau Muñoz Guardiola per optar al grau de Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del doctor José Miquel Lizcano de Vega, el doctor Carles Domènech Garcia i la doctora Íngrid Tatiana Erazo Andrade a la Unitat de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular i a l'Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Director,

Director,

Directora,

Doctorand,

Dr. José Miguel  
Lizcano de Vega

Dr. Carles  
Domènech Garcia

Dra. Íngrid  
Tatiana Erazo  
Andrade

Pau Muñoz  
Guardiola

**Bellaterra, 2018**



**Aquest estudi s'ha realitzat gràcies al finançament del següent projecte:**

- **Ministerio de Economía y Empresa (MINECO), INNPACTO/IPT-2012-0614010000.**

**Aquest estudi també s'ha realitzat gràcies al finançament de la companyia biofarmacèutica Ability  
Pharmaceuticals, SL.**



# AGRAÏMENTS

Ja som aquí, al cap del carrer després de 4 anys intensos, plens de vivències, aprenentatge continu i moltes coneixences. Persones fugaces, persones intermitents i persones que deixen empremta. Sense totes elles no s'entén aquest projecte ja que en aquest món dinàmic i complex que és la ciència es difuminen les personalitats i es reforça el concepte de grup. És una sort haver comptat amb persones que han fet el camí més planer i, sobretot, més viu.

En primer lloc voldria expressar el meu agraïment als meus directors i directora de Tesi, el Dr. José Miguel Lizcano, el Dr. Carles Domènech i la Dra. Tatiana Erazo.

José, gràcies per donar-me l'oportunitat de formar part del grup de recerca kinaso (ja fa 5 anys!), per insistir en la importància de fer el doctorat en un moment en el que tenia poques coses clares i per implicar-t'hi plenament. Han sigut anys d'aprenentatge continu en els que m'has transmès la necessitat d'optimitzar els protocols i comprendre'n cada detall, la importància de perseverar en el que fem i a saber conviure amb la frustració, a entendre que un experiment fallit també és un resultat i a treballar sempre amb una auto-exigència alta. Ha sigut una aventura intensa que, sense cap dubte, ha valgut la pena.

Gràcies, Carles, per la confiança dipositada i per permetre'm formar part d'Ability Pharmaceuticals en un període en el que les oportunitats escassegen. Gràcies per la cerca constant de finançament i fer possible aquest projecte en molt bones condicions. També per estar sempre disposat a escoltar i aconsellar, i per compartir el teu bagatge científic i empresarial per aportar una visió global del món de la recerca biomèdica.

Tati, moltes gràcies per acompanyar-me en els primers passos al laboratori, per ensenyar-me a funcionar amb autonomia i donar-me responsabilitats des del primer moment. El meu camí en la recerca no s'entén sense aquells primers anys al teu costat i és una sort haver forjat una relació d'amistat. Gràcies per la paciència i la teva dedicació a aquesta Tesi, que malgrat la distància sempre t'has mostrat propera per ajudar en tot el que necessités.

Voldria agrair la contribució de la meva comissió de seguiment, els doctors Víctor Yuste, Fernando Picatoste i Enrique Claro. Gràcies per la vostra visió crítica durant aquests anys i la vostra predisposició a col·laborar en el projecte sempre que ha fet falta, així com pel vostre interès de caire humà.

A l'equip del Virtual Lab, Héctor, Sònia i Marc, gràcies pel suport, participació activa en el projecte i la formació d'estabulari. Ens hem anat trobant a diferents punts del camí i, malgrat ser "Virtuals", hem format un equip que fa una gran feina ben real. També donar les gràcies a la resta de la família d'Ability Pharmaceuticals, Maria Jesús, José, Marc, Gemma, Albert i Vanessa, que amb la vostra feina feu que el projecte d'Ability segueixi caminant i creixent cada dia.

Moltes gràcies a la Dra. Josefina Casas i la Dra. Gemma Fabriàs pels estudis d'esfingolipidòmica i per compartir els vostres coneixements i apropar-nos al complex i interessant camp dels esfingolípids. La vostra implicació i col·laboració han sigut cabdals per aquesta Tesi.

Al Dr. Guillermo Velasco, muchas gracias por toda la ayuda proporcionada, por el asesoramiento científico en el estudio del estrés reticular, autofagia y de la pseudoquinasa TRIB3, así como por tu continuo interés en el proyecto.

A la Dra. Marisol Ruiz i a l'Elisabet Miró, gràcies per la contribució en l'estudi de la funció mitocondrial i l'ajuda per optimitzar el protocol de determinació d'ATP cel·lular.



Moltes gràcies a la Dra. Esther Dalfó per la implicació en la generació dels clons estables que expressen la proteïna mKeima-red, l'aportació de reactius per l'anàlisi de la mitofàgia i els experiments preliminars en *C. elegans*. Ha sigut un plaer compartir amb tu aquests dos últims anys de laboratori.

Vull agrair tota l'ajuda rebuda per part de la Susana i l'Elisabet, sempre disposades a resoldre qualsevol incidència al laboratori i pendents del nostre benestar laboral (ho sé, m'he de posar la bata). A la Cristina i en Toni (et trobem a faltar), gràcies per tota la feina que feu cada dia per oferir-nos un servei de cultius eficient i de qualitat, per tota l'ajuda i assessorament en cultius cel·lulars i per les sessions d'humor negre, que tanta falta fan. Donar les gràcies a la Núria, la Saïoa i l'Àlex per l'enorme ajuda i paciència per resoldre qualsevol dubte de microscòpia, sempre amb un somriure i disposats a dedicar el temps que fos necessari. També voldria agrair la feina feta pels membres de la secretaria del Departament de Bioquímica, Santi, Montse i Mònica, que ens alleugeriu la càrrega burocràtica i la gestió diària del laboratori, i donar les gràcies a tots els companys dels diferents grups de recerca del Departament que feu més agradable el dia a dia i que sempre heu estès la mà quan ha fet falta.

Al laboratori kinaso, gràcies de tot cor a tots els companys/es que hem compartit moments d'estrès, bromes i cervesetes (que mai faltin) durant aquest llarg periple. Valeria, Rubén, Flavia, Dídac, Inés, Sergio, Roger i Marta, sabem que aquesta feina nostra és apassionant però que els dies complicats són freqüents; gràcies per contribuir a crear un grup humà que malgrat la seva diversitat sempre ha fet pinya i ha ajudat a aixecar-se a qui ho necessitava. Gràcies Gerard per, conjuntament amb la Tati, dedicar tant de temps a formar-me i per encomanar a qui t'envolta la teva passió per la ciència. També per estar sempre a punt (quan eres al laboratori i també des de Londres) per donar un cop de mà en el que fos.

Voldria tenir un agraïment especial pel Lab Squad, per tanta ajuda i per tot el suport en moments difícils. Nora, gracias por esa pasión tan tuya de sangre caliente del sur que se nos pega a todos y por transmitirnos tanto. Laura, gràcies per l'alegria teatrera, que mai faltin els balls a l'estil La La Land a cultius, i la teva calma que ens tranquil·litza entre tant caràcter apassionat. Eli, gracias por traer tanta energía cada día, por ese interés constante por toda la gente que te rodea y por tanta paciencia en los días complicados. És una gran sort haver compartit tantes vivències amb vosaltres i poder seguir gaudint de la vostra amistat.

Per acabar, donar les gràcies a totes aquelles persones de fora de la universitat que hi sou des de fa tants anys i que sempre esteu a punt per crear instants de desconexió que ho fan tot més fàcil. Gràcies a les generacions 90s i 93s (amb algun despistat/a del 88, 92 i 94) i als companys del Futsal Montgat pels sopars que se'n van de les mans, per tants "exactament, em pots explicar què fas?" "com ho portes?" "et veig cansat, estàs bé?" "ànims que ja queda poc!"... senzillament per ser-hi, una abraçada forta a totes i tots. Joel i Martí, moltes gràcies per la vostra col·laboració experta com a dissenyadors per confeccionar el format final d'aquesta Tesi.

Gràcies, tiet Joan, per accedir a la correcció ortogràfica d'aquesta Tesi amb un "Sí" quan encara no havia acabat de plantejar-te l'atractiva oferta i, com no podia ser d'una altra manera, executar la tasca amb tanta eficàcia.

Itziar, podríem dir que això ha sigut una aventura dins d'una aventura, que hem patit junts i, per sort, també hem sabut gaudir-la. Moltes gràcies per tot el recolzament silenciós, per creure-hi en tot moment, per tanta paciència (molta molta) i per saber crear petits oasis que deixen ben lluny els problemes. Gràcies per compartir tot el viatge i fer el camí més lleuger.

Per últim, moltes gràcies a la família, pare, mare i Lluç. Aquests 4 anys han coincidit amb canvis estructurals que han redefinit les nostres relacions i les han enfortit. Gràcies per escoltar i aconsellar, pels "soparillus" entre setmana sempre que calgui i, en definitiva, per ser-hi sempre des de fa 28 anys.

# ÍNDIX

ÍNDIX DE FIGURES.....	V
LLISTAT D'ABREVIATURES .....	IX
RESUM/SUMMARY .....	XIII
INTRODUCCIÓ.....	1
1. Càncer .....	3
1.1. Biologia del càncer .....	3
1.2. La via PI3K-Akt-mTORC1 i càncer .....	5
1.2.1. PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) .....	6
1.2.2. AKT/PKB .....	9
1.2.3. El complex mTORC1.....	14
1.2.4. Alteracions a la via PI3K-Akt-mTORC1 en càncer.....	15
1.3. Alternatives terapèutiques a les teràpies dirigides al càncer .....	17
1.3.1. Anàlegs de lípids amb activitat antitumoral.....	19
2. Pseudoquinases .....	20
2.1. Pseudoquinases com a diana terapèutica.....	23
2.2. La pseudoquinasa TRIB3 .....	24
2.2.1. Estructura de la proteïna TRIB3 i modificacions post-traduccionals .....	25
2.2.2. Funcions de TRIB3 .....	28
2.2.3. TRIB3 en càncer.....	29
3. Estrès de reticle endoplasmàtic .....	30
3.1. La resposta UPR ( <i>unfolded protein response</i> ) .....	31
3.2. Estrès reticular en càncer.....	35
4. Autofàgia.....	37
4.1. Mecanismes moleculars de l'autofàgia i la seva regulació.....	38
4.2. Regulació de l'autofàgia .....	45
4.3. Mort cel·lular mediada per autofàgia.....	47
4.4. Autofàgia i càncer .....	48
4.5. Autofàgia i esfingolípid .....	50
4.5.1. Metabolisme dels esfingolípid.....	51
4.5.2. Esfingolípid com a reguladors de l'autofàgia .....	54
4.5.3. Esfingolípid i càncer .....	56

OBJECTIUS.....	59
RESULTATS .....	63
CAPÍTOL 1 .....	65
1.1. Antecedents.....	67
1.2. L'ABTL0812 inhibeix l'eix Akt/mTORC1 .....	72
1.3. L'ABTL0812 indueix l'expressió de la pseudoquinasa TRIB3 a través de l'activació dels receptors PPAR $\alpha$ i PPAR $\gamma$ .....	75
1.4. L'ABTL0812 inhibeix l'eix Akt/mTORC1 via TRIB3.....	78
1.5. Monitorització de la fosforilació de la Ser473 d'Akt com a marcador farmacodinàmic de la Fase Clínica 1 .....	81
1.6. TRIB3 com a marcador farmacodinàmic en pacients de la Fase Clínica 2 .....	85
CAPÍTOL 2 .....	89
2.1. L'ABTL0812 indueix estrès reticular a les cèl·lules tumorals .....	93
2.2. L'estrès reticular intervé en l'efecte citotòxic exercit per l'ABT0812 .....	97
2.3. L'ABTL0812 indueix estrès reticular en models <i>in vivo</i> (xenografts) .....	99
2.4. CHOP com a marcador farmacodinàmic .....	101
CAPÍTOL 3 .....	103
3.1. L'ABTL0812 indueix acumulació de dihidroceramides a les cèl·lules tumorals.....	105
3.2. L'acumulació de dihidroceramides indueix autofàgia, estrès reticular i citotoxicitat a les cèl·lules tumorals.....	109
3.3. El tractament amb ABTL0812 resulta en la inhibició de la desaturasa-1, fet que indueix l'acumulació de dihidroceramides, estrès reticular, autofàgia i citotoxicitat.....	111
3.4. La inhibició de la desaturasa-1 col·labora amb la inhibició de mTORC1 en la inducció d'autofàgia i mort cel·lular .....	117
CAPÍTOL 4 .....	121
4.1. ABTL0812 i mitofàgia .....	123
4.2. ABTL0812 i permeabilització de la membrana lisosomal (LMP) .....	130

<b>DISCUSSIÓ</b> .....	<b>139</b>
<b>ABTL0812 i estrès reticular</b> .....	<b>141</b>
<b>TRIB3 i CHOP com a biomarcadors farmacodinàmics</b> .....	<b>145</b>
<b>L'ABTL0812 indueix canvis a l'esfingolipidoma cel·lular</b> .....	<b>145</b>
<b>Sinergisme de l'estrès reticular i la inhibició del complex mTORC1</b> .....	<b>151</b>
<b>Mort cel·lular induïda per l'ABTL0812</b> .....	<b>153</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>159</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	<b>163</b>
<b>1. Cultius cel·lulars</b> .....	<b>165</b>
<b>1.1. Línies cel·lulars utilitzades</b> .....	<b>165</b>
<b>1.2. Cultiu d'astròcits primaris de rata</b> .....	<b>167</b>
<b>1.3. Generació de línia estable MiaPaca2 mKeima-Red</b> .....	<b>167</b>
<b>1.4. Tractament de les cèl·lules</b> .....	<b>168</b>
<b>1.5. Assaig de viabilitat cel·lular (MTT)</b> .....	<b>170</b>
<b>1.6. Tinció amb LisoTracker</b> .....	<b>170</b>
<b>2. Extracció i Anàlisi de proteïna</b> .....	<b>170</b>
<b>2.1. Lisi cel·lular i quantificació de proteïna</b> .....	<b>170</b>
<b>2.2. Extracció proteica de teixit</b> .....	<b>171</b>
<b>2.3. Fraccionament subcel·lular</b> .....	<b>171</b>
<b>2.4. Tècniques electroforètiques per a la detecció de proteïnes</b> .....	<b>172</b>
<b>3. Immunocitoquímica</b> .....	<b>175</b>
<b>4. Microscòpia Electrònica</b> .....	<b>176</b>
<b>5. Citometria de flux</b> .....	<b>176</b>
<b>5.1. Assaig d'avaluació de mort cel·lular per incorporació de iodur de propidi</b> .....	<b>176</b>
<b>5.2. Quantificació de la intensitat de tinció amb LisoTracker</b> .....	<b>176</b>
<b>6. Estudi de la funció mitocondrial</b> .....	<b>177</b>
<b>6.1. Mesura dels nivells d'ATP cel·lular</b> .....	<b>177</b>
<b>6.2. Mesura de l'activitat citrat sintasa (CS)</b> .....	<b>177</b>
<b>7. Estudi del metabolisme dels esfingolípid</b> .....	<b>178</b>
<b>7.1. Anàlisi de lípids</b> .....	<b>178</b>
<b>7.2. Assaig d'activitat enzimàtica de la desaturasa-1 (Des-1)</b> .....	<b>178</b>
<b>8. Transfecció de DNA a cèl·lules de mamífer</b> .....	<b>180</b>

8.1. Transfecció amb PEI (polietilenimina) .....	180
8.2. Transfecció amb lipofectamina .....	180
9. Biologia Molecular .....	181
9.1. Amplificació de DNA .....	181
9.2. Assaig de gen reporter luciferasa per a l'activitat transcripcional dels promotors de TRIB2 i TRIB3 .....	182
9.3. Extracció de RNA total de cèl·lules en cultiu .....	183
10. Generació de tumors xenograft .....	184
10.1. Amplificació i injecció de cèl·lules .....	184
10.2. Tractament i seguiment dels ratolins .....	185
10.3. Necròpsia i obtenció de mostres .....	185
10.4. Immunohistoquímica .....	185
11. Obtenció de mostres de pacients i anàlisi dels marcadors farmacodinàmics TRIB3 i CHOP .....	186
11.1. Presa de mostres .....	187
11.2. Aïllament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica per gradient de ficoll .....	187
11.3. Cultiu i tractament <i>in vitro</i> de PBMCs .....	188
11.4. Extracció de RNA de sang total i PBMCs .....	188
11.5. PCR quantitativa per transcripció reversa (RT-qPCR) .....	189
11.6. Aïllament de plaquetes per a monitoritzar nivells de fosfo-Akt (Ser473) .....	189
12. Anàlisi estadístic .....	190
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>191</b>
<b>ANNEXOS .....</b>	<b>231</b>
<b>Annex 1:</b> Quantificació de ceramides i dihidroceramides en cèl·lules MiaPaca2 tractades 1, 6 i 24 hores amb ABTL0812.....	<b>233</b>
<b>Annex 2:</b> Quantificació d'esfingomielines i dihidroesfingomielines en cèl·lules MiaPaca2 tractades 1, 6 i 24 hores amb ABTL0812 .....	<b>234</b>
<b>Annex 3:</b> Quantificació d'esfingomielines i dihidroesfingomielines en cèl·lules MiaPaca2 tractades 1, 6 i 24 hores amb ABTL0812 .....	<b>235</b>
<b>Annex 4:</b> Articles publicats durant aquest treball .....	<b>236</b>

# ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

## INTRODUCCIÓ

<b>Fig. 1:</b> Els segells d'identitat del càncer.....	4
<b>Fig. 2:</b> Classificació i estructura de les PI3K.....	6
<b>Fig. 3:</b> Xarxa de senyalització d'Akt.....	13
<b>Fig. 4:</b> Inhibidors de la via PI3K-Akt-mTORC1.....	18
<b>Fig. 5:</b> Alineament de TRIB1, TRIB2 i TRIB3.....	26
<b>Fig. 6:</b> Estructura de la pseudoquinasa TRIB3.....	27
<b>Fig. 7:</b> Eixos de senyalització de la resposta UPR.....	32
<b>Fig. 8:</b> El complex d'inducció està format per ULK1/2, ATG13, FIP200 i ATG101.....	39
<b>Fig. 9:</b> El complex de nucleació ATG14 està regulat per Bcl2 i AMBRA1.....	41
<b>Fig. 10:</b> Sistemes de conjugació implicats en el procés d'elongació.....	42
<b>Fig. 11:</b> Esquema general del procés d'autofàgia.....	44
<b>Fig. 12:</b> Fases de la via canònica de mitofàgia regulada per PINK1, parkina i ubiquitina.....	46
<b>Fig. 13:</b> Estructura química dels esfingolípid i dihidroesfingolípid.....	51
<b>Fig. 14:</b> Representació esquemàtica de les vies de síntesi de ceramida.....	52

## RESULTATS

### Capítol 1

<b>Fig. 15:</b> L'ABTL0812 induïx mort a les cèl·lules tumorals.....	68
<b>Fig. 16:</b> L'ABTL0812 redueix el creixement de tumors xenograft humans de pulmó i pàncrees.....	69
<b>Fig. 17:</b> L'ABTL0812 induïx l'activitat transcripcional de PPAR $\alpha$ i PPAR $\gamma$ , que medien en la mort cel·lular induïda per l'ABTL0812.....	70
<b>Fig. 18:</b> L'ABTL0812 induïx mort cel·lular mediada per autofàgia a les cèl·lules tumorals.....	72
<b>Fig. 19:</b> El tractament amb ABTL0812 inhibeix l'eix Akt/mTORC1 en cèl·lules tumorals.....	73
<b>Fig. 20:</b> L'ABTL0812 no inhibeix l'activitat quinasa de les PI3K <i>in vitro</i> .....	74
<b>Fig. 21:</b> L'ABTL0812 induïx l'expressió de TRIB3 però no de TRIB2.....	76
<b>Fig. 22:</b> L'administració oral d'ABTL0812 a ratolins, induïx la sobre-expressió de TRIB3 en tumors xenografts de cèl·lules MiaPaca2 (pàncrees) i A549 (pulmó).....	77
<b>Fig. 23:</b> Els receptors PPAR $\alpha$ / $\gamma$ medien en l'expressió de la pseudoquinasa TRIB3 induïda per ABTL0812.....	78
<b>Fig. 24:</b> La sobre-expressió de TRIB3 inhibeix la fosforilació d'Akt cel·lular.....	78
<b>Fig. 25:</b> El tractament amb ABTL0812 induïx inicialment un augment de la població nuclear de TRIB3, que transloca al citosol on inhibeix Akt.....	79
<b>Fig. 26:</b> TRIB3 media en la inducció d'autofàgia i la citotoxicitat induïda per ABTL0812.....	80
<b>Fig. 27:</b> Model del mecanisme d'acció de l'ABTL0812 (Erazo et al., 2016).....	81
<b>Fig. 28:</b> L'anàlisi per immunoblot de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) permet la monitorització de la fosforilació d'Akt i S6, però no de TRIB3.....	82
<b>Fig. 29:</b> El tractament amb ABTL0812 redueix la fosforilació d'Akt en pacients de la Fase Clínica 1.....	83

<b>Fig. 30:</b> Monitorització de la fosforilació d'Akt plaquetari en pacients de les 5 cohorts de la Fase Clínica 1 .....	84
<b>Fig. 31:</b> L'anàlisi per RT-qPCR permet la monitorització dels nivells del mRNA de TRIB3 en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs).....	85
<b>Fig. 32:</b> El tractament amb ABTL0812 indueix un augment dels nivells del mRNA de TRIB3 en pacients de la Fase Clínica 2 .....	87

## Capítol 2

<b>Fig. 33:</b> La inhibició de mTORC1 pels agonistes dels receptors PPAR $\alpha$ (WY14643) i PPAR $\gamma$ (Rosiglitazona), i el tractament amb inhibidors específics de la via PI3K-Akt-mTORC1, no indueixen autofàgia .....	92
<b>Fig. 34:</b> Esquema de les vies de senyalització que articulen la resposta UPR activada per l'estrès reticular ..	93
<b>Fig. 35:</b> L'ABTL0812 indueix dilatació de reticle endoplasmàtic a les cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549 .....	94
<b>Fig. 36:</b> L'ABTL0812 indueix estrès reticular a les cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549 .....	96
<b>Fig. 37:</b> L'estrès reticular crònic indueix citotoxicitat a les cèl·lules tumorals .....	97
<b>Fig. 38:</b> L'activació d'estrès reticular indueix autofàgia dinàmica.....	98
<b>Fig. 39:</b> La citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 està mediada parcialment per l'activació d'estrès reticular .....	99
<b>Fig. 40:</b> L'ABTL0812 indueix estrès reticular en tumors xenograft de cèl·lules MiaPaca2 (adenocarcinoma pancreàtic) i A549 (adenocarcinoma pulmonar).....	99
<b>Fig. 41:</b> L'ABTL0812 indueix la sobre-expressió del marcador d'estrès reticular CHOP en tumors xenografts de cèl·lules MiaPaca2 (pàncrees) i A549 (pulmó).....	100
<b>Fig. 42:</b> El tractament amb ABTL0812 indueix un increment en els nivells del mRNA de CHOP en pacients de la Fase Clínica 2 .....	101

## Capítol 3

<b>Fig. 43:</b> Representació esquemàtica de les vies de síntesi de ceramida .....	105
<b>Fig. 44:</b> L'ABTL0812 indueix l'acumulació de dihidroceramides però no de ceramides a les cèl·lules tumorals.....	106
<b>Fig. 45:</b> El tractament amb ABTL0812 indueix l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga.....	107
<b>Fig. 46:</b> El tractament amb ABTL0812 indueix l'acumulació de dihidroesfingomielines, però no d'esfingomielines.....	108
<b>Fig. 47:</b> El tractament amb ABTL0812 no indueix canvis en els nivells de glucosil i lactosilceramides .....	109
<b>Fig. 48:</b> L'acumulació de dihidroceramides indueix citotoxicitat en línies tumorals humanes.....	110
<b>Fig. 49:</b> El tractament amb d2c8DhCer activa estrès reticular i autofàgia en cèl·lules tumorals.....	111
<b>Fig. 50:</b> El tractament amb ABTL0812 inhibeix l'activitat enzimàtica de la desaturasa-1 (Des-1) .....	113
<b>Fig. 51:</b> La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) per part de l'inhibidor específic GT11 indueix l'acumulació de dihidroceramides però no de ceramides en cèl·lules tumorals .....	114
<b>Fig. 52:</b> La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) per part de l'inhibidor específic GT11 indueix l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga .....	114
<b>Fig. 53:</b> La inhibició de la desaturasa-1 indueix citotoxicitat en cèl·lules tumorals .....	115
<b>Fig. 54:</b> La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) indueix estrès reticular i mort mediada per autofàgia a les cèl·lules tumorals .....	116
<b>Fig. 55:</b> Les cèl·lules tumorals són més sensibles a la inhibició de la desaturasa-1 .....	117

<b>Fig. 56:</b> La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) col·labora amb la inhibició de mTORC1 en la inducció de citotoxicitat en cèl·lules tumorals humanes .....	118
<b>Fig. 57:</b> La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) col·labora amb la inhibició de mTORC1 en la promoció d'autofàgia .....	119
<b>Fig. 58:</b> Nou esquema del mecanisme d'acció de l'ABTL0812 .....	120

#### Capítol 4

<b>Fig. 59:</b> L'ABTL0812 indueix la co-localització de mitocondris amb lisosomes i amb autofagosomes .....	124
<b>Fig. 60:</b> L'ABTL0812 indueix l'acumulació del marcador d'autofagosomes LC3-II a la fracció mitocondrial .....	125
<b>Fig. 61:</b> L'ABTL0812 indueix la fragmentació de PINK1 i l'acumulació de parkina a la fracció mitocondrial .....	127
<b>Fig. 62:</b> El tractament amb ABTL0812 indueix la ubiquitinació de proteïnes mitocondrials .....	128
<b>Fig. 63:</b> L'ABTL0812 indueix una davallada dels nivells d'ATP i del <i>pool</i> mitocondrial en cèl·lules tumorals.....	129
<b>Fig. 64:</b> Generació de clons estables que expressen la proteïna mKeima-Red.....	130
<b>Fig. 65:</b> L'ABTL0812 indueix necrosi a les cèl·lules tumorals.....	132
<b>Fig. 66:</b> L'ABTL0812 indueix l'acumulació de lisosomes a la cèl·lula tumoral .....	134
<b>Fig. 67:</b> Els lisosomes de les cèl·lules tractades amb ABTL0812 perden més ràpidament la tinció amb lisotracker.....	135
<b>Fig. 68:</b> El tractament amb ABTL0812 indueix la sortida de catepsina B dels lisosomes al citosol en cèl·lules tumorals .....	136

#### DISCUSSIÓ

<b>Fig. 69:</b> L'ABTL0812 indueix la fosforilació d'eIF2 $\alpha$ a les cèl·lules tumorals .....	143
<b>Fig. 70:</b> L'ABTL0812 indueix l'increment del rati dihidroceramides:ceramides a les cèl·lules tumorals .....	147
<b>Fig. 71:</b> La inhibició de l'enzim serina palmitoïltransferasa reverteix parcialment la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 .....	148
<b>Fig. 72:</b> Sub-tipus de mort cel·lular programada.....	154

#### MATERIAL I MÈTODES

<b>Fig. 73:</b> Fraccionament subcel·lular.....	172
<b>Fig. 74:</b> Protocol d'aïllament de PBMCs per gradient de ficoll.....	188

<b>Taula 1:</b> Reactius utilitzats per a la detecció de proteïnes.....	172
<b>Taula 2:</b> Anticossos utilitzats en aquest treball.....	174
<b>Taula 3:</b> Reactius utilitzats per a immunocitoquímica .....	175
<b>Taula 4:</b> Plasmidis utilitzats en aquest projecte.....	180
<b>Taula 5:</b> Punts de presa de mostres sanguínies en pacients de la Fase Clínica 2 .....	187





# LLISTAT D'ABREVIATURES

OHOA	Àcid 2-hidroxiolèic
4E-BP	eIF4E binding protein
ALP	Alkyl-lysophospholipid
AMP	Adenosine monophosphate
AP-1	Activator protein 1
APC	Anaphase-promoting complex
ATCC	American type culture collection
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
ATG	Autophagy related
ATP	Adenosine triphosphate
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist-killer
Bax	Bcl-2-like protein 4
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bif1	Bax-interacting factor-1
Bim	Bcl-2-like <i>protein</i> 11
BiP	Immunoglobulin heavy-chain-binding protein
bZIP	Basic leucine zipper domain
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
C1PP	Ceramide-1-phosphate phosphatase
CAF	Cancer-associated fibroblast
CAMK	$Ca^{2+}$ /calmodulina-dependent proteïna quinasa
CAMKK2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2
CASK	Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase
CAT	Catalytic domain
CB 1 i 2	Cannabinoid receptor 1/2
CDase	Ceramide deacylase
CDC20	Cell-division cycle protein 20
CerS	Ceramide synthase
CERT	Ceramide transport protein
CHOP	C/EBP homologous protein
ciAP1 i 2	Cellular inhibitor protein-1/2
CK	Ceramide kinase
COP1	Constitutive photomorphogenic protein 1
DEPTOR	DEP domain containing mTOR interactin protein
Des-1 i 2	Desaturasa-1/2
DHFR	Dihydrofolate reductase
E2F1	E2F transcription factor 1
ECACC	European collection of authenticated cell cultures
eEF2	Eukaryotic elongation factor 2
EGFR	Epidermal growth factor receptor
eIF2 $\alpha$	Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$
EiF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
ERAD	Endoplasmic Reticulum-associated degradation

ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FIP200	Focal adhesion kinase family kinase-interacting protein 200 kDa
FoxO	Forkhead box O
GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GADD34	Growth arrest and DNA-damaged-inducible protein 34
GAP	GTPase activating proteins
GCN2	General control nonderepressible 2
GMP	Guanosine monophosphate
GPCR	G-protein-coupled-receptor
GRP78/94	Glucose-regulated protein 78/94
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
HDAC6	Histone deacetylase 6
HEK293T	Human embryonic kidney 293T cell line
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor-type2
HER3	Human Epidermal growth factor Receptor-type3
HM	Hydrofobic motif
HRI	Heme-regulated inhibitor
HSC70	Heat shock cognate 70 kDa
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukine
ILK	Integrin-linked protein kinase
IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2
IRE1	Inositol requiring enzyme 1
IRS1	Insulin receptor substrate 1
JNK2	c-Jun N-terminal kinase 2
KDSR	3-ketodihydroesphingosine reductase
LAMP2A	Lysosomal-associated membrane protein 2A
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
LIR	LC3 interacting region
LKB1	Liver kinase B1
MEK	Mitogen-activated <i>protein</i> kinase kinase
mLST8	Mammalian lethal with Sec13 protein 8
MMP	Matrix metalloproteinase
MO25	Mouse protein-25
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1protein
NRF2	Nuclear respiratory factor 2
NSCLC	Non-small cell lung cancer
ORF	Open reading frame

PAS	Phagophore assembly site
PDI	Protein-disulfide isomerase
PKD-1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PERK	PKR-like ER kinase
PEST	Prolina, Glutàmic, Serina, Treonina
PH	Pleckstrin homology
PI3,4P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphate
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-(3)-phosphate
PI4,5P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate
PIKK	PI3K-related kinase
PINK1	PTEN-induced kinase 1
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate
PKA	Protein kinase A
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PKR	Double-stranded RNA-activated protein kinase
PLA2	Phospholipase A2
PLC1	Phospholipase C1
PP1c	Protein phosphatase 1c
PPI	Peptidyl-prolyl cis or trans isomerase
PRAS40	Prolin-rich Akt substrate of 40 kDa
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
RE	Reticle endoplasmàtic
REDD1	Regulated in development and DNA damage
Rictor	Rapamycin insensitive companion of mTOR
ROS	Reactive oxygen species
S1P i S2P	Site 1 protease, site 2 protease
S1PL	Sphingosine-1-phosphate lyase
S1PP	Sphingosine-1-phosphate phosphatase
Ser (S)	Serine
SH2	Scr homology 2
SK	Sphingosine kinase
SLs	Sphingolipids
SMS	Sphingomyelin synthase
SMURF2	SMAD ubiquitination regulatory factor 2
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
SPF	Specific pathogen free
SPT	Serine palmitoyltransferase
SQSTM1	Sequestrome-1
SREBP	Sterol responsive element binding protein
STRAD $\alpha$	STE20-related kinase adaptor alpha
THC	$\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol
Thr (T)	Threonine
TOS	TOR signaling
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2

TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
TVCs	Tubulovesicular clusters
UBA	Ubiquitin-associated domain
Ubl	Ubiquitin like
ULK1/2	Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2
UPR	Unfolded protein response
UTR	Untranslated region
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene protein
VAMP	Vesicle-associated membrane protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VRK3	Vaccinia related kinase 3
WIPI1 i 2	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1/2
XBP1(u)	X-box binding protein-1 (unspliced)
ZFYVE1/DFCP1	Zinc finger FYVE domain containing 1

# RESUM

L'ABTL0812 és un derivat lipídic amb activitat antitumoral llicenciat per la companyia biofarmacèutica Ability Pharmaceuticals. En estudis preliminars es va observar que l'ABTL0812 indueix citotoxicitat en un ampli espectre de cèl·lules tumorals humanes i una inhibició del creixement de tumors xenografts derivats de cèl·lules tumorals humanes, propietats que han motivat el seu desenvolupament pre-clínic. A l'actualitat, l'ABTL0812 es troba en Fase Clínica 2 en pacients amb càncer de pulmó escamós i d'endometri avançat (identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT03366480). El nostre laboratori està implicat en caracteritzar el seu mecanisme d'acció antitumoral, utilitzant com a model les cèl·lules MiaPaca2 (adenocarcinoma pancreàtic) i A549 (adenocarcinoma de pulmó).

Estudis previs realitzats al laboratori mostren que l'ABTL0812 activa els receptors PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ , que medien en la inducció de mort dependent d'autofàgia sense induir l'aparició de trets típicament apoptòtics. En aquesta Tesi Doctoral, mitjançant assajos de gen reporter luciferasa, quantificació de mRNA per RT-qPCR i assaig d'immunoblot, demostrem que l'activació dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$  indueix l'activació transcripcional de la pseudoquinasa TRIB3. Una vegada sobre-expressada, TRIB3 uneix Akt i impedeix la seva activació per les quinases activadores PDK1 i mTORC2. Com a conseqüència d'això, s'inhibeix el complex mTORC1. Tanmateix, s'ha constatat que la inhibició del complex mTORC1 a les cèl·lules tumorals humanes MiaPaca2 i A549 no és suficient per induir una autofàgia robusta anàloga a l'observada per l'ABTL0812. Aquest fet va motivar l'estudi sobre si l'estrès reticular podia estar relacionat amb la sobre-expressió de TRIB3 i la mort cel·lular mediada per autofàgia induïdes per l'ABTL0812, tal com s'ha proposat per altres composts anti-tumorals com el tetrahidrocannabinol. En aquest treball hem observat que l'ABTL0812 indueix dilatació del reticle endoplasmàtic i la sobre-expressió dels marcadors d'estrès reticular BiP, ATF4 i CHOP. En conjunt, aquests resultats demostren la inducció d'estrès reticular per part de l'ABTL0812. El bloqueig farmacològic de l'estrès reticular mostra preliminarment que l'estrès reticular media en la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812. D'interès, s'ha posat a punt la quantificació dels nivells de mRNA plasmàtics dels marcadors d'estrès reticular CHOP i TRIB3, tant en mostres de sang total com a PBMCs purificades, i s'ha constatat que augmenten en els pacients humans en resposta al tractament amb ABTL0812. En l'actualitat, aquests biomarcadors farmacodinàmics s'estan utilitzant a la Fase Clínica 2.

L'anàlisi per espectrometria de masses de l'esfingolipidoma de cèl·lules tumorals ha permès observar que l'ABTL0812 indueix l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga, sense alterar els nivells de ceramides. Aquest esdeveniment s'explica pel fet que la incubació amb ABTL0812 resulta en la inhibició de l'enzim desaturasa-1 (Des-1) a la cèl·lula tumoral. Des-1 és l'últim enzim de la via de síntesi *de novo* de ceramides (catalitza el pas de dihidroceramides a ceramides) i la seva inhibició resulta en l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga, de manera anàloga a la mostrada per l'inhibidor específic de Des-1 GT11. D'interès, el tractament de les cèl·lules tumorals amb la dihidroceramida de cadena curta dideuterada d2c8DhCer (que provoca un augment dels nivells cel·lulars de dihidroceramides) resulta en la inducció d'estrès reticular, autofàgia i citotoxicitat a les cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549, tal com fa l'ABTL0812.

L'estudi preliminar dels processos executors de la mort cel·lular induïda per l'ABTL0812 mostra que aquest compost altera la funció mitocondrial (depleció dràstica d'ATP cel·lular) i activa la via canònica de mitofàgia PINK1/parkina/ubiquitina. A més a més, l'ABTL0812 promou l'alliberació citosòlica de catepsines lisosomals, suggerint la inducció de permeabilització de membrana lisosomal (LMP) que explicaria la mort per necrosi observada a les cèl·lules tumorals.

Finalment, aquesta Tesi proposa que l'ABTL0812 actuaria de forma paral·lela a través de dos eixos. Per un costat, activaria els receptors PPAR $\alpha/\gamma$ , que indueixen la sobre-expressió de TRIB3 i la subseqüent inhibició d'Akt i del complex mTORC1. Per l'altre costat, l'ABTL0812 inhibiria l'enzim Des-1, provocant una acumulació de dihidroceramides de cadena llarga i l'activació d'estrès reticular. Ambdós eixos del mecanisme sinergitzen en l'activació d'autofàgia robusta i mort cel·lular, com demostra el tractament combinat amb l'inhibidor específic de mTORC1 Everolimus i l'inhibidor específic de Des-1 GT11.

# SUMMARY

ABTL0812 is a polyunsaturated fatty acid derivative with antitumoral activity licensed by the biopharmaceutical company Ability Pharmaceuticals. ABTL0812 shows cytotoxicity in a wide panel of human tumor cell lines and induces tumor growth inhibition in human tumor cell-derived xenografts. This has encouraged its pre-clinical and clinical development. ABTL0812 recently started Phase 2 Clinical trials in patients with advanced endometrial cancer and squamous NSCLC, as a first line of treatment in combination with paclitaxel and carboplatin (*ClinicalTrials.gov*: NCT03366480). Our laboratory is involved in the characterization of ABTL0812's antitumoral mechanism of action, using MiaPaca2 (pancreatic adenocarcinoma) and A549 (lung adenocarcinoma) cell lines as models.

Previous studies carried out in our laboratory uncovered that in cells ABTL0812 activates peroxisome proliferator-activated receptors PPAR $\alpha/\gamma$  receptors, inducing autophagy-mediated cancer cell death without activating apoptosis. Here, by using gene reporter luciferase assay, qRT-PCR mRNA quantification and immunoblot analysis, we show that ABTL0812 activates PPAR-mediated transcription of Tribbles 3 (TRIB3) pseudokinase. Over-expressed TRIB3 then binds and inhibits Akt, preventing its activation by PDK1 and mTORC2 upstream kinases, resulting in inhibition of the oncogenic Akt/mTORC1 axis. However, we found that mTORC1 inhibition is not enough to induce robust autophagy in MiaPaca2 and A549 cell lines, as it does ABTL0812. Thus, we investigated whether endoplasmic reticulum (ER) stress could also account for ABTL0812-induced TRIB3 overexpression, as it has been proposed for other antitumoral drugs such as tetrahydrocannabinol. We found ABTL0812 induces endoplasmic reticulum dilatation and over-expression of the endoplasmic reticulum stress markers BiP, ATF4 and CHOP (both mRNA and protein levels), indicating that ABTL0812 induces ER stress in these tumor cells. We also show preliminary pharmacological data suggesting that ER stress has a role in mediating ABTL0812-induced cytotoxicity. Remarkably, we have optimized a protocol for the quantification of TRIB3 and CHOP mRNAs (qRT-PCR) in blood and purified PBMCs from patients enrolled in Clinical Phase 2. We describe increased levels of CHOP and TRIB3 mRNAs in response to ABTL0812 treatment. Furthermore, we have proposed and optimized RT quantification of the ER stress genes TRIB3 and CHOP as reliable pharmacodynamic biomarkers for the ongoing Phase 2 Clinical trials.

Given the role of sphingolipids in initiating the ER stress, we undertook a comprehensive mass-spec analysis of cellular sphingolipids to show that ABTL0812 induces long-chain dihydroceramides accumulation without affecting ceramide levels. In cells, dihydroceramides are converted into ceramides by the desaturase-1 (Des-1) enzyme. Enzymatic analysis demonstrated that ABTL0812 treatment results in inhibition of Des-1 activity *in vitro* and in cellular assays, provoking an accumulation of long-chain dihydroceramides, analogously to that induced by Des-1 specific inhibitor GT11. Interestingly, we show that treatment with the dideuterated short-chain dihydroceramide d2c8DhCer (which induces an increase of cellular dihydroceramides) results in endoplasmic reticulum stress, autophagy and cytotoxicity in MiaPaca2 and A549 cell lines.

Preliminary characterization of ABTL0812-induced cell death shows that this compound alters mitochondrial function (induces a drastic depletion of cellular ATP) and it activates the canonic mitophagy pathway PINK1/parkin/ubiquitin. Furthermore, ABTL0812 induces cytosolic release lysosomal cathepsin B, suggesting a lysosomal membrane permeabilization (LMP) that would explain the necrotic cell death observed in tumor cells.

Finally, this work proposes that ABTL0812 exerts its antitumoral activity acting simultaneously on two axes. On one hand, ABTL0812 activates PPAR $\alpha/\gamma$  receptors, which induce TRIB3 over-expression and the subsequent Akt and mTORC1 inhibition. On the other hand, ABTL0812 inhibits Des-1 enzyme, resulting in accumulation of long-chain dihydroceramides and the subsequent activation of ER stress. Both axes synergize to activate a robust autophagy which ultimately leads to lysosomal membrane permeabilization and necrosis. In agreement with this, we show that the inhibition of mTORC1 (Everolimus) synergizes with Des-1 inhibition (GT11) to promote autophagy and cytotoxicity.

# **INTRODUCCIÓ**





## 1. Càncer

El càncer és una de les primeres causes de morbiditat i mortalitat a nivell mundial. Gairebé una de cada 6 defuncions al món són degudes a aquesta malaltia multifactorial. L'any 2015 (últimes dades recollides per l'OMS) s'atribuïren a aquesta malaltia 8.8 milions de morts, essent els càncers amb major contribució el pulmonar, l'hepàtic, el colorectal, el gàstric i el de mama (OMS).

En l'origen de la majoria de tipologies de càncer hi conflueixen diversos factors. A la predisposició genètica del pacient, definida per alteracions en oncogenes i/o gens supressors de tumors, cal sumar-hi l'ampli ventall de factors ambientals que són determinants en l'etiologia de la malaltia. Els múltiples factors de risc i el clar envelliment de la població expliquen l'alta morbiditat del càncer, fet que suposa un important impacte econòmic en els sistemes de salut pública. Les previsions d'un creixement sostingut en el nombre de casos de la malaltia fan essencials l'aplicació de mesures preventives i la potenciació de projectes de recerca. Per un costat, cal establir sistemes de detecció precoç de la malaltia i de cribratge dels pacients. Per l'altre, és necessari potenciar el coneixement sobre la biologia de la cèl·lula tumoral i la dinàmica del tumor per possibilitar el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques.

### 1.1- Biologia del càncer

El càncer és una malaltia heterogènia que es fomenta en l'acumulació progressiva d'alteracions genòmiques que condueixen a la generació de múltiples poblacions cel·lulars. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per l'adquisició d'una capacitat de proliferació descontrolada. Els mecanismes adquirits per la cèl·lula tumoral que sustenten la seva elevada ràtio proliferativa són: una senyalització pro-proliferativa mantinguda, immortalitat replicativa, evasió dels repressors de creixement, resistència a la mort cel·lular, inducció d'angiogènesi, activació d'invasió i metàstasi, desregulació del metabolisme cel·lular i evasió del sistema immune (Hanahan and Weinberg, 2011). Subjacent a l'adquisició d'aquestes 8 capacitats hi ha la inestabilitat genòmica i la inflamació (Colotta et al., 2009; Negrini et al., 2010) (**Figura 1**). La inestabilitat genòmica aporta la plasticitat genètica necessària per adquirir les capacitats pro-tumorals. La inflamació pot potenciar la generació d'alteracions aportant factors de creixement, modificant la matriu extracel·lular per facilitar l'angiogènesi, invasió i metàstasi, o generant espècies reactives que poden actuar com a mutàgens.

El grau d'heterogeneïtat de la malaltia assoleix un nivell més quan es considera el microambient tumoral. Els tumors no són masses aïllades de cèl·lules altament proliferatives, són teixits dinàmics conformats per cèl·lules tumorals amb patrons d'alteracions genòmiques diferents i, a la vegada, per cèl·lules normals de diferent tipologia, que són reclutades pel tumor i hi estableixen interaccions. Aquest conjunt de cèl·lules

## INTRODUCCIÓ

associades conformen l'estroma tumoral i juguen un paper actiu en la promoció tumorigènica (Joyce and Pollard, 2009; Egeblad et al., 2010).



**Figura 1: Els segells d'identitat del càncer.** Grafisme dels 10 mecanismes descrits subjacents a la promoció tumoral. Figura extreta de Hanahan i Weinberg. *Hallmarks of Cancer: The next generation. Cell* 2011.

Entre els tipus cel·lulars de l'estroma tumoral a destacar es troben els CAF (*Cancer-Associated Fibroblasts*), les cèl·lules endotelials i cèl·lules del sistema immune. La població cel·lular majoritària a l'estroma tumoral són els anomenats CAF. Els CAF s'originen a partir de diferents tipus cel·lulars (adipòcits, fibroblasts residents, cèl·lules endotelials, cèl·lules epitelials, entre d'altres) (Sugimoto et al., 2006; Orimo and Weinberg, 2007). Els CAF aporten suport estructural al tumor (síntesi de fibronectina, col·làgens i glicosaminoglicans) i afavoreixen la invasió i metàstasi a través de l'expressió de factors de creixement, citoquines, quimoquines, i metal·loproteases (MMP-2 i MMP-9) que degraden el col·lagen de tipus IV i la laminina de la matriu extracel·lular (Stuelten et al., 2005; Miles and Sikes, 2014). A més a més, aquest tipus cel·lular també allibera factors com VEGF, FGF i IL-6 que, juntament amb la remodelació de la matriu extracel·lular, afavoreixen l'angiogènesi (Shiga et al. 2015).

L'angiogènesi associada al tumor és un procés bàsic per a la subsistència del teixit tumoral, que presenta una taxa metabòlica elevada (Ahmed and Bicknell, 2009). La secreció de factors com efrines, VEGF o FGF per part de les cèl·lules tumorals i CAF activa les cèl·lules endotelials quiescents dels vasos sanguinis

circumdants (*angiogenic switch*) que formen nous vasos sanguinis que permeten l'entrada d'oxigen i nutrients a l'interior del tumor (Carmeliet and Jain, 2000; Pasquale, 2010).

Per últim, tot i semblar contradictori, algunes cèl·lules del sistema immune juguen un paper proactiu en la promoció tumoral (Balkwill and Mantovani 2012; Egeblad et al 2012). En el context tumoral coexisteixen diversos tipus de cèl·lules inflamatòries que actuen de forma oposada. Per un costat es produeix la infiltració de limfòcits B i T i de cèl·lules NK (*Natural Killer*) per eliminar les cèl·lules tumorals. Per l'altre costat, hi ha infiltració de neutròfils, macròfags i progenitors mieloides que actuen per eliminar cèl·lules mortes i detritus cel·lular, i que són efectors propis del *wound healing*. Aquest últim grup de cèl·lules són una important font de factors de creixement angiogènic, epitelial i estromal, així com d'enzims de remodelació de matriu extracel·lular (DeNardo et al., 2008; Qian and Pollard 2012). El balanç entre aquestes poblacions de cèl·lules immunitàries intratumorals contraposades defineix en gran mesura la progressió del tumor.

Tots els processos cel·lulars estan finament regulats per un conjunt ampli de vies de senyalització que conflueixen en diversos punts conformant una xarxa interconnectada complexa. Aquests circuits de senyalització cel·lular regulen nombrosos processos, com proliferació, motilitat, diferenciació i mort cel·lular. A la cèl·lula tumoral, l'acumulació de mutacions genòmiques porta a la reprogramació de part d'aquests circuits. Malgrat que la interconnexió d'aquestes vies permet que el sistema sigui robust i hi hagi múltiples punts de control, al mateix temps, l'alteració d'un o pocs efectors comporta el desequilibri en la regulació de diverses funcions cel·lulars. Pràcticament tots els tumors humans presenten alteracions en un o diversos components d'aquestes vies de senyalització intracel·lular (Hanahan and Weinberg, 2011). En càncer s'ha descrit que una de les vies de senyalització més freqüentment mutada és la via PI3K-Akt-mTORC1.

### **1.2- Via PI3K-Akt-mTORC1 i càncer**

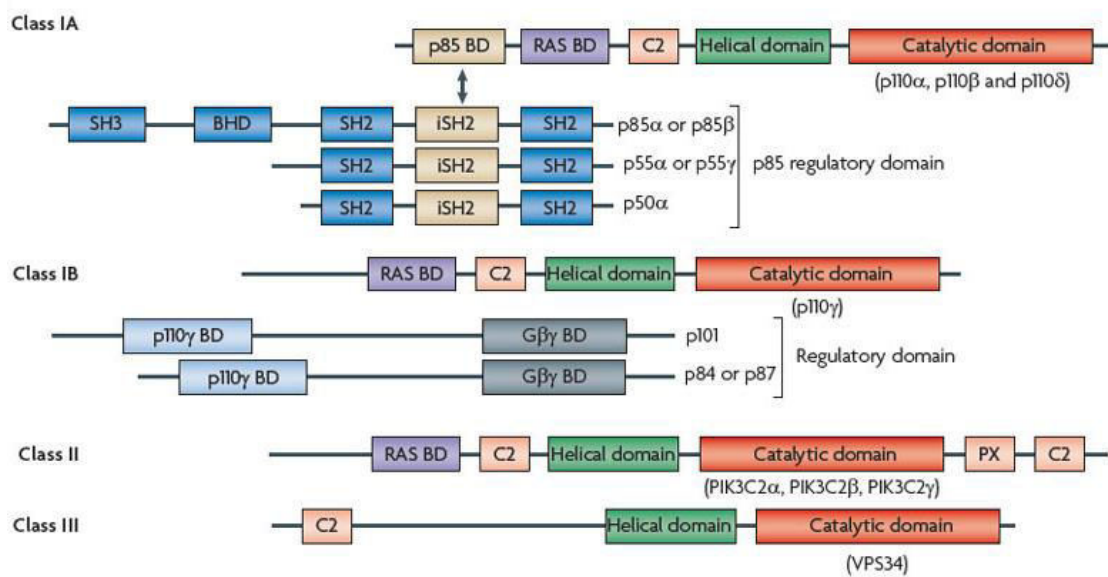
La via PI3K-Akt-mTORC1 és una de les vies de senyalització que més freqüentment està desregulada en cèl·lules tumorals d'origen divers. Aquesta cascada de senyalització controla processos cel·lulars bàsics com ara el creixement, la proliferació, la supervivència, el metabolisme, la motilitat o l'angiogènesi (Guertin and Sabatini, 2007).

# INTRODUCCIÓ

## 1.2.1- PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa)

La família de les PI3K està formada per un conjunt de proteïnes que comparteixen la capacitat de fosforilar el grup hidroxil de la posició 3' de l'anell inositol de les molècules de fosfatidilinositol, fosfatidilinositol-(4)-fosfat, i fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfat (PI4,5P<sub>2</sub>) (Foster et al., 2003; Vanhaesebroeck et al., 2012).

Les espècies de fosfatidilinositols generades coordinen la localització i funció de múltiples efectors proteics. Les proteïnes que conformen la família PI3K presenten 8 subunitats catalítiques diferents que tenen la capacitat de fosforilar lípids inositol. Aquestes 8 subunitats es classifiquen en 3 classes funcionals en base a: estructura proteica del domini, especificitat de substrat lipídic *in vitro*, i proteïnes reguladores associades (**Figura 2**). Aquestes diferències probablement expliquen la diversitat de funcions executades per la família PI3K (Zvelebil et al., 1996; Vanhaesebroeck et al., 1997). Així doncs, les proteïnes PI3K es classifiquen en 3 subfamílies.



**Figura 2: Classificació i estructura de les PI3K.** Representació esquemàtica dels dominis proteics de les tres subfamílies de PI3K: Classe I (IA i IB), Classe II, i Classe III. Figura extreta de Vanhaesebroeck i col·laboradors. *The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. Nature Reviews 2010.*

**PI3Ks de classe I:** totes les PI3K de classe I són capaces de fosforilar *in vitro* el fosfatidilinositol a fosfatidilinositol-(3)-fosfat (PI3P), el fosfatidilinositol-(4)-fosfat a fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfat (PI3,4P<sub>2</sub>), i el PI4,5P<sub>2</sub> a fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfat (PIP<sub>3</sub>). El PIP<sub>2</sub> és el substrat preferencial *in vivo* (Katso et al.,

2001). Les subunitats catalítiques que presenten les proteïnes PI3K de classe I són: p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$ , i p110 $\gamma$ . Totes elles tenen un pes aproximat de 110 kDa. Els enzims de classe I comparteixen la majoria de característiques estructurals i l'especificitat de substrat. En condicions basals les PI3K de classe I es troben al citosol però en resposta a estímuls activadors són reclutades a la membrana plasmàtica a través de la interacció amb receptors o proteïnes adaptadores. Les proteïnes PI3K de classe I es subdivideixen en dos grups en funció del seu mecanisme d'activació i de la seva associació a proteïnes reguladores: classe IA i classe IB (Foster et al., 2003).

La primera de les PI3K identificades va ser una PI3K de classe IA, essent el subgrup més ben caracteritzat fins al moment. Les PI3K de classe IA inclouen les subunitats catalítiques p110 $\alpha$  (codificada pel gen humà PIK3CA), p110 $\beta$  (PIK3CB) i p110 $\delta$  (PIK3CD) (Vanhaesebroeck et al., 2012). Totes elles formen heterodímers per interacció amb proteïnes reguladores adaptadores que exerceixen tres funcions bàsiques sobre les subunitats catalítiques: estabilitzar-les, mantenir-les inhibides al citosol en condicions basals i reclutar-les a membrana plasmàtica per a la seva activació. Les proteïnes reguladores són: p85 $\alpha$  (gen PIK3R1), p85 $\beta$  (gen PIK3R2) i p55 $\gamma$  (gen PIK3R3). El gen PIK3R1, a més de codificar per p85 $\alpha$ , també ho fa per les variants p55 $\alpha$  i p50 $\alpha$ , a través de regions d'inici de transcripció alternatives (Otsu et al., 1991; Skolnik et al., 1991). Aquestes proteïnes adaptadores de la família p85 s'uneixen als 100 aminoàcids N-terminal dels dominis catalítics de classe IA. En resposta a estímuls extracel·lulars les proteïnes p85 són mediadores de l'activació de les PI3K IA per part de receptors de factors de creixement (majoritàriament de la subfamília de receptors amb activitat tirosina quinasa). Les proteïnes reguladores interaccionen amb els receptors a través de dos dominis SH2 (*Src homology 2*) que s'associen a residus tirosina fosforilats en seqüències específiques YXXM (essent X qualsevol aminoàcid) dels receptors tirosina quinasa o de proteïnes que hi estan associades (Escobedo et al., 1991; Foster et al., 2003). L'associació de les proteïnes p85 als receptors allibera la subunitat catalítica de la inhibició a la qual estava sotmesa i la situa en contacte amb els seus substrats lipídics a la membrana plasmàtica. Les proteïnes p85 també contenen regions riques en prolines situades a N-terminal de les regions SH2 que permeten la seva interacció amb altres proteïnes, com ara GTPases petites (Vanhaesebroeck et al., 2005). Algunes variants de p85 $\alpha$  i p85 $\beta$ , a més de presentar dominis SH2, també presenten dominis SH3 (*Src homology 3*) que uneixen regions riques en prolines d'altres proteïnes. p110 $\alpha$  i p110 $\beta$  s'han associat a funcions en supervivència i proliferació cel·lular, mentre que p110 $\delta$  es relaciona amb la senyalització antigènica en cèl·lules immunitàries (Okkenhaug et al., 2002; Kok et al., 2009).

La classe IB està integrada únicament per la subunitat catalítica p110 $\gamma$ . Aquesta subunitat difereix de la resta de la classe I perquè no presenta regions d'unió a proteïnes p85 al seu extrem N-terminal (Vanhaesebroeck et al., 1997). A més a més, les proteïnes adaptadores que s'hi associen, p101 i p87, no

## INTRODUCCIÓ

---

comparteixen els dominis descrits per les proteïnes de la família p85. Mentre que les PI3K de classe IA són activades preferentment per la senyalització mediada per receptors tirosina quinasa, la proteïna de classe IB està associada als sistemes de receptors acoblats a proteïnes G (GPCR, *G-protein-coupled-receptor*). p110 $\gamma$  interacciona amb les subunitats G $\beta\gamma$  que s'alliberen de les proteïnes G heterotrimèriques associades als receptors GPCR (Vanhaesebroeck et al., 2010). p110 $\gamma$  s'ha relacionat amb la modulació inflamatòria (Wymann et al., 2003) i la regulació de la contracció cardíaca (Crackower et al., 2002).

Tant les PI3K de classe IA com les de IB contenen a la seva estructura un domini d'unió a Ras. Les vies de senyalització induïdes per receptors tirosina quinasa o GPCRs poden activar la proteïna Ras, que recluta les proteïnes PI3K a la membrana plasmàtica on seran activades (Vanhaesebroeck et al., 2010). Diverses evidències indiquen que les isoformes p110 $\alpha$  (Gupta et al., 2007), p110 $\delta$  (Rodríguez-Viciano et al., 2004) i p110 $\gamma$  (Suire et al., 2006) són activades per aquesta via en algunes circumstàncies. En el cas de p110 $\beta$ , en canvi, hi ha controvèrsia sobre si Ras pot jugar algun paper en la seva activació (Rodríguez-Viciano et al., 2004; Marqués et al., 2008).

**PI3Ks de classe II:** les PI3K de classe II van ser identificades en base a estudis d'homologia de seqüència amb les PI3K de classe I i III, sense un context funcional (Vanhaesebroeck et al., 2012). Aquest fet explica que sigui el grup menys conegut. En mamífers hi ha tres quinases PI3K de classe II: PI3K-C2 $\alpha$  (gen PIK3C2A), PI3K-C2 $\beta$  (gen PIK3C2B) i PI3K-C2 $\gamma$  (gen PIK3C2G). A diferència de les PI3K de classe I, les de classe II estan constitutivament associades a estructures membranoses (membrana plasmàtica i membranes intracel·lulars) (Prior and Clague, 1999). Factors de creixement i quimoquines estimulen l'activitat quinasa d'aquest tipus de PI3K. Fins al moment, però, el mecanisme subjacent a l'activació de les PI3K de classe II no està ben definit, encara que s'ha descrit que hi intervenen processos de fosforilació de tirosines, proteòlisi i reclutament per part de proteïnes adaptadores (Vanhaesebroeck et al., 2010). De fet, es desconeixen les funcions que desenvolupen aquest tipus de PI3K i els productes que generen *in vivo*. *In vitro* han demostrat fosforilar fosfatidilinositol i fosfatidilinositol-(4)-fosfat, però no el PI4,5P<sub>2</sub> (Djordjevic and Driscoll, 2002). A diferència de les de classe I, no s'han pogut aïllar associades a subunitats reguladores. Tanmateix, disposen d'extrems C- i N-terminals similars a les PI3K de classe I, fet que fa pensar que deuen tenir la mateixa finalitat. L'extrem N-terminal no presenta dominis estructurals ben definits però sí que disposa de motius en hèlix i motius rics en prolines que es creu que estan implicats en interacció proteïna-proteïna. Les PI3K de classe II també disposen d'un domini d'unió a Ras (Kok et al., 2009; Vanhaesebroeck et al., 2010).

**PI3Ks de classe III:** aquest subgrup està format únicament per la proteïna Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*; gen PI3KC3). Aquesta quinasa només pot fosforilar el fosfatidilinositol a fosfatidilinositol-(3)-fosfat. La Vps34 està implicada en la fusió endosomal i en la formació d'autofagosomes, i es localitza de forma

majoritària a les membranes intracel·lulars (Herman and Emr, 1990). No està clar si l'activitat de Vps34 és activada per estímuls externs, tot i que hi ha evidències que és regulada per nutrients (Nobukini et al., 2005) i per GPCRs (Slessareva et al., 2006).

Les proteïnes PI3K de classe I generen de forma predominant  $PIP_3$ , segon missatger que activa múltiples proteïnes. En menor mesura també produeixen el missatger  $PI3,4P_2$ , que també exerceix una funció senyalitzadora. La producció de  $PIP_3$  per part de les PI3K es produeix segons després de l'estimulació amb factors de creixement. L'acumulació de  $PIP_3$  ha de ser transitòria per limitar la seva funció senyalitzadora. Per aquest motiu, hi ha fosfatidilinositol 3- i 5-fosfatases que converteixen el  $PIP_3$  en fosfatidilinositol-(4,5)-bisfosfat i fosfatidilinositol-(3,4)-bisfosfat, respectivament (Vanhaesebroeck et al., 2010).

Una de les fosfatidilinositol 3-fosfatases més rellevant a garantir la transitorietat de la senyalització per  $PIP_3$  és PTEN (*phosphatase and tensin homologue*). PTEN va ser clonada per primera vegada pels laboratoris de Parsons i Steck, i caracteritzada com una  $PIP_3$  fosfatasa per Dixon (Li et al., 1997; Steck et al., 1997; Maehama and Dixon, 1998). PTEN pot actuar tant sobre fosfoinosítids com sobre polipèptids. En la seva estructura conté un motiu catalític característic dels centres actius de proteïnes tirosina fosfatases, HCXXGXXR, que forma el *loop* d'unió (*P loop*). El *P loop* es troba al fons de la cavitat del centre actiu, característica típica de les tirosina fosfatases però també de les fosfatases d'especificitat dual. L'amplada i profunditat de la cavitat d'unió de substrat, així com la càrrega neta positiva que presenta, són importants per l'acomodació dels fosfoinosítids (Stambolic et al., 1998; Song et al., 2012). A l'extrem C-terminal, PTEN presenta una estructura molt similar als dominis C2 que presenten la proteïna quinasa C (PKC), la fosfolipasa C1 (PLC1) o la fosfolipasa A2 (PLA2) (Raftopoulou et al., 2004). A més a més, PTEN presenta un domini N-terminal d'unió a  $PI4,5P_2$  (PBD) i una cua C-terminal que conté una seqüència PEST (Prolina, Glutàmic, Serina, Treonina) (Lee et al., 1999).

L'acumulació de  $PI3,4P_2$  i  $PIP_3$  a la cara interna de la membrana plasmàtica promou el reclutament de proteïnes que poden interaccionar-hi a través dels seus dominis PH (homologia a la pleckstrina). Dues de les proteïnes reclutades són PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) i Akt, esdeveniment clau en la promoció de l'activació de l'eix Akt/mTORC1 (Manning and Toker, 2017).

### 1.2.2- AKT/PKB

L'any 1987 Stephen Staal va identificar i clonar l'oncogèn v-Akt del retrovirus transformant AKT8 (Staal, 1987). Els treballs successius sobre la proteïna van portar a la clonació i caracterització de l'homòleg cel·lular de v-AKT. L'any 1991 Bellacosa i Tschlis van clonar v-Akt i la van anomenar c-Akt (Bellacosa et al., 1991), el grup de Brian Hemmings va identificar-la com a proteïna quinasa (Jones et al., 1991), i Coffey i



## INTRODUCCIÓ

---

Woodgett van identificar per cribratge una proteïna quinasa en cèl·lula de mamífer que van anomenar com a proteïna quinasa B (PKB), per la similitud que presentava amb les proteïnes PKA i PKC (Coffer and Woodgett, 1991).

Existeixen 3 isoformes d'AKT/PKB conservades als genomes de mamífer: AKT1 (PKB $\alpha$ ), AKT2 (PKB $\beta$ ) i AKT3 (PKB $\gamma$ ). La isoforma AKT1 és la predominant en la majoria de teixits. Les 3 isoformes presenten una elevada homologia però cadascuna desenvolupa funcions específiques de teixit i de cèl·lula. Estudis fenotípics en ratolins *knock-out* per cada isoforma d'AKT posen de manifest que AKT1 té un paper primordial en la supervivència cel·lular i està amplificada en càncer (Cho et al., 2001), AKT2 està implicada en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa i s'ha relacionat amb hiperglucèmia i diabetis (Garofalo et al., 2003), i AKT3 participa en el desenvolupament cerebral (Tschopp et al., 2005). Tanmateix, estudis amb ratolins doble *knock-out*, indiquen que les 3 isoformes d'AKT presenten algunes funcions redundants (González and McGraw, 2009). Fins al moment, es desconeixen els mecanismes subjacents a l'activació específica d'isoforma en funció de l'estímul extracel·lular rebut per la cèl·lula (Manning and Toker, 2017).

Les quinases Akt pertanyen a la família de les quinases AGC (relacionades amb AMP/GMP quinases i la PKC). Disposen de dos dominis conservats: un domini N-terminal d'homologia a pleckstrina (domini PH) i un domini quinasa. L'extensió C-terminal conté un motiu hidrofòbic regulador (HM). L'homologia dels dominis quinasa entre isoformes d'Akt és del 90% (Kumar and Madison, 2005).

La plena activació d'Akt1 (referida com a Akt a partir d'ara) s'assoleix per la fosforilació de dos residus clau: la Thr308 del *loop* d'activació i la Ser473 situada al motiu hidrofòbic C-terminal. La fosforilació del residu T308 del domini quinasa és essencial per a l'activació d'Akt, ja que indueix un canvi conformacional promogut per càrrega que permet la unió del substrat i incrementa la ràtio catalítica d'Akt. La fosforilació al residu serina incrementa fins a 10 vegades l'activitat d'Akt (Alessi et al, 1996a). Sense la fosforilació de la treonina, el motiu hidrofòbic d'Akt és més susceptible a l'acció de fosfatases. La fosforilació dels 2 residus permet que l'enzim sigui completament actiu i estable (Alessi et al, 1996b; Carnero, 2010)

L'activació per fosforilació d'Akt és dependent de l'activitat de les PI3K de classe I. Downes i Alessi van demostrar que Akt podia interaccionar amb els PIP<sub>3</sub> generats per les PI3K a la membrana plasmàtica, a través del seu domini PH (James et al., 1996). Akt també pot unir-se al PI3,4P<sub>2</sub>, associació que ha demostrat induir l'activació parcial d'Akt *in vitro* (Klippel et al., 1997; Franke et al., 1997). L'activació de les PI3K en resposta a estímuls extracel·lulars comporta l'acumulació de PIP<sub>3</sub> i el reclutament d'Akt que interacciona amb el PIP<sub>3</sub> a través del seu domini PH, i de la quinasa PDK1 que també disposa d'un domini PH. PDK1 va ser identificada per la seva capacitat de fosforilar el residu T308 d'Akt (Alessi et al., 1997; Stokoe et al. 1997). La translocació d'Akt i PDK1 a la membrana plasmàtica possibilita la fosforilació d'Akt per part de PDK1. En condicions basals el domini PH d'Akt exerceix una funció inhibidora sobre el domini quinasa. Quan

el domini PH interacciona amb PIP<sub>3</sub>, s'indueix un canvi conformacional que exposa el domini quinasa d'Akt i permet que el residu T308 sigui fosforilat per PDK1 (Lizcano and Alessu, 2002; Calleja et al., 2007; Bayascas, 2008).

La màxima activació d'Akt requereix la fosforilació del residu S473 del motiu hidrofòbic. Aquesta reacció és catalitzada pel complex mTORC2 (*mTOR complex 2*). mTORC2 està format per la proteïna serina/treonina quinasa mTOR associada a les proteïnes DEPTOR, mLST8, Rictor, mSin1 i Protor1/2 (Sarbasov et al., 2004; Saxton and Sabatini, 2017). Els mecanismes que regulen l'activitat de mTORC2 encara han de ser descrits, si bé s'ha descrit que l'activitat de mTORC2 també depèn de l'acció de les PI3K, donat que el domini PH del component SIN1 del complex pot interaccionar amb PIP<sub>3</sub> (Liu et al., 2015). Aquesta unió induiria per un costat un canvi conformacional que revertiria l'autoinhibició de l'activitat quinasa de mTOR i, per l'altre, permetria la co-localització d'Akt i mTORC2 a la membrana plasmàtica (Ebner et al., 2017a). Altres autors, però, indiquen que l'activitat PI3K no és indispensable per a l'activació d'Akt per mTORC2. En el seu model, Akt es re-localitzaria en endomembranes cel·lulars específiques que acumulen PIP<sub>3</sub>, i seria en aquestes regions on mTORC2 la fosforilaria (Jethwa et al., 2015). mTORC2 també fosforila de forma constitutiva el residu T450, anomenat motiu *turn*. Aquesta fosforilació es produeix co-traduccionament i és necessària per al correcte plegament del polipèptid naixent d'Akt (Ikenoue et al., 2008).

Un cop activada, Akt s'allibera de la membrana plasmàtica i transloca al citosol, on fosforila nombrosos substrats, degut al fet que un cop activada Akt no depèn de la unió de PIP<sub>3</sub> per mantenir la seva conformació activa (Kunkel et al., 2005). Tanmateix, estudis recents defensen que la interacció amb els PIP<sub>3</sub> modula al·lostèricament l'activitat d'Akt i que la dissociació seria un esdeveniment limitant que conduiria a la desfosforilació i inactivació d'Akt. Aquesta hipòtesi limitaria l'activitat d'Akt a localitzacions endomembranoses concretes i atorgaria un rol diferencial als *pools* de PI3,4P<sub>2</sub> i PIP<sub>3</sub> generats en diferents regions de la cèl·lula (Braccini et al., 2005; Ebner et al., 2017b). Malgrat tot, aquesta hipòtesi encara està pendent de ser contrastada.

Akt fosforila una gran varietat de proteïnes, com ara quinases, factors de transcripció, enzims metabòlics, E3 ubiquitina lligases i reguladors de cicle cel·lular, entre d'altres (Manning and Toker, 2017). El conjunt d'estudis realitzats sobre la senyalització mediada per Akt suggereixen que aquesta quinasa controla una xarxa de senyalització integrada per diverses vies que treballen en paral·lel. Akt regula proteïnes node que, a la vegada, controlen múltiples efectors proteics. Aquesta fosforilació és inhibidora de la funció de la proteïna diana en la majoria dels casos. Akt fosforila residus serina i treonina en el motiu consens de reconeixement RXXR-S/T- $\phi$  (on X és qualsevol aminoàcid i  $\phi$  indica preferència per residus hidrofòbics grans) (Alessi et al., 1996a). Aquest motiu consens es troba en centenars de proteïnes, i per si sol no defineix una proteïna com a substrat d'Akt. L'accessibilitat al motiu de reconeixement dels substrats, interaccions

## INTRODUCCIÓ

---

secundàries amb Akt o la compartimentació cel·lular són factors a tenir en compte (Manning and Cantley, 2007).

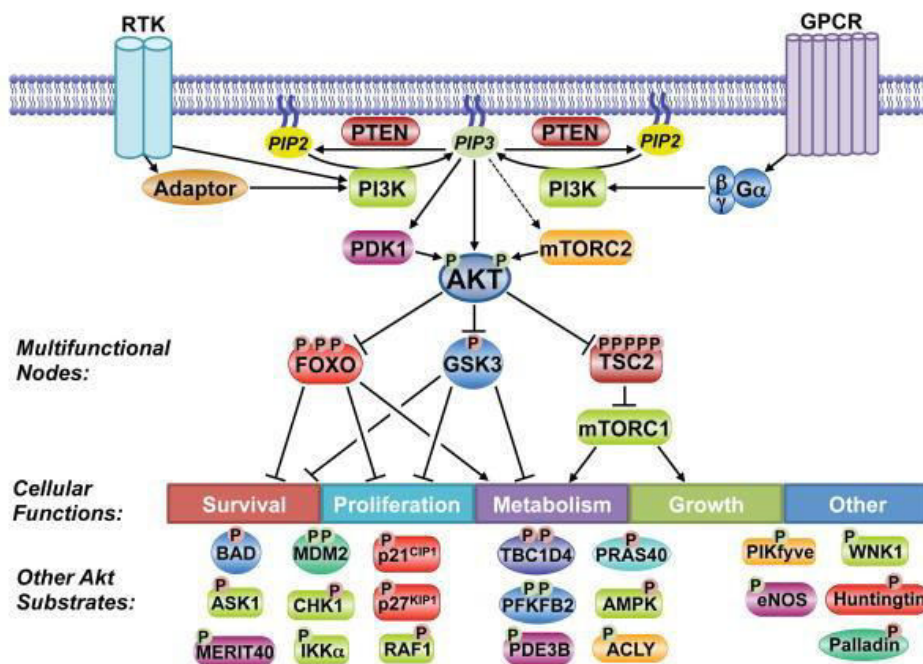
Les tres dianes d'Akt més ben establertes i que representen tres nexes bàsics de regulació de la xarxa de senyalització d'Akt són la serina/treonina quinasa GSK3 (glucogen sintasa quinasa 3), els factors de transcripció FoxO (*forkhead box O*) i el complex TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) (**Figura 3**). GSK3 va ser el primer substrat d'Akt reportat, i presenta dues isoformes: GSK3 $\alpha$  i GSK3 $\beta$  (Cross et al., 1995). GSK3 té un ampli ventall de substrats que majoritàriament inactiva per fosforilació, i que estan implicats en la promoció de supervivència, proliferació i metabolisme cel·lular. Akt inhibeix GSK3 mitjançant la fosforilació de la Ser21 (GSK3 $\beta$ ) o la Ser9 (GSK3 $\alpha$ ), i en conseqüència activa les funcions que aquesta bloquejava (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011). Els factors de transcripció FoxO (1, 3, 4 i 6) controlen diversos gens implicats en la regulació per insulina i en la senyalització per IGF1. Akt fosforila els factors FoxO als residus Thr32, Ser253 i Ser315, indueix la seva translocació a fora del nucli i inactiva els programes transcripcionals que controlen (Brunet et al., 1999). D'aquesta manera la senyalització per Akt suprimeix l'expressió de dianes de FoxO implicades en la inducció d'apoptosi, arrest del cicle cel·lular, catabolisme i inhibició del creixement cel·lular (van der Vos and Coffey, 2011).

El complex TSC2 és un component regulador essencial de l'eix Akt/mTORC1. TSC2 s'associa a les proteïnes TSC1 i TBC1D7 per formar el complex TSC. A través d'un domini C-terminal TSC2 actua com a GAP específic de la GTPasa Rheb (una *Ras-related GTPase*) i promou la conversió del Rheb-GTP a Rheb-GDP (Stocker et al., 2003; Saucedo et al., 2003). En la forma Rheb-GTP, Rheb actua com a activador bàsic de mTORC1. D'aquesta manera, l'activitat del complex TSC manté inhibit el complex mTORC1. Akt fosforila TSC2 als residus Ser939, Ser 1086, Ser1088, Thr1422 i Thr1462 i desestabilitza el complex TSC, que perd la funció Rheb-GAP i permet l'activació de mTORC1 (Manning et al., 2002a; Inoki et al., 2002). En condicions de privació de nutrients, el complex TSC pot ser regulat per la proteïna quinasa AMPK que actua com a sensor de l'estat energètic intracel·lular. La reducció de la ràtio ATP/AMP a la cèl·lula eucariota activa AMPK, que estabilitza TSC2 mitjançant la fosforilació dels residus Ser1345 i Thr1227 i afavoreix la formació del complex TSC que inhibirà mTORC1 (Inoki et al., 2003; Corradetti et al., 2004). Quan les condicions nutricionals són favorables, Akt fosforila AMPK al residu Ser487, bloqueja la seva activació per part de LKB1 i evita així que estabilitzi el complex TSC (Hawley et al., 2014).

Akt també regula el complex mTORC1 a través de la fosforilació de la proteïna PRAS40 (*Prolin-rich Akt substrate of 40 kDa*). PRAS40 és un component no essencial del complex mTORC1, del qual es desconeix la funció que desenvolupa. PRAS40 exerceix un efecte inhibitori sobre mTORC1. Akt fosforila el residu Thr246 de PRAS40, i atenua la inhibició de PRAS40 sobre mTORC1 (Wang et al., 2007; Kovacina et al., 2003). Malgrat tot, encara no està clar si el paper que desenvolupa PRAS40 en la regulació de l'activitat de

mTORC1 és determinant. Alguns autors han descrit que la pèrdua de PRAS40 comporta una activació de mTORC1 independent de la senyalització per factors de creixement (Vander Haar et al., 2007). Altres autors, en canvi, mostren que la pèrdua del complex TSC comporta l'activació de mTORC1 de forma Akt-independent, malgrat que PRAS40 segueixi en estat desfosforilat (Sancak et al., 2007). Altrament, experiments en què s'han mutat els residus de TSC2 fosforilats per Akt a alanina mostren que la insulina no promou l'activació de mTORC1, malgrat que s'indueix la fosforilació de PRAS40. En conjunt, les evidències indiquen que el sistema TSC-Rheb és el predominant en la regulació de l'activitat de mTORC1 (Menon et al., 2014).

A través de la regulació del sistema TSC-Rheb-mTORC1, Akt integra els senyals generats per factors de creixement per induir canvis metabòlics orientats a la promoció del creixement cel·lular. mTORC1 promou processos anabòlics (síntesi de proteïnes, lípids i nucleòtids) i n'inhibeix de catabòlics, com l'autofàgia.



**Figura 3: Xarxa de senyalització d'Akt.** L'activació d'Akt per fosforilació dels seus residus Ser473 (mTORC2) i Thr308 (PDK1) resulta en la inhibició dels factors de transcripció FoxO, inhibició de GSK3, i activació del complex mTORC1. Com a conseqüència, s'activen funcions cel·lulars orientades a supervivència, creixement, i proliferació cel·lular. Figura extreta de Manning i Toker. *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. Cell 2017.*

## INTRODUCCIÓ

---

### 1.2.3- El complex mTORC1

L'any 1994 es va caracteritzar el mecanisme d'acció de la rapamicina, compost natural que havia demostrat tenir propietats antifúngiques, immunosupressores, i antitumorals. Els estudis bioquímics van identificar la proteïna quinasa mTOR (*mammalian target of rapamycin*) com a diana directa de la rapamicina (Brown et al., 1994; Sabatini et al., 1994). Estudis successius sobre la proteïna han establert que mTOR és efectora d'una complexa xarxa de senyalització cel·lular que coordina el creixement i que és fonamental per a la fisiologia de la cèl·lula.

mTOR és una serina/treonina quinasa que pertany a la família de les PIKK (*PI3K-related kinase*). Les PIKK mostren homologia estructural amb les subunitats catalítiques de les PI3Ks, fet que ha portat que alguns autors s'hi refereixin com a PI3Ks de classe IV (Marone et al., 2009). mTOR és la subunitat catalítica de dos complexos proteics diferents: mTORC1 (*mTOR complex 1*) i mTORC2 (*mTOR complex 2*).

mTORC1 està format per tres components centrals: mTOR, Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) i mLST8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*). A més a més, el complex també conté dues subunitats inhibidores: PRAS40 i DEPTOR (*DEP domain containing mTOR interactin protein*) (Saxton and Sabatini, 2017). Raptor és una proteïna reguladora associada a mTOR que facilita el reclutament de substrats interaccionant amb motius TOS (TOR signaling) que presenten diversos substrats canònics de mTORC1 (Nojima et al., 2003). Per altra banda, mLST8 s'associa amb el domini catalític de mTORC1 i estabilitza el *loop* d'activació (Yang et al., 2013). Curiosament, el complex mTORC2 també conté mTOR i mLST8, però enlloc de Raptor conté Rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*) (Sarbasov et al., 2004). Rictor desenvolupa funcions anàlogues a les de Raptor. mTORC2 també conté DEPTOR i les subunitats reguladores mSin1 i Protor1/2 (Pearce et al., 2007; Peterson et al., 2009).

mTORC1 té un paper central en la coordinació de l'anabolisme i el catabolisme. Factors que afavoreixen el creixement i la proliferació cel·lular activen mTORC1, que promou la síntesi de proteïnes, lípids i nucleòtids, i inhibeix vies catabòliques com l'autofàgia (Saxton and Sabatini, 2017). Per regular la síntesi proteica, mTORC1 fosforila dos efectors clau: la quinasa S6K (*p70S6*) i la proteïna 4E-BP (*eIF4E binding protein*). mTORC1 fosforila directament el residu Thr389 del motiu hidrofòbic de S6K, que recluta i possibilita la subseqüent fosforilació per PDK1 del residu Thr229 en el T-loop del domini quinasa de S6K (Biondi et al., 2001; Collins et al., 2003). S6K fosforila i activa diversos substrats implicats en la iniciació de traducció de mRNA, tals com eEF2 i eIF4B (Holz et al., 2005). Per altra banda, 4E-BP actua inhibint la traducció unint i segrestant el factor eIF4E i evitant la seva associació al complex eIF4F (complex d'unió a la regió cap-5'). mTORC1 fosforila 4E-BP als residus Thr37 i Thr46, i n'indueix la dissociació d'eIF4E, permetent la formació del complex eIF4F i la traducció (Gingras et al., 1999a; Gingras et al., 1999b). mTORC1 promou la síntesi de lípids *de novo* per possibilitar la generació de noves membranes o per expandir les existents, via activació

de SREBP (*sterol responsive element binding protein*) (Porstmann et al., 2008; Peterson et al., 2011). Per activar la síntesi de nucleòtids, mTORC1 incrementa l'expressió de la metilentetrahidrofolat deshidrogenasa, un component clau del cicle mitocondrial del tetrahidrofolat, implicat en la síntesi de purines. A més a més, S6K fosforila i activa la carbamoil-fosfat sintetasa, proteïna bàsica de la via de síntesi *de novo* de pirimidines (Robitaille et al., 2013; Ben-Sahra et al., 2016).

Per últim, mTORC1 és un regulador màster de l'autofàgia. Quan el complex mTORC1 és actiu inhibeix aquesta via catabòlica. En condicions de disponibilitat de nutrients, mTORC1 fosforila la proteïna quinasa ULK (*Unc-51 like autophagy activating kinase*), proteïna crítica per al procés de formació de l'autofagosoma. La fosforilació per part de mTORC1 impedeix l'associació d'ULK al complex proteic que coordina la generació de la vesícula autofagosomal (Saxton and Sabatini, 2017). La regulació d'autofàgia per mTORC1 s'explica en detall a la secció d'Autofàgia d'aquesta Introducció.

El mateix mTORC1 regula l'activitat de mTORC2. mTORC1 participa d'un sistema de *feedback* negatiu que prevé la senyalització activada per insulina/PI3K (Janku et al., 2018). mTORC1 fosforila i activa la proteïna Grb10, un regulador negatiu de la senyalització del receptor d'insulina/IGF-1, situat *upstream* d'Akt i mTORC2. La proteïna S6K també suprimeix l'activació de mTORC2 via fosforilació del receptor IRS1 (*insulin receptor substrate 1*), que en promou la degradació (Harrington et al., 2004; Hsu et al., 2011). Aquest *loop* de *feedback* negatiu entre mTORC1 i PI3K i mTORC2 té implicacions rellevants a l'hora de modular farmacològicament mTOR en càncer.

### 1.2.4- Alteracions a la via PI3K-Akt-mTORC1 en càncer

S'han descrit alteracions en proteïnes de la via PI3K-Akt-mTORC1 amb alta freqüència en nombrosos tipus de càncers humans. La via pot ser activada per sobreexpressió de reguladors apicals de la via o per pèrdua de funció dels seus reguladors negatius. La sobreactivació de la via PI3K-Akt-mTORC1 té com a conseqüència la des-regulació del creixement i proliferació cel·lulars, promoció de la supervivència i resistència a la mort (Costa et al., 2018).

La sobre-expressió de receptors tirosina quinasa de membrana com l'EGFR, FGFR o HER2, en determinats tipus de càncer comporta l'augment d'activitat de la via PI3K-Akt-mTORC1 (Jaiswal et al., 2009). En altres casos, s'han descrit mutacions que afecten les proteïnes PI3K de classe I (Zhao and Vogt, 2008). Diversos estudis han reportat amplificacions gèniques de PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD i PIK3CG en càncer (Vanhaesebroeck et al., 2010). Les mutacions somàtiques, en canvi, només s'han descrit al gen PIK3CA, codificant per la subunitat catalítica p110 $\alpha$  (Samuels et al., 2004). Diverses d'aquestes mutacions indueixen un guany de funció a p110 $\alpha$  a través de mecanismes com ara l'alteració de la posició i motilitat del *loop*

## INTRODUCCIÓ

---

d'activació, o l'increment de la càrrega neta positiva de la proteïna, que en promou un major reclutament a membranes cel·lulars (Kok et al., 2009; Zhao and Vogt, 2008). En alguns tipus de càncer també s'han identificat mutacions somàtiques al gen PIK3R1, codificant per la subunitat reguladora p85 $\alpha$ . La majoria de mutacions a p85 $\alpha$  s'han trobat als dominis SH2 o entre dominis SH2. Les evidències obtingudes indiquen que les mutacions indueixen pèrdua de la capacitat inhibidora de p85 $\alpha$  sobre la subunitat catalítica i comporten la seva activació constitutiva (Jaiswal et al., 2009; Martin-Berengeno and Vanhaesebroeck, 2009).

PTEN juga un paper supressor de tumors actuant al citoplasma com a fosfatasa reguladora de la senyalització activada per les PI3K, i al nucli, promovent estabilitat cromosòmica i reparació del DNA per mecanismes independents de la seva activitat fosfatasa (Dillon and Miller, 2014). En un ampli espectre de càncers humans s'han descrit mutacions, delecions o metilacions silenciadores al promotor, que provoquen la pèrdua de l'activitat de PTEN (Vivanco et al., 2002). En la majoria de casos, la pèrdua de l'activitat fosfatasa de PTEN és la que està lligada a la promoció tumoral (Chow and Baker, 2006).

Malgrat que en la majoria de casos la sobreactivació d'Akt és conseqüència de mutacions a les proteïnes activadores, també se n'han identificat amplifícacions gèniques i mutacions activadores específiques. La primera mutació somàtica activadora al gen d'Akt identificada va ser la mutació E17K al domini PH d'Akt en pacients de càncer de mama (Hyman et al., 2017). El canvi del residu glutàmic per lisina a la cavitat d'unió de fosfoinosítid del domini PH provoca un canvi de càrrega que permet la localització constitutiva d'Akt a la membrana, resultant en una activitat quinasa constitutiva (Altomare and Testa, 2005). Aquesta mutació, però, és infreqüent i necessita la coexistència de mutacions en d'altres proteïnes reguladores de la via (Carpten et al., 2007). S'han descrit mutacions de pèrdua de funció a les proteïnes substrat d'Akt TSC1 i TSC2 que impedeixen la formació del complex estable TSC (Kwiatkowski et al., 2016). Així mateix, s'han reportat mutacions activadores a la quinasa mTOR (Hardt et al., 2011) i en d'altres components, així com l'ampliació de Rictor (complex mTORC2) en pacients amb adenocarcinoma de pulmó (Cheng et al., 2015).

La via PI3K-Akt-mTORC1 està interconnectada amb altres vies de senyalització centrals a la cèl·lula, com la d'AMPK i la via de RAS-ERK. AMPK i Akt activen programes de senyalització antagònics i actuen com a sensors de les condicions nutricionals i energètiques de la cèl·lula. L'activació d'una d'elles comporta la inhibició de l'altra (Hawley et al., 2014; Horman et al., 2006). El cas de RAS-ERK i Akt, en canvi, contempla dues vies amb un clar propòsit pro-proliferatiu, que treballen en paral·lel i poden confluir en l'activació de mTORC1. Al mateix temps, però, les vies d'Akt i RAS-ERK s'autoregulen a través de circuits de *feedback* negatiu entre efectors d'ambdues vies. La inhibició d'aquests punts de regulació possibilita la sobreactivació de les vies (Mendoza et al., 2011; Lu et al., 2011). El coneixement precís d'aquestes alteracions i el fet d'estar esteses en múltiples tipologies tumorals ha portat al disseny d'un extens llistat de teràpies

dirigides a components clau de la via. El desenvolupament clínic de molts d'aquests fàrmacs, però, no ha assolit les etapes més avançades de la fase clínic, i aquells que han arribat a la Fase Clínic 3 han obtingut resultats discrets d'eficàcia, i molt pocs han sigut aprovats per a l'ús clínic. Els *loops* negatius de regulació dins de la via PI3K-Akt-mTORC1, així com les múltiples interconnexions reguladores que estableix amb altres vies de senyalització, expliquen aquests resultats poc exitosos (**Caixa 1**).

### **1.3- Alternatives terapèutiques a les teràpies dirigides al càncer**

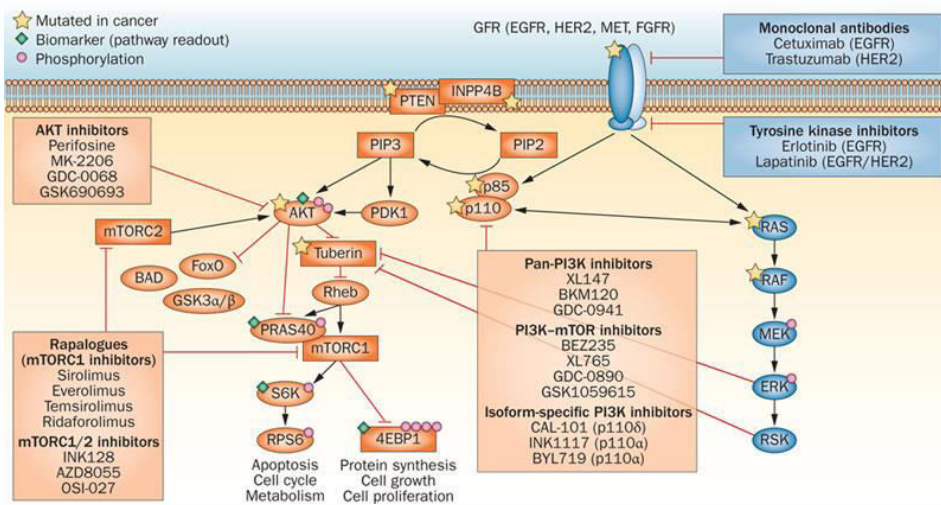
La recerca duta a terme les últimes dècades ha permès desxifrar múltiples mecanismes implicats en la patogènesi del càncer. La descripció de les alteracions concretes en les vies de senyalització implicades en la proliferació i supervivència de la cèl·lula tumoral, com ara la via PI3K-Akt-mTORC1, ha portat al disseny de teràpies dirigides a dianes moleculars específiques. Aquesta estratègia dirigida té la virtut de presentar menys efectes inespecífics i, per tant, una menor toxicitat per als teixits sans, en comparació amb la quimioteràpia. Malgrat això, les teràpies dirigides presenten efectes terapèutics transitoris i són seguits per un relapse de la malaltia degut a l'aparició de diferents tipus de resistència a aquestes teràpies (Janku et al., 2018). L'enorme complexitat del tumor facilita l'adaptació a aquest tipus de teràpia. La interconnexió entre vies de senyalització permet activar sistemes de compensació que corregeixin parcialment el bloqueig d'algun efector (Carracedo et al., 2008; Hsu et al., 2011). Com a conseqüència, algunes cèl·lules tumorals poden sobreviure i adaptar-se a la pressió selectiva imposada pel fàrmac. Ja sigui per mecanismes de mutació genètica, reprogramació epigenètica o remodelació estromal, les cèl·lules tumorals acaben recuperant la funcionalitat inhibida o es fan més dependents d'un altre programa cel·lular, permetent de nou el creixement tumoral (Bergers and Hanahan, 2008; Hanahan and Weinberg, 2011). La gran majoria de mecanismes de resistència coneguts impliquen mutacions secundàries a la diana original que dificulten la interacció fàrmac-diana. En altres casos, com en el de les teràpies anti-angiogèniques, s'han descrit diversos mecanismes de resposta tumoral al tractament. El bloqueig dels receptors de VEGF amb l'anticòs monoclonal DC101, que inicialment exerceix un efecte de reducció en la vascularització tumoral, té com a resposta per part de les cèl·lules canceroses l'expressió d'alts nivells dels factors pro-angiogènics FGF 1 i 2, angiopoietina 1 i efrines A1 i A2, lligands dels receptors de FGF que activaran angiogènesi (Azam et al., 2010). Alternativament, s'han observat tumors que com a resposta a la inhibició de l'angiogènesi esdevenen altament agressius sobreactivant programes cel·lulars que potencien invasió i metàstasi (Ebos et al 2009).

Aquesta Tesi Doctoral està enfocada cap al desenvolupament preclínic i clínic d'un fàrmac amb activitat antitumoral, l'ABTL0812, un compost lipídic que representa el primer de la seva classe (*first-in-class*) i que inhibeix l'eix Akt/mTORC1 al·lostèricament a l'induir la sobreexpressió de la pseudoquinasa TRIB3 (inhibidora d'Akt).



**Caixa 1 – Inhibidors de la via PI3K-Akt-mTORC1**

Les múltiples mutacions que afecten la via PI3K-Akt-mTORC1 en el context tumoral constitueixen un ampli ventall d'oportunitats terapèutiques basades a corregir aquestes alteracions. Després del descobriment de l'activitat antitumoral dels rapàlegs, que inhibeixen al·lostèricament mTOR, es va iniciar el disseny racional d'una segona generació d'agents dirigits a PI3K, Akt i al domini catalític de mTOR (Rodon et al., 2013). Els resultats poc exitosos obtinguts fins al moment s'expliquen principalment per la redundància de senyalització de la mateixa via PI3K-Akt-mTORC1, així com de vies paral·leles activades a la cèl·lula tumoral (Carver et al., 2011). La cascada de senyalització també activada per factors de creixement KRAS-RAF-MEK-ERK (via de senyalització també usualment mutada en càncer) redunda en l'activació de mTORC1 fosforilant i dissociant el complex TSC. Així mateix, KRAS indueix directament l'activació de PI3K (Mendoza et al., 2011; Carracedo et al., 2008). Considerant aquesta redundància en la senyalització, les estratègies terapèutiques s'han orientat a actuar en més d'una diana a la vegada, i a incrementar l'especificitat de diana per assolir inhibicions més robustes.



**Figura 4: Inhibidors de la via PI3K-Akt-mTORC1.** Diagrama que exposa exemples de molècules dirigides a diferents proteïnes de la via PI3K-Akt-mTORC1 i que es troben en diferents fases de desenvolupament clínic. Figura extreta de Rodon i col·laboradors. *Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. Nature Reviews 2013.*

En l'actualitat, els assajos clínics per testar inhibidors pan-PI3K, inhibidors PI3K-mTOR i inhibidors mTORC1-mTORC2 representen el 58% del total d'assajos realitzats amb inhibidors de la via PI3K-Akt-mTORC1. En contraposició, els únics inhibidors de diana única que competeixen amb els inhibidors multi-diana són els inhibidors d'Akt (27% dels assajos clínics), seguits de lluny per inhibidors PI3K específics d'isoforma (12% dels assajos clínics) (Janku et al., 2018).

Pocs fàrmacs dirigits a la via PI3K-Akt-mTORC1 s'han aprovat fins al moment. Els inhibidors de mTORC1 Everolimus i Temsirolimus han sigut aprovats per al tractament de càncers avançats de ronyó i de mama, tumors neuroendocrins ben diferenciats, i astrocitomes. L'inhibidor pan-PI3K Copanlisib s'ha aprovat per al tractament de relapses de limfoma fol·licular (Dreyling et al., 2017). Per últim, l'inhibidor de PI3Kδ Idelalisib s'ha aprovat per al tractament de leucèmia limfocítica crònica i limfoma fol·licular (Janku et al., 2018).

### 1.3.1- Anàlegs de lípids amb activitat antitumoral

L'última dècada ha aparegut una nova classe de compostos englobats sota el nom de Fàrmacs Anàlegs de Lípids. Aquests fàrmacs consisteixen en molècules petites de síntesi química derivades de lípids naturals que tenen com a característiques principals un baix perfil toxicològic en models animals i una alta citotoxicitat en un ampli espectre de línies tumorals. Les dosis de tractament d'aquestes molècules són elevades en comparació amb les utilitzades en teràpies-dirigides, però aquest fet no significa un problema degut al seu baix perfil tòxic (Murray et al., 2015). En els últims anys la recerca en aquest camp s'ha orientat a determinar quin és el mecanisme d'acció subjacent a l'acció antitumoral d'aquests anàlegs lipídics.

Les estratègies antitumorals basades en anàlegs de lípids són diverses. Un dels camps més extensos és el dels alquil-lisofosfolípids sintètics (ALPs), que indueixen la mort de les cèl·lules tumorals per apoptosi. La majoria d'estudis han estat realitzats en l'Edelfosina, el primer ALP sintetitzat. La seva entrada a la cèl·lula és dependent dels *lipid rafts* i exerceixen un ampli ventall de funcions, tals com interferir en la funció d'aquests *lipid rafts* de membrana, bloquejar la senyalització PI3K-Akt, arrestar el cicle cel·lular, inhibir la síntesi de fosfatidilcolina, generar espècies reactives d'oxigen (ROS) o activar estrès reticular (Gajate et al, 2011). Els nombrosos efectes sobre la cèl·lula tumoral derivats del tractament amb ALPs complica la caracterització del seu mecanisme d'acció, ja que podria estar fonamentat en l'alteració de diverses vies de senyalització. Fins a l'actualitat, el mecanisme d'acció dels ALP segueix sense estar definit. Hi ha evidències que lliguen l'efecte inhibitori sobre ERK i PI3K-Akt amb la interferència per part dels ALP amb l'associació de Raf-1 a membrana. Altres investigadors han relacionat l'arrest del cicle cel·lular a la fase G2/M amb una sobreexpressió de p21 (Elrod et al., 2007; Kumar et al., 2009). La inducció d'estrès reticular per part dels ALP es creu que està relacionada amb l'alteració del metabolisme de la fosfatidilcolina (van der Sanden et al., 2003; Nieto-Miguel et al., 2007).

Malgrat que aquest tipus de molècules van demostrar una bona tolerabilitat en models animals a les fases de desenvolupament preclínic, el seu ús a la clínica ha estat restringit per la descripció d'efectes hemolítics i toxicitat gastrointestinal (Berdel et al., 1987). En el cas de l'ALP Mitelfosina, s'ha testat per aplicació tòpica en pacients amb metàstasis cutànies de càncer de mama (Smorenburg et al., 2000) o amb limfomes cutanis (Dumontet et al., 2006), i s'han obtingut un 18% de remissions completes, un 25% de remissions parcials i un 36% d'estabilitzacions de la malaltia. Un altre ALP, la Perifosina, és un inhibidor al·lostèric d'Akt dirigit al seu domini PH. La Perifosina no ha obtingut bons resultats com a tractament únic, però sí en combinació amb altres fàrmacs. Les dades preclíniques obtingudes al combinar la Perifosina (administració oral) amb l'inhibidor de mTOR Temsirolimus (via intravenosa) van demostrar sinergisme i això va motivar l'entrada al desenvolupament clínic en pacients amb glioma recurrent (Murray et al., 2015). Experiments *in vivo* amb models de NSCLC (*non-small cell lung cancer*; càncer de pulmó de cèl·lules no petites) (Vink et al., 2006),

## INTRODUCCIÓ

---

glioma (Becher et al., 2010) o càncer de pròstata (Gao et al., 2011), han identificat una combinació prometedora d'ALPs amb la radiació. El desenvolupament clínic d'aquest tipus de molècules s'ha orientat definitivament a establir combinacions dels ALP ben tolerats amb teràpies estàndard per potenciar-ne l'efecte.

Els anàlegs d'àcids grassos monoinsaturats i poliinsaturats també presenten potencial com a agents antitumorals. Com en el cas dels ALP, la descripció del mecanisme d'acció d'aquest tipus de molècules és incompleta. L'àcid 2-hidroxiolèic (2OHOA) és un àcid gras sintètic derivat de l'àcid oleic ( $\omega$ 9, 18 carbonis). L'efecte citotòxic en diverses línies tumorals, i la seva alta tolerabilitat en models animals, va promoure el seu desenvolupament clínic en pacients amb glioma, sota el nom de Minerval (Barceló et al., 2004). La hidroxilació de l'àcid gras dificulta la seva utilització per part de la cèl·lula i incrementa el seu temps d'acció a l'interior cel·lular. Els efectes antitumorals d'aquest compost estan relacionats amb la inducció de canvis en la composició lipídica de la membrana cel·lular, fet que modula vies de senyalització intracel·lular com Ras-MEK-ERK i la via de les PKC (Barceló et al., 2004; Barceló et al., 2005). En aquest cas, el Minerval induiria canvis en la composició lipídica dels microdominis de membrana *lipid rafts*, promovent el reclutament de la proteïna PKC (*protein kinase C*) que s'activaria i inhibiria el factor de transcripció E2F1 (Barceló et al., 2004; Martínez et al., 2005). E2F1 controla, entre d'altres, l'expressió de múltiples gens necessaris per a la progressió del cicle cel·lular i l'expressió de la DHFR (dihidrofolat reductasa), enzim essencial per a la síntesi *de novo* de purines. Com a conseqüència es produeix una aturada del cicle cel·lular i s'indueix apoptosi (Lladó et al., 2009a; Lladó et al., 2009b). L'alteració en la composició lipídica dels *lipid rafts* també promou el desacoblament de Ras de la membrana, fet que inhibeix la via del la MAPK i redueix l'activitat PI3K-Akt (Terés et al., 2012).

El ventall de molècules sintètiques derivades de lípids amb activitat antitumoral és ampli i són una aproximació diferent al tractament d'aquesta malaltia. Tanmateix, la millora en l'estabilitat d'aquests compostos i el coneixement exhaustiu dels mecanismes de regulació de la seva acció antitumoral són punts clau perquè esdevinguin una alternativa terapèutica de futur.

## 2- Pseudoquinases

L'any 1991 el grup de Susan Taylor va descriure per primera vegada l'estructura d'una quinasa, la PKA (*protein kinase A*), definint el domini catalític i la regió d'unió del lligand (Knighton et al., 1991a; Knighton et al., 1991b). Des d'aquell moment, diversos estudis estructurals i d'homologia de seqüència han establert quins són els motius consens requerits per a l'activitat catalítica de les quinases. El domini catalític, anomenat domini quinasa, està format per 2 lòbuls (N- i C-terminal) que són estructuralment i funcionalment diferents. El lòbul N-terminal està constituït per una fulla  $\beta$  de 5 cadenes acoblada a un

domini  $\alpha$ -helicoidal (hèlix-C). En aquesta regió hi ha dues seqüències altament conservades. Per una banda, la regió rica en glicines GxGxxG, situada al *loop* que uneix les fulles  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2. Aquest *loop* ric en glicines interacciona amb el fosfat  $\gamma$  de l'ATP, fixant-lo al centre actiu i posicionant-lo de manera òptima per la catàlisi. Per altra banda, la seqüència AxK situada a la fulla  $\beta$ 3 contribueix al posicionament òptim dels fosfats  $\alpha$  i  $\beta$  de l'ATP perquè s'uneixin a l'hèlix-C. L'hèlix-C és un element regulatori molt dinàmic que ocupa una regió estratègica entre els 2 lòbuls, connectant parts diferents de la quinasa i actuant com un motiu d'integració de senyals (Tsigelny et al., 1999; Shudler et al., 2009). El seu extrem C-terminal està fixat al cos rígid del lòbul C-terminal a través del *loop*  $\alpha$ C- $\beta$ 4, mentre que l'extrem N-terminal interacciona amb el *loop* d'activació (també denominat T-*loop*). El posicionament de la regió N-terminal de l'hèlix-C és bàsic per assegurar una catàlisi eficient. La distància entre l'extrem N-terminal de l'hèlix-C i el T-*loop* defineix les conformacions oberta i tancada, essencials per a la catàlisi (Steichen et al., 2010). En quinases inactives aquest extrem N-terminal de l'hèlix-C està desordenat o rotat en una posició subòptima per a la catàlisi. El lòbul C-terminal està format per hèlix  $\alpha$  i una fulla  $\beta$  que constitueix en gran mesura la maquinària catalítica associada a la transferència del fosfat al substrat (*loop* catalític). A la fulla  $\beta$  hi ha un altre motiu consens clau, el DFG. L'aspàrtic d'aquesta seqüència és bàsic per unir els ions  $Mg^{2+}$  que ajuden a ancorar l'ATP (T-*loop*) (Johnson et al., 2001; Taylor et al., 2012).

El genoma humà expressa 518 proteïnes quinasa. Aproximadament a un 10% d'aquestes, malgrat presentar una alta homologia estructural, els manquen motius o aminoàcids canònics necessaris per a la unió d'ATP i la transferència eficient del fosfat, i són anomenades pseudoquinases (Manning et al., 2002b; Boudeau et al., 2006). Com a conseqüència, presenten baixos nivells d'activitat quinasa o activitat nul·la. Les pseudoquinases conformen un grup d'aproximadament 60 proteïnes amb activitat senyalitzadora que complementen el quinoma humà i participen en funcions cel·lulars com la diferenciació, supervivència o proliferació (Manning et al., 2002b). Les pseudoquinases uneixen proteïnes quinases i en modulen l'activitat o serveixen de plataforma per a la interacció de diversos efectors d'una via de senyalització. Les pseudoquinases aporten un grau de complexitat més al sistema de senyalització intracel·lular, afegint una via de regulació fosforilació-independent (Zeqiraj and van Aalten, 2010).

L'estudi estructural de les pseudoquinases ha permès assolir una major comprensió de les seves funcions biològiques, així com dels mecanismes subjacents a la seva inactivació. La predicció de pseudoquinases a partir de l'estudi de la seva seqüència es basà inicialment en la manca de residus en un o més dels tres motius consens: (1) la seqüència AxK, essencial per al correcte posicionament de l'ATP; (2) el motiu HRD del *loop* catalític, que aporta l'aspàrtic catalític; (3) el motiu DFG situat al *loop* d'activació que conté l'aspàrtic que uneix el  $Mg^{2+}$  que estabilitza la unió de l'ATP (Scheeff et al., 2009; Brennan et al., 2011; Yoshida-Moriguchi et al., 2013). Més endavant també es va tenir en compte la integritat de la seqüència GxGxxG del *loop* ric en glicines, important per al posicionament òptim de l'ATP (Murphy et al., 2014). Sorprenentment,

## INTRODUCCIÓ

---

malgrat que a algunes pseudoquinases els falten un o més motius catalítics rellevants, segueixen unint el nucleòtid i mostrant activitat quinasa. Aquest fet ha portat a classificar les pseudoquinases en 4 grups (Zeqiraj and van Aalten, 2010):

- 1) **Pseudoquinases:** aquest grup inclou les pseudoquinases que han estat avaluades estructuralment i bioquímicament, confirmant la manca d'activitat quinasa tot i unir ATP. També s'inclouen en aquest grup les pseudoquinases que no poden unir l'ATP. En són exemples les proteïnes VRK3, STRAD $\alpha$  o ILK.
- 2) **Quinases de baixa activitat:** pseudoquinases predites que, tot i presentar modificacions estructurals en residus catalítics clau, mantenen activitat quinasa tot i que a nivells més baixos en comparació amb altres quinases. Moltes d'aquestes pseudoquinases depenen de la unió de l'ATP per realitzar la seva funció. La unió d'ATP induïx canvis conformacionals que possibiliten la interacció d'aquestes pseudoquinases amb altres proteïnes. Són els casos d'HER3, CASK o IRAK2.
- 3) **Pseudoquinases actives:** són pseudoquinases predites que tot i mancar-los motius catalítics són altament actives. Les proteïnes integrants d'aquest grup han desenvolupat mecanismes compensatoris que permeten mantenir l'activitat. És el cas de WNK1 (manca del motiu AxK) i l'Haspina (manca del motiu DFG). A la pseudoquinasa WNK1, el residu terminal del *loop* ric en glicines està conservat com un residu lisina que aporta la càrrega compensatòria que permet la unió de l'ATP (Byrne et al., 2017). Pel que fa a l'Haspina, l'ATP estableix ponts d'hidrogen amb els residus Asp649 i His651 del *loop* catalític, així com amb la Lys511 conservada de la fulla  $\beta$ 3 del lòbul N-terminal (Eswaran et al., 2009).
- 4) **Pseudoquinases predites:** pseudoquinases que presenten alteracions en un o més motius consens però encara no s'han obtingut evidències bioquímiques o estructurals que confirmin la seva activitat o inactivitat. Representen el grup més ampli i cal aprofundir en el seu estudi per classificar-les en algun dels altres grups.

L'estudi de l'origen de les pseudoquinases contempla dos escenaris diferents. Un d'ells està lligat a proteïnes que s'han conservat com a pseudoquinases en l'evolució de les quinases eucariotes. Són casos en què proteïnes amb capacitat d'unió d'ATP, com SCY1 i GCN2 del llevat, no han madurat a proteïnes quinasa actives amb capacitat per a la transferència de fosfat, però han mantingut funcions reguladores no-catalítiques que s'han conservat en el transcurs de l'evolució (Zeqiraj and van Aalten, 2010). Aquest primer escenari, però, no és plausible per a un nombre significatiu de pseudoquinases que no tenen homòlegs clars en espècies primitives, com és el cas de STRAD o HER3. És possible que originàriament aquestes pseudoquinases fossin quinases, que han perdut la seva activitat al llarg de l'evolució. L'estructura de

STRAD mostra un centre actiu molt organitzat i preparat per transferir fosfats, fet que suggereix que en alguna etapa evolutiva la proteïna es va comportar com una quinasa (Fukuda et al., 2009; Zeqiraj et al., 2009a).

### 2.1- Pseudoquinases com a diana terapèutica

El rol regulador de les pseudoquinases, que en molts casos és independent d'activitat catalítica, implica que la seva alteració està implicada en un ampli ventall de malalties, entre les quals el càncer.

**STRAD.** Actua com a regulador al·lostèric de la quinasa supressora de tumors LKB1. LKB1 és una quinasa màster que regula el metabolisme energètic, la polaritat i el creixement cel·lular. LKB1 regula 14 proteïnes quinasa de la subfamília d'AMPK per fosforilació directa de la treonina conservada al *loop* d'activació d'aquestes proteïnes (Lizcano et al., 2004). LKB1 funciona com a complex trimèric amb STRAD (reguladora de LKB1) i la xaperona MO25 $\alpha$  (estabilitzadora del complex) (Boudeau et al., 2003). STRAD és capaç d'unir ATP, esdeveniment necessari per adoptar la conformació tancada activa que possibilita la interacció de STRAD amb la proteïna LKB1 (Zeqiraj et al., 2009b). Aquesta unió manté LKB1 en una conformació activa, que és estabilitzada per la interacció de MO25 $\alpha$  amb el *loop* d'activació de LKB1. En diversos tipus de càncer humà s'han descrit pèrdues de funció de LKB1 per mutacions que impedeixen la seva interacció amb STRAD. Per aquest motiu, en l'actualitat es dissenyen estratègies per afavorir la interacció STRAD-LKB1 i manipular els seus efectors (Byrne et al., 2017).

**HER3.** HER3 pertany a la família dels receptors tirosina quinasa EGFR (receptors del factor de creixement epidèrmic). Malgrat que HER3 no té el residu aspàrtic del motiu DGF, pot unir ATP de forma eficient i mostra activitat quinasa, tot i que a nivells molt baixos. La unió del lligand indueix l'heterodimerització d'HER3 amb HER1 o HER2 (EGFRs), fet que indueix la seva transactivació al·lostèrica i activa vies de senyalització com la de PI3K-Akt (Yarden, 2001; Xie et al., 2014). La sobreexpressió d'HER3 o mutacions activadores en la proteïna es relacionen amb la promoció d'un ampli ventall de càncers i amb mecanismes de resistència terapèutica (Hsieh and Moasser, 2007). HER3 s'utilitza com a marcador diagnòstic per al càncer de mama, on s'observa la seva ampliació en un 60% dels casos (Ocana et al., 2012). Per corregir la senyalització aberrant d'HER3 s'han dissenyat immunoteràpies dirigides a bloquejar HER3 i d'altres EGFRs, així com moduladors al·lostèrics que mantinguin HER3 en una conformació inactiva (Sithanandam et al., 2008; Novotny et al., 2016).

**Tribbles.** La família de pseudoquinases Tribbles (TRIB *homologs*) està formada per TRIB1, TRIB2 i TRIB3, i van ser descrites per primera vegada en *Drosophila* com a reguladores de la proliferació cel·lular i migració durant el desenvolupament (Grosshans and Wieschaus, 2000). Les Tribbles es caracteritzen per contenir un

## INTRODUCCIÓ

---

domini pseudoquinasa que inclou un motiu DFG atípic. Les proteïnes TRIB regulen processos cel·lulars molt diversos, com la proliferació, metabolisme, estrès cel·lular o diferenciació (Lohan and Keeshan, 2013). Les proteïnes TRIB modulen la senyalització intracel·lular principalment a través de dos mecanismes. El primer, consisteix en la regulació d'ubiquitinació de substrats. El segon, es basa en la unió a proteïnes per modular-les al·lostèricament o per actuar com a proteïna adaptadora per servir de plataforma de senyalització per a altres proteïnes quinases (Yokoyama and Nakamura, 2011). En les cèl·lules de mamífer els tres membres de la família TRIB es classifiquen com a serina/treonina pseudoquinases que, *in vitro*, mostren baixa (TRIB2 i TRIB3) o cap afinitat per l'ATP (TRIB1). Les pseudoquinases TRIB representen una branca de la subfamília de les CAMK ( $Ca^{2+}$ /calmodulina-dependent proteïna quinasa) (Manning et al., 2002b). Les tres proteïnes TRIB s'expressen de forma diferencial entre espècies. Un estudi taxonòmic va determinar que són gairebé exclusives del regne animal (Eyers et al., 2017). Aquest estudi va posar en relleu que les seqüències homòlogues a TRIB2 són les més ancestrals. Els ortòlegs de TRIB1 i TRIB3, en canvi, estan restringits a llinatges més tardans que van originar els organismes vertebrats, on les tres proteïnes TRIB estan preservades. L'emergència de TRIB1 i TRIB3 es relaciona amb un procés d'especialització del sistema d'integració de senyals als organismes més complexos, essent TRIB3 la que ha aparegut de forma més recent (Eyers and Murphy, 2013; Reiterer et al., 2014).

La desregulació de les proteïnes TRIB està lligada a diferents tipus de càncer, però especialment al de pulmó, fetge, melanoma i leucèmia mieloide aguda. El gen humà de TRIB1 es localitza al mateix locus cromosòmic (8q24.13) que l'oncogen MYC. L'amplicó 8q24 és una de les regions més comunament amplificades en múltiples tipus de càncer, essent TRIB1 un dels gens potencialment amplificats (Rothlisberger et al., 2007). TRIB1 s'ha relacionat amb l'etiologia de glioma, càncer de mama, ovari i fol·licular de tiroide (Tang et al., 2015; Eyers et al., 2017). En el cas de TRIB2, la seva funció pro-tumoral en càncers de pulmó, fetge i leucèmia està lligada a la degradació del factor de transcripció C/EBP $\alpha$ , important inhibidor del cicle cel·lular (Keeshan et al., 2006). En models murins, la sobreexpressió de TRIB2 en medul·la òssia induïx leucèmia mieloide aguda. En el sistema hematopoètic el factor C/EBP $\alpha$  és essencial per a la diferenciació a granulòcits, procés que és bloquejat per TRIB1 i TRIB2 (Tenen, 2003; Keeshan et al., 2006). Malgrat que TRIB2 no uneix ATP, és dependent de mantenir el lloc d'unió a nucleòtid intacte per ser activa. El disseny de lligands dirigits a aquesta regió de TRIB2 és una opció terapèutica en desenvolupament (Liang et al., 2016; Byrne et al., 2017).

### 2.2- La pseudoquinasa TRIB3

El gen TRIB3 humà, també conegut com a TRB3, NIPK, SKIP3 o SINK, està localitzat al cromosoma 20 (p13-p12.2), amb una longitud de 16.9 kpb. El primer exó abasta tota la regió 5'-UTR del mRNA, essent els

primers nucleòtids del segon exó els codificants pel codó d'inici de traducció. Els exons 2 i 3 són plenament codificants i acaben en el quart i últim exó que conté la regió 3'-UTR. El gen de TRIB3 produeix diverses isoformes de mRNA a través de la utilització d'inicis de transcripció alternatius i per l'existència de 5 llocs donadors de *splicing* presents al primer exó. Com a conseqüència, la regió 5'-UTR pot diferir molt entre les diferents isoformes de TRIB3, mentre que la proteïna codificada és idèntica en tots els casos (358 aminoàcids) (Örd and Örd, 2017). Alguns tipus cel·lulars, sota situacions d'estrès, indueixen de forma preferent les variants de mRNA amb la regió 5'-UTR truncada, ja que són traduïdes de forma més eficient. El sistema de transcripció i traducció de TRIB3 és versàtil per facilitar la síntesi de la proteïna. El transcrit de TRIB3 és degradat ràpidament i té una vida mitjana d'entre 20 minuts i 2 hores en funció de la línia cel·lular (Rzymiski et al., 2008; Sharova et al., 2009). Algunes condicions, però, modifiquen la ràtio de reciclatge. En anòxia, per exemple, la proteïna d'unió a RNA HuR estabilitza l'mRNA de TRIB3 (Rzymiski et al., 2008). Altrament, l'mRNA de TRIB3 conté a la regió 3'-UTR motius de reconeixement per microRNAs (miR-24 i miR-96) que en bloquegen la traducció (Kim et al., 2014; Hsu et al., 2014).

La proteïna TRIB3 és ubiqua i s'expressa de forma uniforme a la gran majoria de teixits (nivells més elevats al fetge) i es localitza de forma predominant al nucli, però du a terme les seves funcions tant al nucli com al citosol. L'estrès cel·lular i la insulina indueixen la sobreexpressió de TRIB3 en diferents tipus cel·lulars (Örd and Örd, 2005). Comparant les proteïnes TRIB d'humà i ratolí, TRIB3 resulta ser la menys conservada. TRIB1 i TRIB2 mostren un 97,5% i un 99,2% d'homologia, mentre que per a TRIB3 és del 81,2% (Okamoto et al., 2007).

Experiments *in vitro* han posat de manifest la manca d'activitat fosfotransferasa de TRIB3, tot i que recentment s'ha reportat que TRIB3 pot autofosforilar-se a baixos nivells *in vitro*. Aquesta activitat, a la qual no se li atorga cap rellevància biològica, és dependent de la lisina del residu AxK (Bowers et al., 2003; Bailey et al., 2015).

### 2.2.1- Estructura de la proteïna TRIB3 i modificacions post-traduccionals

L'any 2015, Murphy i col·laboradors van publicar l'estructura de la proteïna TRIB1 humana (sense la regió N-terminal), la primera estructura resolta d'una proteïna TRIB (Murphy et al., 2015). A dia d'avui no s'han obtingut les estructures cristal·lines de TRIB2 i TRIB3, de manera que la informació estructural deriva de models basats en l'estudi de l'homologia entre els tres membres de la família Tribbles. Mentre que els dominis pseudoquinasa de TRIB1 i TRIB2 presenten un 71% d'homologia entre ells, només presenten un 54% i 55% d'homologia amb el de TRIB3, respectivament (**Figura 5**). Aquest fet indica que TRIB3 ha divergit bastant dels seus paràlegs (Örd, 2008; Evers, 2015).



## INTRODUCCIÓ

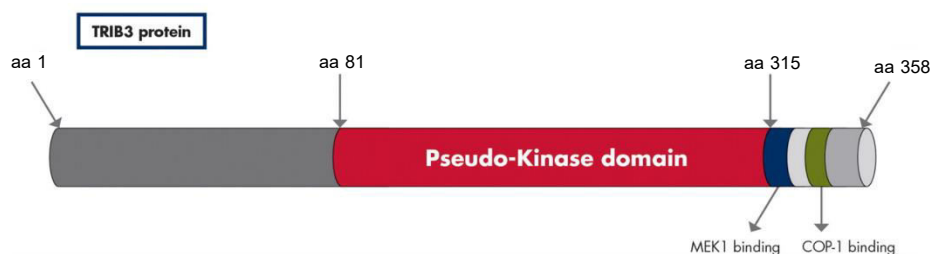
hTRIB1	1	MRVGPVRSAMSGASCPKGPALLFPATRGVPAKRLLDADDAAAVAAKCPKILSECSSPFDYLL
hTRIB2	1	-----MNIHRSTPITTIARYGRSRNKTQDFEELSSIRSAEPPSCSFSFN-----
hTRIB3	1	-----MRATPLAAPAGSLSRKKRLRLDDNLDTERPVQVTRARSGPQPRLP
hTRIB1	61	SPEGSPCSFPQPPAAPGAGGGSGSAPGFSRIIDYLLPLAERPHVSRALCIHTGRELRCK
hTRIB2	43	--LGSPSPPETP-----NLSHCVSCIGKYLLLEPLEGDHVFRAVHHSGEELVCK
hTRIB3	45	PCLLPLSPPTAPDR-----ATAVATASRLGPIVLEPEEGGRAYCALHCFTGTEYTC
hTRIB1	121	VFPKHYQDKIRPYIQLPSSHSNITGIVEVILGETKAYVFFEKDFGDMHSLVRSRKLREE
hTRIB2	91	VFDISCYQESLAEFCFLSAHSNINQITEILGETKAYVFFERSYGMHSLVRCCKLREE
hTRIB3	98	VVFPVQALAVLEPYARLPPHKHVARPTEVLAGTQLLYAFETRTTHGDMHSLVRSRHRIPEP
hTRIB1	181	EAARLFYQIVSAVAHCHQSAIVLGLDLKLRKFVSTFEERTQLRLESLEDHIMKGEDDALS
hTRIB2	151	EAARLFYQIASAVAHCHDGLVLRDLKLRKFFKDEERTRVKLESLEDAYILRGDDDSL
hTRIB3	158	EAAWLFQIMATAIAHCHQHGLVLRDLKLCRFVFAERERKKLVLENLEDSCVLTGPDDSLW
hTRIB1	241	DKHGCPAYVSPEILNTGITYSGKAADVWSLGVMLYTLVGRYPFHDSPESELFSKIRRGQ
hTRIB2	211	DKHGCPAYVSPEILNTGYSYSGKAADVWSLGVMLYTMLVGRYPFHDEPSSLFSKIRRGQ
hTRIB3	218	DKHACPAYVGPPEILSRYSYSGKAADVWSLGVALLTMLAGHYPFQDSEPVLEGGKIRRG
hTRIB1	301	FCIPEHISPKARCLIRSLRREPSERLTAPPELLHPWFEISVLEPG-YIDSEIGTSDQIVP
hTRIB2	271	FNIPETLSPKACLIRSLRREPSERLTSEIILHPWFESTDFSVSNSAYGAKEVSDQIVP
hTRIB3	278	NAIPAGLSAPARCLVRCLLRREPSERLTATGILLHPWLRQDPMELAPTRSHWEAAQVPE
hTRIB1	360	RYEEDSDISSFFC-----
hTRIB2	331	DVNMEENLDPFFN-----
hTRIB3	338	DGLGLDEAREEEGDREVVLYG

 Pseudokinase domain

**Figura 5: Alineament de TRIB1, TRIB2 i TRIB3.** Les seqüències d'aminoàcids de TRIB1, TRIB2 i TRIB3 van ser alineades utilitzant el programa ClustalW. Es mostren els dominis pseudoquinasa de les tres proteïnes.

La proteïna TRIB3 conté un domini que presenta alta homologia amb el domini quinasa consens, però amb l'alteració d'alguns aminoàcids rellevants. En comparació amb el domini quinasa canònic, l'estructura del domini pseudoquinasa de TRIB3 no té el motiu DFG del *loop* d'activació, bàsic per unir el ió  $Mg^{2+}$  i estabilitzar l'ATP, ni la seqüència consens GxGxxG (*loop* ric en glicines) que està implicada en la unió de l'ATP (Eyers et al., 2017). En canvi, l'estructura de TRIB3 sí que conserva el residu lisina del motiu AxK de la fulla  $\beta_3$  i l'aspàrtic del motiu HRD del *loop* catalític (Boudeau et al., 2006; Hegedus et al., 2007). El domini N-terminal de TRIB3 conté un senyal de localització nuclear i una regió rica en serines i prolines (seqüència PEST; prolina, glutàmic, serina, treonina), implicada en la degradació proteasomal de TRIB3 via ubiquitinació (Eyers et al., 2017). El domini C-terminal inclou dues seqüències ben conservades, una d'unió per MAPKK que s'anomena domini MEK1 (Yokoyama et al., 2010) i el domini d'unió de COP1 (*constitutive*

*photomorphogenic protein 1*), una E3 ubiquitina lligasa que regula la ubiquitinació de proteïnes associades a TRIB3 (Hegedus et al., 2006; Keeshan et al., 2010) (**Figura 6**).



**Figura 6: Estructura de la pseudoquinasa TRIB3.** Representació del domini pseudoquinasa (vermell), de les regions d'unió a MAPKK (blau) i a COP1 (verd), situades a l'extrem C-terminal. Figura modificada de Prudente i col·laboradors. *The mammalian tribbles homolog TRIB3, glucose homeostasis, and cardiovascular diseases. Endocrine Reviews 2012.*

TRIB3 està sotmesa a diferents modificacions post-traduccionals. TRIB3 té un temps de vida mitjana curt, de 15 minuts en algunes cèl·lules i fins a 4 hores en alguns casos, i és degradada per la via ubiquitina-proteasoma (Wennemers et al., 2012; Örd and Örd, 2017). En aquest sentit, s'han reportat els residus Lys33 i Lys97 de TRIB3 com a dos llocs putatius d'ubiquitinació (Phosphosite). La ubiquitinació de TRIB3 té lloc per interacció de la seqüència PEST amb l'E3 ubiquitina lligasa SIAH1, així com per interacció amb CDH1 i CDC20, co-activadores de la E3 ubiquitina lligasa APC/C (Ohoka et al., 2010). En determinades condicions, hi ha mecanismes que permeten allargar la vida de TRIB3 fins a temps superiors a les 10 hores. Així, en situacions d'estrès cel·lular, l'enzim USP9X interacciona amb TRIB3 i la desubiquitina i estabilitza (Izrailit et al., 2017). En aquest context cel·lular també s'han descrit acetilacions (Yao and Nyomba, 2008) i metilacions (Rasmussen et al., 2015) de TRIB3 que incrementen la seva estabilitat.

TRIB3 pot ser truncada per l'acció de caspases que l'escindeixen pel residu Asp338, eliminant un fragment C-terminal de 20 aminoàcids de longitud. Aquest tall mediat per caspases estaria implicat en l'activació d'apoptosi (Shimizu et al., 2012). Per últim, també s'han identificat fins a 4 llocs de fosforilació a TRIB3, malgrat que encara no s'han validat les quinases que podrien estar-hi implicades ni la rellevància funcional d'aquestes fosforilacions (Hornbeck et al., 2012; Zhou et al., 2013).

### 2.2.2- Funcions de TRIB3

TRIB3 participa en els diferents processos de senyalització intracel·lular a través d'interaccions proteïna-proteïna en què TRIB3 pot actuar inhibint l'activitat de la proteïna unida, fent de proteïna plataforma (*scaffold*) per facilitar interaccions amb terceres proteïnes, o alterant la localització subcel·lular de la proteïna unida (Eyers et al., 2017). Les proteïnes client de TRIB3 són de diversa naturalesa, havent-hi proteïnes quinasa, factors de transcripció, o ubiquitina lligases, entre d'altres. Una de les principals accions moduladores dutes a terme per TRIB3 és la inhibició d'Akt. TRIB3 s'uneix directament al domini kinasa d'Akt i bloqueja la fosforilació dels residus Ser473 (fosforilat per mTORC2) i Thr308 (fosforilat per PDK1) impedit la seva activació (Du et al., 2003; Matsushima et al., 2006).

**Senyalització per insulina.** La insulina s'uneix al receptor tirosina quinasa que s'activa per autofosforilació en els residus tirosina del seu domini intracel·lular. Les tirosines fosforilades són reconegudes per IRS1 (*insulin receptor substrate 1*) que és fosforilada i activa la cascada PI3K-PDK1-Akt. L'activació d'Akt coordina els programes cel·lulars dirigits a incrementar la síntesi i emmagatzematge de glicogen via activació de GSK3, o via facilitació del transport de glucosa mobilitzant transportadors de glucosa GLUT4 a membrana plasmàtica, entre d'altres. La insulina indueix l'expressió de TRIB3, que a l'inhibir Akt actuaria com a *feedback* negatiu d'aquesta via (Du et al., 2003; Oberkofler et al., 2010). En consonància, s'ha trobat que la sobreexpressió de TRIB3 està relacionada amb problemes metabòlics associats a la resistència a la insulina (Liu et al., 2010; Liu et al., 2012; Prudente et al., 2012).

**Senyalització inflamatòria.** NF- $\kappa$ B és un factor de transcripció central en la promoció de respostes inflamatòries a través de la seva interacció amb RelA (p65). TRIB3 s'uneix a RelA, n'inhibeix la fosforilació per part de la PKA i evita la seva interacció amb NF- $\kappa$ B (Wu et al., 2003). Per altra part, i en resposta a estrès cel·lular i citoquines, l'activació de la via de NF- $\kappa$ B promou l'expressió de TRIB3, funcionant com a sistema de *feedback* negatiu (Rzymiski et al., 2008; Duggan et al., 2010). TRIB3 també participa de la senyalització inflamatòria modulant l'activació de diferents MAPKs (ERK, JNK i p38), a través de la interacció amb les proteïnes MAPKK, MEK1, MKK4, MKK6 i MKK7, i la proteïna MAPKKK, MLK3 (Kiss-Toth et al., 2004). Recentment s'ha descrit que TRIB1, 2 i 3 competeixen entre elles i amb les MAPK fer unir-se a les MAPKK. A través de la interacció amb aquests components, es creu que TRIB3 pot inhibir l'activitat transcripcional del factor AP-1 (*activator protein 1*) en resposta a l'estimulació per citoquines (Humphrey et al., 2014; Guan et al., 2016).

**Estrès cel·lular.** TRIB3 es sobre-expressa en resposta a diferents tipus d'estrès (manca de nutrients, agents químics tòxics, estrès oxidatiu, estrès reticular, etc.). El promotor del gen TRIB3 conté la regió reguladora C/EBP-ATF. Aquest element de regulació media la inducció de TRIB3 en resposta a múltiples tipus d'estrès cel·lular (Ohoka et al., 2005; Örd and Örd, 2005). Els elements C/EBP-ATF són regions d'unió per a dominis

bZIP (*basic leucine zipper domain*) de factors de transcripció heterodimèrics consistents en un factor de transcripció de la família C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein*) i un factor de transcripció ATF (*activating transcription factor*). La seqüència consens de les regions C/EBP-ATF es compon de dues meitats, una per cada tipus de proteïna de l'heterodímer (Kilberg et al., 2009; Liew et al., 2010). En condicions d'estrès, el factor de transcripció ATF4 actua com a integrador de la resposta cel·lular i promou l'expressió de TRIB3 que inhibeix l'eix Akt/mTORC1 per disminuir la ràtio metabòlica i afavorir la resposta cel·lular a l'estrès. En funció de l'èxit d'aquesta resposta a restablir l'homeòstasi cel·lular, la sobreexpressió de TRIB3 tindrà un paper pro-supervivència o, per contra, pro-mort (Wek et al., 2006; Han et al., 2013).

### 2.2.3- TRIB3 en càncer

Hi ha controvèrsia sobre el paper que juga TRIB3 en el context tumoral. Mentre que estudis relacionen TRIB3 amb el desenvolupament, progressió tumoral i metàstasi, d'altres descriuen TRIB3 com un factor supressor de tumors.

**TRIB3 com a promotor tumoral.** Els estudis genètics de biòpsies no han detectat mutacions en la seqüència codificant per TRIB3 però sí amplifacions del gen (Lawrence et al., 2014; Örd and Örd, 2017). La sobreexpressió de TRIB3 s'ha reportat en diversos tipus de tumors humans però hi ha controvèrsia sobre el paper que hi juga. Alguns autors han descrit que nivells elevats de l'mRNA de TRIB3 correlacionen amb mala prognosi en pacients amb càncer colorectal (Miyoshi et al., 2009) i càncer de mama (Wennemers et al., 2011b). Per altra banda, alts nivells de la proteïna TRIB3 s'han associat a bona prognosi i sensibilitat a radioteràpia en pacients amb càncer de mama (Wennemers et al., 2011a).

TRIB3 està implicada en la promoció de la senyalització per TGF- $\beta$  – SMAD3. TRIB3 inhibeix la degradació de SMAD3 per part de la ubiquitina lligasa SMURF2 (*SMAD ubiquitination regulatory factor 2*), i possibilita la localització nuclear de SMAD3 (Hua et al., 2011). La senyalització per TGF- $\beta$  està associada en alguns tipus de càncer amb transició epiteli-mesènquima i metàstasi, de manera que la sobreexpressió de TRIB3 pot tenir un paper tumorogènic en aquests casos (Hua et al., 2011; Izrailit et al., 2013). Altrament, TRIB3 promou el creixement tumoral en models animals de càncer de mama humà activant la via de Notch, implicada en proliferació, diferenciació i supervivència cel·lular. Així, en línies cel·lulars humanes de càncer de mama s'ha descrit que TRIB3 regula Notch a través de l'activació de les vies MAPK-ERK i TGF $\beta$ -SMAD4 (Kiss-Toth et al., 2004; Chan et al., 2007; Izrailit et al., 2013).

**TRIB3 com a supressor de tumors.** Aquesta funció està estretament lligada a l'activitat inhibidora de TRIB3 sobre Akt. En models animals de càncer de pell per carcinogènesi química s'observà que els ratolins TRIB3<sup>-/-</sup> desenvolupaven més lesions dèrmiques malignes (Salazar et al., 2015). En el model de ratolins

## INTRODUCCIÓ

---

PTEN<sup>+/-</sup> (genèticament predisposats al desenvolupament de tumors) creuats amb ratolins TRIB3<sup>-/-</sup>, la pèrdua de TRIB3 incrementa la incidència de focus malignes. Els autors van determinar que el paper antitumoral exercit per TRIB3 implicava la inhibició d'Akt. La deficiència de TRIB3 comportava l'activació d'Akt i la inactivació del factor de transcripció supressor de tumors FoxO3 (Salazar et al., 2015).

El paper antitumoral de TRIB3 també s'ha lligat a la seva activitat supressora d'inflamació (Wu et al., 2003). La infecció per *Helicobacter pylori* pot comportar l'aparició de càncer d'estómac com a conseqüència d'una inflamació prolongada. En aquest procés d'inflamació crònica s'ha descrit una *down*-regulació de TRIB3, fet que comporta un increment en la senyalització de NF-κB (Smith et al., 2011). Altres casos d'inflamació crònica com les hepatitis B i C, esofagitis per reflux d'àcid gàstric o malaltia inflamatòria intestinal, estan sotmesos al mateix tipus de procés (Örd, 2016).

El rol supressor de tumors de TRIB3 s'ha vist reforçat l'última dècada per la caracterització del mecanisme d'acció d'alguns composts amb activitat antitumoral, on la sobre-expressió de TRIB3 és un esdeveniment mediador del seu efecte citotòxic. La Salinomicina, un ionòfor de potassi extret de *Streptomyces aibus*, és selectiu per a cèl·lules stem de càncer de mama *in vitro* i inhibeix el creixement tumoral i la metastasi en models animals (Kim et al., 2011; Li et al., 2013). La Salinomicina indueix estrès reticular i la conseqüent sobreexpressió de TRIB3. TRIB3 uneix i inactiva Akt, fet que comporta la inhibició del complex mTORC1, i mort per apoptosi caspasa-dependent (Kim et al., 2011; Li et al., 2013). Un altre exemple són els cannabinoides. Els cannabinoides presenten activitat antitumoral a través d'inhibir angiogènesi, inhibir la progressió del cicle cel·lular, i induir citotoxicitat a les cèl·lules tumorals. Interaccionen amb dos receptors específics (CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub>) a la membrana cel·lular. El grup de Guillermo Velasco va caracteritzar el mecanisme d'acció del Δ<sup>9</sup>-tetrahidrocannabinol (THC), el component actiu principal del *Cannabis sativa* (Salazar et al., 2013). El THC activa estrès reticular, que indueix la sobreexpressió de TRIB3 i provoca la inhibició de l'eix Akt/mTORC1. Com a conseqüència s'indueix autofàgia i mort per apoptosi (Carracedo et al., 2006; Salazar et al., 2009a; Salazar et al., 2009b).

### 3- Estrès de reticle endoplasmàtic

El reticle endoplasmàtic (RE) és un orgànul subcel·lular estructurat en una xarxa contínua de túbuls i sacs aplanats que desenvolupa una important funció biosintètica i senyalitzadora a les cèl·lules eucariotes. Al RE s'hi poden diferenciar dues regions estructuralment i funcionalment diferents: el RE rugós, que es caracteritza per la presència de ribosomes ancorats a la cara citoplasmàtica de la membrana del RE, i el RE llis, sense ribosomes (Baumann and Walz, 2001; Smith and Wilkinson., 2017). El RE és el magatzem intracel·lular de calci més gran, essent per tant un orgànul clau en la regulació dels nivells de Ca<sup>2+</sup> i de la senyalització mediada per Ca<sup>2+</sup>. Per altra banda, el RE regula la síntesi, plegament i modificació post-

traduccional de proteïnes destinades a ser secretades o inserides a membrana. Els ribosomes de la membrana del RE rugós insereixen els polipèptids naixents al lumen del RE de manera co-traduccional, on una maquinària composta per xaperones (BiP/GRP78, GRP94), foldases (*peptidyl-prolyl cis or trans isomerase* (PPI), *protein-disulfide isomerase* (PDI)) i proteïnes de control de qualitat (calnexina, calreticulina) dirigeix el procés de plegament proteic (Brodsky and Stack., 2012). Les xaperones incrementen l'eficiència en el plegament de les proteïnes estabilitzant les formes parcialment plegades i evitant la seva agregació. Les foldases faciliten el plegament catalitzant la isomerització d'enllaços prolil o la formació i isomerització de ponts disulfur (Bulleid, 2012; Braakman and Hebert, 2013). Les proteïnes mal plegades han de ser degradades per prevenir l'alliberament de proteïnes disfuncionals o la seva acumulació al RE. Aquest procés és denominat *ER-associated degradation* (ERAD) i s'articula en tres passos: reconeixement de les proteïnes mal plegades, retrotranslocació citosòlica d'aquestes proteïnes, i degradació via ubiquitinació-proteasoma. Per últim, el RE també regula la biosíntesi de lípids, essent l'òrgànul que més participa d'aquesta funció (Araki and Nagata, 2011; Hetz et al., 2015).

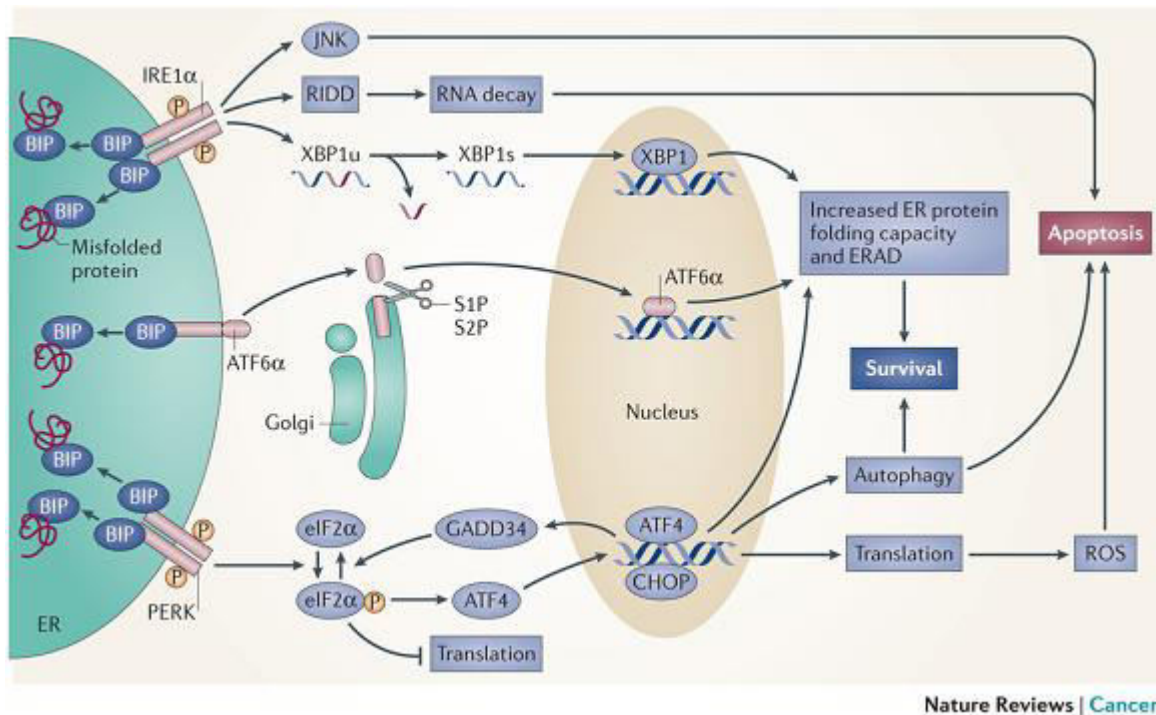
La ràtio de transport proteic al lumen del RE i la seva capacitat de plegament de proteïnes fluctua en funció de les condicions intra i extracel·lulars. Les cèl·lules poden adaptar-se i incrementar la capacitat de processament del RE, augmentant la mida del RE i *up*-regulant la traducció de xaperones. Tanmateix, en diverses condicions fisiològiques i patològiques com ara estrès oxidatiu, hipoglucèmia, desequilibri en els nivells de  $Ca^{2+}$  del RE o infeccions virals, la demanda de processament de proteïnes excedeix les capacitats del RE, resultant en l'acumulació de proteïnes no plegades o mal plegades al lumen del RE (Jain, 2017). Aquesta alteració de l'homeòstasi del RE és anomenada estrès reticular. Com a conseqüència d'aquesta acumulació de proteïnes no plegades, s'activa una resposta evolutivament conservada coneguda com a *unfolded protein response* (UPR) (Hetz, 2012; Smith and Wilkinson, 2017).

### **3.1- La resposta UPR (*unfolded protein response*)**

La resposta UPR integra diverses vies de senyalització dirigides a recuperar l'homeòstasi del RE. Aquesta resposta s'articula principalment en tres eixos d'actuació: reduir la càrrega proteica del RE inhibint la traducció proteica general de la cèl·lula, afavorir el correcte plegament de les proteïnes a través de la síntesi selectiva d'efectors de la maquinària de plegament del RE i promoure vies de degradació per eliminar els agregats de proteïnes mal plegades (sistema ERAD i autofàgia) (McQuiston and Diehl, 2017). Si la resposta UPR no aconsegueix reconduir la situació i l'estrès reticular persisteix, s'activen programes de mort cel·lular per evitar l'acumulació de cèl·lules no funcionals (Mann and Hendershot, 2006; Urra et al., 2013).

## INTRODUCCIÓ

En mamífers, els tres principals sensors d'estrès reticular que activen la resposta UPR són les proteïnes transmembrana de RE: ATF6 (*activating transcription factor 6*), IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*) i PERK (*PKR-like ER kinase*). L'activació d'aquests sensors està controlada per la xaperona resident del RE BiP/GRP78 (*binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein 78*) (Walter and Ron, 2011; Avril et al., 2017) (Figura 7).



**Figura 7: Eixos de senyalització de la resposta UPR.** L'acumulació de proteïna mal plegada al reticle endoplasmàtic (ER) comporta la dissociació de la xaperona BiP dels efectors IRE1, ATF6 i PERK, per unir i establir les proteïnes no plegades. Com a conseqüència, s'activen els tres efectors. PERK fosforila i inactiva eIF2 $\alpha$ , inhibint la traducció proteica general i induint específicament els factors de transcripció ATF4 i CHOP que transloquen a nucli. ATF6 transloca a l'aparell de Golgi, on és escindida per les proteases SP1 i SP2. A continuació el factor de transcripció ATF6 transloca a nucli. IRE1 processa l'mRNA XBP1u (unspliced). L'mRNA madur produït (XBPs, spliced) codifica pel factor de transcripció XBP1 que transloca a nucli. En conjunt, els factors de transcripció induïts pels tres eixos promouen la maquinària de plegament del reticle, proteïnes del sistema ERAD, i autofàgia per degradar els agregats de proteïna mal plegada. Si l'estrès reticular persisteix, la viabilitat cel·lular es veu compromesa i la resposta UPR promou mort cel·lular. Figura extreta de Wang i Kaufman. *The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. Nature Reviews Cancer 2014.*

En condicions basals, BiP està constitutivament unida als dominis luminals dels sensors, evitant la seva activació per oligomerització. Quan s'altera l'homeòstasi del RE, l'acumulació progressiva de proteïnes no plegades comporta la dissociació de la xaperona BiP dels sensors per unir i establir aquestes proteïnes (Bertolotti et al., 2000). Conseqüentment es produeix l'activació de PERK i IRE1 per homodimerització i transautofosforilació, i la subseqüent activació de cascades de senyalització que activaran programes

d'expressió gènica que integraran la resposta UPR. ATF6, un cop BiP s'ha dissociat, és modificada per la proteïna PDI i exportada al complex de Golgi per ser activada (Carrara et al., 2015; Jain, 2017). Mentre que els dos eixos de senyalització regulats per ATF6 i IRE1 tenen com a objectiu primordial la recuperació de l'homeòstasi, l'eix controlat per PERK té un paper més determinant a dictar si l'adaptació a l'estrès reticular és exitosa o si, per contra, comporta mort cel·lular.

**Eix ATF6 (isoformes  $\alpha$  i  $\beta$ ).** ATF6 (*activating transcription factor 6*) és una proteïna transmembrana de RE de tipus II. L'alliberament de BiP permet la modificació de ponts disulfur d'ATF6 per part de la proteïna PDI, induint un canvi conformacional de la proteïna que revela dues seqüències de localització al complex de Golgi (Haze et al., 1999; Yoshida et al., 2000). Un cop translocada a Golgi, ATF6 és tallada seqüencialment a la regió propera a membrana per les proteases S1P i S2P (*site 1 protease, site 2 protease*) i allibera el domini N-terminal actiu d'ATF6 que transloca a nucli i actua com a factor de transcripció i indueix l'expressió de gens implicats principalment en plegament de proteïnes (xaperones BiP i GRP94, i PDI entre d'altres) i sistema ERAD (Yoshida et al., 2000; Lee et al., 2002). ATF6 també indueix l'mRNA de XBP1, que serà processat per IRE1 (Yoshida et al., 2001).

**Eix IRE1 (isoformes  $\alpha$  i  $\beta$ ).** IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*) és una proteïna transmembrana de RE de tipus I. El seu extrem C-terminal citosòlic presenta dues activitats moleculars: serina/treonina quinasa i endoribonucleasa (RNasa). L'extrem N-terminal és luminal. L'estrès reticular promou l'alliberament de BiP i l'homodimerització d'IRE1. El dímer es transautofosforila i indueix un canvi conformacional que activa el domini endoribonucleasa (Tirasophon et al., 1998; Hetz et al., 2011). El primer substrat d'IRE1 és l'mRNA no processat XBP1u (*X-box binding protein-1 unspliced*). L'escissió de 26 nucleòtids de la seqüència produeix l'mRNA madur que codifica pel factor de transcripció XBP1 que regula la transcripció de diversos gens implicats en el plegament i secreció de proteïnes, sistema ERAD, i síntesi de lípids (Calfon et al., 2002; Lee et al., 2003). L'activitat RNasa d'IRE1 també està implicada en la degradació de mRNAs localitzats al RE, RNAs ribosòmics i microRNAs. Els mecanismes subjacents a la regulació d'aquesta funció encara no es coneixen (Han et al., 2009; Upton et al., 2012).

**Eix PERK.** PERK (*PKR-like ER kinase*) és una proteïna transmembrana de RE de tipus I. El seu extrem N-terminal és luminal, i l'extrem C-terminal citosòlic conté un domini quinasa. En condicions d'estrès reticular, PERK homodimeritza, es transautofosforila i s'activa (Harding et al., 2000). PERK fosforila els factors de transcripció NRF2 (*nuclear respiratory factor 2*) i eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$* ). Per un costat, NRF2 regula la resposta antioxidant. Per l'altre, la fosforilació de la Ser51 d'eIF2 $\alpha$  per part de PERK inhibeix eIF2 $\alpha$  i comporta una inhibició global de la traducció proteica, alleugerint la demanda al RE (Cnop et al., 2017). eIF2 $\alpha$  també pot ser fosforilada per la PKR (*double-stranded RNA-activated protein kinase*) activada en resposta a infecció viral, per la GCN2 (*general control nonderepressible 2*) activada per falta



## INTRODUCCIÓ

---

d'aminoàcids i per l'HRI (*heme-regulated inhibitor*) activada per manca d'hemo (Chevet et al., 2015; McQuiston and Diehl, 2017).

La inhibició d'eIF2 $\alpha$  per PERK, malgrat reduir la traducció general de la cèl·lula, permet la traducció selectiva d'alguns mRNA que contenen ORF curts a la regió 5'-UTR, com el del factor de transcripció ATF4 (traducció cap-independent) (Han et al., 2013). En primer lloc, ATF4 posa en marxa l'expressió de gens adaptatius implicats en plegament de proteïnes, metabolisme d'aminoàcids, autofàgia i factors anti-apoptòtics (cIAP1 i cIAP2). Si l'estrès persisteix s'activa l'expressió de factors de transcripció que activen programes gènics que defineixen supervivència o mort cel·lular, com ara CHOP (*C/EBP homologous protein*) (Marciniak et al., 2004; Walter and Ron, 2011). A través de CHOP, l'eix de PERK també induïx l'expressió de GADD34 (*growth arrest and DNA-damaged-inducible protein 34*) que exerceix de regulador negatiu de la via a través de la seva associació a PP1c (proteïna fosfatasa 1c) que desfosforila i activa eIF2 $\alpha$  (Novoa et al., 2001; Tsaytler et al., 2011).

ATF4 i CHOP són dos membres de la família de factors de transcripció bZIP (*basic leucine zipper*), que regulen l'expressió de la pseudoquinasa TRIB3 interaccionant amb la regió C/EBP-ATF del promotor del gen de TRIB3 (Ohoka et al., 2005; Kilberg et al., 2009). La mateixa TRIB3 forma part d'un circuit de *feedback* negatiu. TRIB3 s'uneix als dominis de transactivació d'ATF4 i CHOP i les inhibeix, i fa el mateix així amb la seva pròpia expressió. Si els nivells d'estrès reticular són moderats, TRIB3 es manté en nivells baixos al regular negativament l'eix de senyalització PERK-ATF4-CHOP-TRIB3 (Jousse et al., 2007). Si, per contra, l'estrès reticular és intens i sostingut, la sobreexpressió continuada de TRIB3 induïx autofàgia i apoptosi. La pseudoquinasa TRIB3 s'uneix a Akt i bloqueja la seva activació per PDK1 i mTORC2, inhibint l'eix Akt/mTORC1. La inhibició d'Akt té com a conseqüència l'activació de les proteïnes pro-apoptòtiques FoxO3 i Bad (*Bcl-2-associated death promoter*) (McCullough et al., 2001; Zou et al., 2009). El factor de transcripció FoxO3 regula l'expressió de gens pro-apoptòtics com Bim i PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), que col·laboren amb l'activació de Bad per inhibir les proteïnes anti-apoptòtiques Bcl-2 i Bcl-xL, activant apoptosi mediada per Bax/Bak (*Bcl-2-like protein 4/Bcl-2 homologous antagonist-killer*) (Rutkowski et al., 2006; Zou et al., 2009). Per altra banda, la inhibició del complex mTORC1 comporta l'activació d'ULK (proteïna iniciadora de la formació de l'autofagosoma) i inducció d'autofàgia (Salazar et al., 2009a; Manning and Toker, 2017). La via de degradació per autofàgia en el si de la resposta UPR participa de la degradació d'agregats proteïcs que no poden ser eliminats via sistema ERAD. Tanmateix, l'activació continuada d'autofàgia deguda a un estrès reticular persistent compromet la viabilitat cel·lular. La via de senyalització iniciada per PERK té una clara funció protectora, però si l'estrès reticular persisteix, activa programes de mort cel·lular (Gozuacik et al., 2008; Avril et al., 2017).

El calci present al RE també juga un paper regulador en el context de la resposta UPR. Les seves funcions es poden resumir en tres vies d'actuació: cofactor de les proteïnes xaperones calnexina i calreticulina per afavorir el plegament proteic i el control de qualitat, modulador bioenergètic durant la fase adaptativa, i factor pro-apoptòtic a nivell mitocondrial (Carreras-Sureda et al., 2017).

### 3.2- Estrès reticular en càncer

En el microambient tumoral diversos factors com la hipòxia o la deprivació de nutrients, entre d'altres, posen al límit la maquinària cel·lular. L'acumulació de mutacions, conjuntament amb la necessitat contínua de síntesi proteica comporta l'afectació del procés de plegament de proteïnes i la inducció d'estrès reticular a les cèl·lules tumorals (Ma and Hendershot, 2004; Yadav et al., 2014). L'activació de la resposta UPR manté funcional el RE i confereix capacitat de supervivència, creixement i quimioresistència a les cèl·lules canceroses. Aquest fenomen és possible gràcies a la cooperació de les vies UPR amb oncogens de les cèl·lules tumorals. Malgrat que una resposta UPR mantinguda en el temps pot conduir a la mort cel·lular, les cèl·lules canceroses tenen estratègies per bloquejar els senyals pro-mort i emprar únicament les vies amb una finalitat adaptativa (Avril et al., 2017).

A través de la utilització de la resposta UPR, la cèl·lula tumoral incrementa la capacitat biosintètica del RE i permet respondre a l'elevada demanda de síntesi proteica per sostenir la proliferació tumoral. Per altra banda, a les cèl·lules tumorals s'hi pot produir l'anomenat estrès reticular transmissible, procés pel qual les cèl·lules del tumor transmeten la senyalització UPR a les cèl·lules endotelials i cèl·lules dendrítiques adjacents per induir angiogènesi (Mahadevan et al., 2011; Vandewynckel et al., 2013). En alguns tipus de càncer s'ha caracteritzat la modulació de la resposta UPR sobreactivant els eixos de senyalització regulats per IRE1 i ATF6, que tenen un paper predominantment adaptatiu (Bruchmann et al., 2013; Tay et al., 2014).

**Eix ATF6.** Les alteracions en aquesta via de la resposta UPR s'han descrit sobretot en càncers hepàtics. La sobreactivació de l'eix d'ATF6 degut a la seva sobreexpressió té com a principal objectiu incrementar l'expressió de la xaperona BiP, que potencia la maquinària de plegament proteic del RE (Wu et al., 2014). També s'han descrit sobreexpressions basals de BiP en alguns tumors (Shuda et al., 2003). L'increment en els nivells de la xaperona BiP també actua bloquejant l'apoptosi a través de la inhibició de Bax (Ranganathan et al., 2006) i prevenint l'activació de la caspasa-7 (Reddy et al., 2003).

**Eix IRE1.** S'han associat càncers d'ovari, pulmó, fetge o cervell amb mutacions en IRE1 i efectors (Greenman et al., 2007). Quan l'estrès reticular és de baixa intensitat, la branca de senyalització d'IRE1 activa mecanismes adaptatius. Ara bé, si l'estrès és intens i perllongat també pot activar efectors pro-apoptòtics a través del reclutament de TRAF2 que promou l'activació de la quinasa JNK2 (Jain, 2017). Per evitar-ho, les

## INTRODUCCIÓ

---

cèl·lules tumorals presenten una versió mutada de TRAF2, que és incompetent per activar JNK2 (Thomas GS et al., 2009; Shen et al., 2015). La diana principal d'IRE1, XBP1, també contribueix a la supervivència i progressió tumoral. La seva sobreexpressió està reportada en càncer de pulmó, mama, pàncrees i mieloma múltiple, entre d'altres. En aquesta línia, s'ha descrit que la *down*-regulació de XBP1 afecta de forma negativa el creixement del tumor (Fujimoto et al., 2003; Koong et al., 2006). En glioblastoma multiforme, l'activitat endoribonucleasa d'IRE1 també participa en processos d'invasió tumoral regulant la proteïna de matriu extracel·lular SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*), implicada en remodelació de matriu extracel·lular i adhesió cel·lular (Dejeans et al., 2012).

**Eix PERK.** La branca de PERK és la que disposa de dos tipus de senyalització més marcades, una de pro-supervivència i una de pro-mort. La cèl·lula tumoral bloqueja efectors de mort cel·lulars com ara CHOP, que està delecionada en alguns tipus de càncer (Huber et al., 2013). En condicions d'hipòxia, usuals en el context tumoral, la sobreactivació de la via PERK-ATF4 promou la síntesi de VEGF, factor inductor d'angiogènesi (Blais et al., 2006; Wang et al., 2012). L'expressió de VEGF també pot ser augmentada per la via IRE1 de forma hipòxia-independent (Pereira et al., 2010). En aquest sentit, s'ha mostrat que l'activació de PERK està relacionada amb metàstasi, a través de la promoció d'EMT (transició epitelial-mesènquima) i invasió (Avivar-Valderas et al., 2011; Mujic et al., 2013).

La resposta UPR no tan sols és aprofitada per les cèl·lules tumorals per superar les agressions microambientals pròpies de la fisiologia de l'organisme sinó que també és un mecanisme de quimioresistència. Fins al moment, s'han establert correlacions entre l'activació de la resposta UPR i adquisició de resistència a tractaments amb taxols, platins o teràpia hormonal (Avril et al., 2017). Malgrat tot, encara se n'han de caracteritzar els mecanismes moleculars subjacents. En estudis en pacients amb càncer de mama tractades amb tamoxifè s'ha observat que l'increment en els nivells de XBP1 (eixos ATF6 i IRE1) està associat amb menys temps de supervivència (Andruska et al., 2015). Així mateix, la sobreexpressió de BiP s'ha relacionat amb un menor temps lliure de recurrència en pacients tractades amb doxorubicina (Lee et al., 2011). En models cel·lulars de càncer de mama resistents s'ha determinat que la xaperona BiP suprimeix l'apoptosi induïda per doxorubicina a través de la inhibició de BAX i caspasa-7 (Lee et al., 2006). Així mateix, la resistència d'aquests models de càncer de mama a teràpies endocrines com el fulvestrant o tamoxifè es basa en la interacció de diferents mecanismes cel·lulars, com ara l'activació UPR, autofàgia, i apoptosi (Parmar et al., 2013; Cook et al., 2014). En tots els casos, els mecanismes de resistència necessiten la cooperació de la senyalització UPR amb la modulació d'altres funcions, com ara el bloqueig de l'apoptosi o inducció d'autofàgia, per configurar estratègies efectives (Avril et al., 2017).

L'activació de la resposta UPR en resposta a teràpies antitumorals també s'ha observat a les cèl·lules normals que conformen l'estroma del tumor. A les cèl·lules endotelials procedents de carcinoma escamós

oral, s'ha observat la sobreexpressió de les proteïnes BiP, ATF4 i CHOP (Visioli et al., 2014). Experiments en què es mimetitzen les condicions del microambient tumoral (condicions àcídiques severes i hipòxia) han demostrat que les cèl·lules endotelials *up*-regulen BiP, activen mecanismes anti-apoptòtics i esdevenen resistents al tractament amb sunitinib, un fàrmac antiangiogènic. La deleció de BiP torna a sensibilitzar les cèl·lules al tractament (Visioli et al., 2014).

Malgrat que les funcions de la resposta UPR en la progressió tumoral i resistència farmacològica encara no es coneixen amb profunditat, sí que se sap que la inducció crònica d'estrès reticular intens promou mort cel·lular. Les aproximacions terapèutiques contempnen dues estratègies: (1) potenciar l'acumulació de proteïna mal plegada al RE per induir un estrès reticular sever que comporti mort cel·lular, i (2) inhibir les vies adaptatives i pro-supervivència de la resposta UPR, incrementant la sensibilitat de les cèl·lules tumorals a les teràpies antitumorals (Yadav et al., 2014). Les cèl·lules tumorals, contràriament a les sanes, tenen alta dependència de la resposta UPR per assegurar la seva supervivència. Aquest fet, atorga a l'estratègia de modulació de l'estrès reticular i resposta UPR un major grau de selectivitat respecte de les cèl·lules sanes, que no presenten activació basal de la resposta UPR.

#### **4- Autofàgia**

L'autofàgia és un procés cel·lular altament conservat que juga un paper primordial en el manteniment de l'homeòstasi cel·lular a través de la degradació i reciclatge de components intracel·lulars, tals com agregats de proteïna, orgànuls no funcionals o fins i tot patògens (Parzych and Klionsky, 2014). Aquesta funció cel·lular es compon de múltiples processos catabòlics que en determinades situacions fisiològiques (manca de nutrients, estrès cel·lular, hipòxia, entre d'altres) són regulats amb precisió i acaben transferint macromolècules i orgànuls de forma selectiva o no als lisosomes per a la seva degradació. Els lisosomes són els orgànuls degradatius principals a la cèl·lula i contenen un ampli ventall d'hidrolases àcídiques per a aquest efecte. Es defineixen tres tipus d'autofàgia: macro-autofàgia, micro-autofàgia i autofàgia mediada per xaperones. La macro-autofàgia es caracteritza per la formació de vesícules de doble membrana anomenades autofagosomes que es fusionaran amb lisosomes per degradar el seu contingut (Klionsky and Ohsumi, 1999; Glick et al., 2010). La micro-autofàgia consisteix en la invaginació de la membrana lisosomal o endosomal que inclou directament components citosòlics que són degradats per les proteases lisosomals (Mijaljica et al., 2011). Per últim, l'autofàgia mediada per xaperones és un sistema dirigit a la degradació selectiva de proteïnes que contenen el motiu KFERQ que és reconegut per la xaperona HSC70 (*heat shock cognate 70 kDa*). HSC70 promou la translocació d'aquestes proteïnes al lumen lisosomal a través del receptor LAMP2A (*lysosomal-associated membrane protein 2A*), on són degradades (Orenstein et al., 2010).

## INTRODUCCIÓ

---

Malgrat que la macro-autofàgia (referida com a autofàgia a partir d'ara) degrada primordialment contingut citoplasmàtic a l'engròs de forma inespecífica, també pot ser un procés de degradació selectiva de components citosòlics com ara agregats de proteïnes ubiquitinades o orgànuls deteriorats. Per descriure el procés autofàgic de degradació selectiva d'alguns orgànuls s'empren terminologies específiques com mitofàgia (mitocondris), reticulofàgia (RE), pexofàgia (peroxisomes) o agregfàgia (agregats de proteïnes) (Parzych and Klionsky, 2014).

### 4.1- Mecanismes moleculars de l'autofàgia i la seva regulació

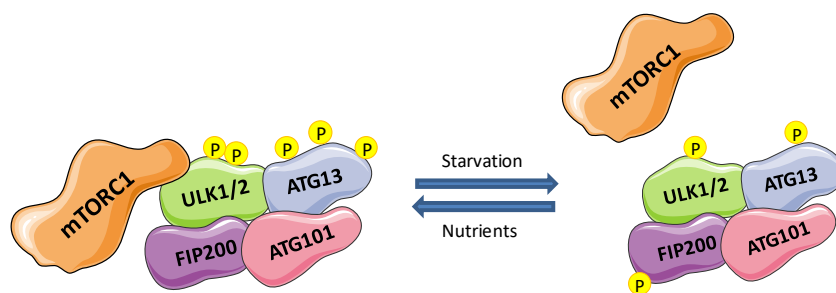
L'any 1955 Christian de Duve va descriure per primera vegada com a "autofàgia" les estructures que havia visualitzat al microscopi electrònic (de Duve et al., 1955; de Duve and Wattiaux, 1966). Eren vesícules de membrana senzilla o doble que contenien components del citoplasma, incloent orgànuls en diversos graus de desintegració. Des d'aquell moment es van succeir els estudis morfològics dels autofagosomes però no va ser fins a finals dels anys 90 que va començar l'era molecular de l'autofàgia. La comprensió de les bases moleculars de l'autofàgia s'assolí analitzant llevats (genèticament més senzills), model en el qual Yoshinori Ohsumi havia observat estructures vesiculars similars a les descrites a cèl·lules de mamífer (Takeshige et al., 1992). Gràcies a estudis de cribratge de mutants (*Saccharomyces cerevisiae*) per l'autofàgia, es van identificar els gens ATG (*autophagy related*), començant l'any 1997 amb l'ATG1 i identificant l'ATG31 l'any 2007 (Tsukada and Ohsumi, 1993; Matsuura et al., 1997; Kabeya et al., 2007). La recerca feta en llevat va permetre la identificació dels gens ATG en eucariotes superiors, i es va constatar que l'autofàgia és un procés altament conservat. Tanmateix, les bases establertes en llevat segueixen sent a dia d'avui les més detallades i compreses.

El procés de formació de l'autofagosoma presenta unes característiques úniques que divergeixen de forma substancial de la dinàmica d'altres sistemes de transport vesicular a la cèl·lula. Les vesícules estàndard (uns 0.1 µm) presenten una única bicapa lipídica i es formen per brotació a partir de membranes d'orgànuls pre-existents (RE, complex de Golgi, endosomes), mentre que els autofagosomes (0.5-1.5 µm) presenten doble bicapa lipídica i són sintetitzats *de novo* al citoplasma en resposta a estímuls pro-autofàgics (Kaur and Debnath, 2015).

En llevat, la formació de l'autofagosoma s'inicia en una única regió perivacuolar anomenada PAS (*phagophore assembly site*), tant en processos de degradació selectius com no-selectius (Chen and Klionsky, 2011). A la cèl·lula de mamífer, en canvi, la generació de l'autofagosoma s'inicia en múltiples localitzacions del citoplasma. Diversos estudis han hipotitzat que estructures associades al RE, anomenades omegasomes, podrien fer aquesta funció de llocs d'iniciació. L'estructura inicial que es forma per expansió de membrana a partir del punt d'iniciació s'anomena fagofor (Itakura and Mizushima, 2010). Diversos estudis han descrit

que la membrana plasmàtica (Ravikumar et al., 2010), el RE (Hayashi-Nishino et al., 2009), el complex de Golgi (Takashi et al., 2011) i els mitocondris (Hailey et al., 2010), podrien ser les fonts de membrana per a la formació del fagofor. Els processos que regulen l'estructuració de la membrana en l'autofàgia no-selectiva encara no es coneixen, però sí que s'han estudiat abastament els mecanismes subjacents a la formació de la vesícula per l'autofàgia selectiva, que es genera al voltant dels components a degradar. El procés és molt complex i requereix el reclutament coordinat de múltiples proteïnes Atg (Mizushima et al., 2011). Les fases de formació de l'autofagosoma són:

**Inducció.** En llevat, la proteïna Atg1 activa interacciona amb Atg13 i Atg17. Aquest complex trimèric promou el reclutament de diverses proteïnes Atg a la regió d'iniciació PAS que són bàsiques per a la formació del fagofor. A la cèl·lula de mamífer el complex trimèric està format per la serina/treonina quinasa ULK1 o ULK2 (Unc-51-like kinase family; homòlegs d'Atg1), Atg13 (homòleg d'Atg13), Atg101, i FIP200 (*focal adhesion kinase family kinase-interacting protein 200 kDa*) (Hara et al., 2008; Mercer et al., 2009). En condicions de disponibilitat de nutrients mTORC1 és actiu i fosforila i inactiva ULK i Atg13, impeding la formació d'un complex estable. En condicions de manca de nutrients, mTORC1 està inhibït i ULK pot interaccionar amb Atg13 i FIP200, fosforilant-les i estabilitzant el complex iniciador de la formació del fagofor (Hosokawa et al., 2009; Ganley et al., 2009) (**Figura 8**). Alternativament, s'ha descrit que la proteïna quinasa AMPK, sensor conservat de l'estat energètic de la cèl·lula i regulador negatiu de mTORC1, pot actuar en condicions de deprivació de nutrients i estrès cel·lular directament sobre ULK fosforilant-la i activant-la (Kim et al., 2011).



**Figura 8:** El complex d'inducció està format per ULK1/2, ATG13, FIP200 i ATG101. En condicions de disponibilitat de nutrients el complex mTORC1 fosforila i inactiva ULK1/2 i ATG13. Quan manquen nutrients, la inhibició de mTORC1 resulta en l'activació d'ULK1/2, que fosforila ATG13 i FIP200, i estabilitza el complex. Figura modificada de Parzyck i Klionsky. *An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. Antioxidants & Redox Signaling 2014.*

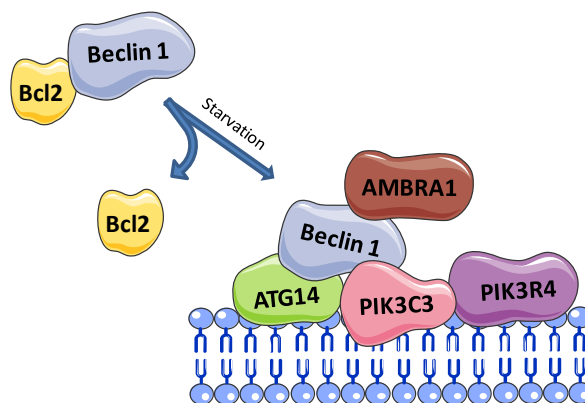
## INTRODUCCIÓ

---

**Nucleació.** Ja activada l'autofàgia, es recluta el complex Atg14-PI3K, generador de fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P), necessari per dur a terme el procés de nucleació de l'autofagosoma tant en mamífers com en llevats (Burman and Ktistakis, 2010; Matsunaga et al., 2010). En mamífers el complex està format per l'associació de la PI3K de classe III Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), la serina/treonina quinasa p150 (Vps15 en llevat) i Beclina 1 (Vsp30/Atg6 en llevat), a Atg14 (Kihara et al, 2001). Alguns autors descriuen que el complex, a més d'associar-se a Atg14 per participar en l'autofàgia, també pot interaccionar amb la proteïna UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene protein*) i participar en la via endocítica (Liang et al., 2008). UVRAG està implicada en el manteniment de l'estabilitat cromosòmica i desenvolupa un paper supressor de tumors (Zeng et al., 2006; Itakura et al., 2008).

La regulació del complex Atg14-PI3K està controlada a través de la interacció de proteïnes amb Beclina 1. La proteïna anti-apoptòtica Bcl-2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2*) s'uneix a Beclina 1 i evita la seva interacció amb Vps34, inhibint l'autofàgia (Liang et al., 1999; Liang et al., 2008). En canvi, Ambra1 s'uneix a Beclina 1 i la regula positivament permetent la formació del complex (Fimia et al., 2007) (**Figura 9**). La proteïna Bif-1 també interacciona amb Beclina 1 a través d'UVRAG i es creu que està implicada en la generació de la curvatura de la membrana de l'autofagosoma (Takahashi et al., 2007; Takahashi et al., 2009). En llevat, la generació de PI3P promou el reclutament de les proteïnes Atg18, Atg20, Atg21 i Atg24 al PAS. Atg18 i Atg21 són essencials per a la formació del fagofor (Krick et al., 2008). WIPI1 i WIPI2 són els ortòlegs de mamífer d'Atg18, i s'associen a omegasomes rics en PI3P juntament amb la proteïna ZFYVE1/DFCP1 (*zinc finger FYVE domain containing 1*) (Jeffries et al., 2004; Polson et al., 2010). Les funcions precises d'aquestes proteïnes encara no es coneixen. Els ortòlegs d'Atg20 i Atg24 encara no s'han caracteritzat.

Encara no està ben definit quin és el mecanisme de reclutament del complex Atg14-PI3K, promotor de la nucleació de l'autofagosoma, un cop s'ha activat el complex inductor ULK-Atg13-Atg101-FIP200. S'ha descrit que el complex Atg14-PI3K està associat al citoesquelet a través de la interacció d'Ambra1 amb les cadenes lleugeres de la dineïna (Di Bartolomeo et al., 2010). Un cop induïda l'autofàgia, ULK fosforilaria Ambra1 que es dissociaria de la dineïna i es relocallitzaria al RE per permetre la nucleació de l'autofagosoma (Axe et al., 2008).



**Figura 9: El complex de nucleació ATG14 està regulat per Bcl2 i AMBRA1.** El complex ATG14 (ATG14-Beclina 1-PIK3C3-PIK3R4) s'associa al reticle endoplasmàtic per permetre la nucleació de l'autofagosoma. El complex és regulat negativament per Bcl-2 i positivament per AMBRA1. Figura modificada de Parzyck i Klionsky. *An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. Antioxidants & Redox Signaling* 2014.

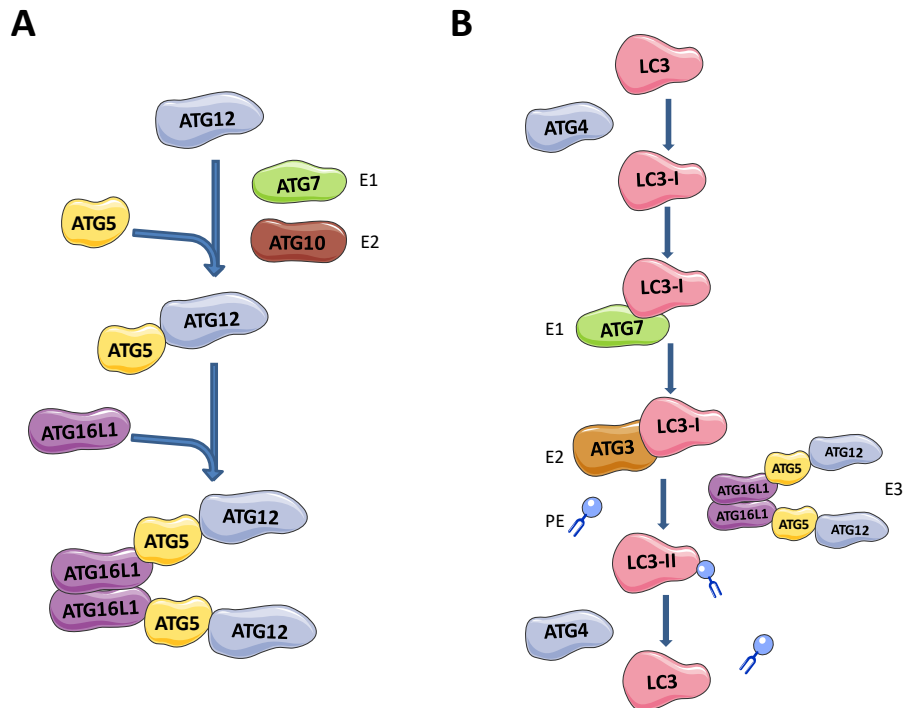
**Elongació.** Tant en llevat com en cèl·lula de mamífer hi ha dos sistemes de conjugació en què hi ha implicades proteïnes UBL (*ubiquitin-like*) que participen del procés d'elongació (Ohsumi., 2001). En el cas del llevat el primer sistema implica la formació del complex Atg12-Atg5-Atg16. La proteïna UBL Atg12 es conjuga covalentment a una lisina interna d'Atg5 gràcies a l'activitat d'Atg7 (enzim E1, activador) i d'Atg10 (enzim E2, conjugació) (Geng and Klionsky, 2008). Aquest procés difereix de la ubiquitinació pel fet de ser una conjugació irreversible i no requerir enzim E3 lligasa. Un cop unides Atg5 i Atg12, Atg16 s'associa a Atg5 de forma no covalent i interacciona amb proteïnes Atg16 d'altres trímers Atg16-Atg5-Atg12, formant estructures multimèriques (principalment tetràmers, 4 trímers Atg16-Atg5-Atg12) (**Figura 10A**). El tetràmer s'associa a la membrana del fagofor i no se'n dissociarà fins a completar-se la formació de l'autofagosoma (Kuma et al., 2002; Mizushima et al., 2003). Els ortòlegs en mamífer són Atg5, Atg12 i Atg16L1 i funcionen de forma anàloga a les proteïnes de llevat. La regulació d'aquest sistema pot estar mediada per acetilacions inhibidores a Atg5, Atg7 i Atg12, per part de l'acetiltransferasa KAT2B/p300. La proteïna del complex de Golgi RAB331 també pot inhibir Atg16L1 unint-se a ella (Itoh et al., 2008; Parzych and Klionsky, 2014).

El segon sistema de conjugació és l'Atg8-fosfatidiletanolamina, que forma una estructura que es va expandint per formar l'autofagosoma. En llevat, aquest sistema s'inicia amb el processat de la proteïna UBL Atg8 (coneguda com a LC3 en cèl·lula de mamífer) per part de la cisteïna proteasa Atg4, fet que comporta que quedi exposat un residu glicina carboxiterminal d'Atg8 (Geng and Klionsky, 2008). A continuació, Atg7, el mateix enzim E1 implicat en el primer sistema, activa i transfereix Atg8 a l'enzim E2 Atg3. El residu glicina d'Atg8 és conjugat per enllaç amida al lípid de membrana fosfatidiletanolamina (PE), en un procés facilitat per l'activitat del complex Atg12-Atg5 que actua com a E3 lligasa (Ichimura et al., 2000; Hanada et al.,



## INTRODUCCIÓ

2007). La unió Atg8-PE pot revertir-se per l'acció proteolítica d'Atg4, tot i que se'n desconeix el mecanisme de regulació (Kirisako et al., 2000; Nair et al., 2012) (Figura 10B).



**Figura 10: Sistemes de conjugació implicats en el procés d'elongació.** A, Les proteïnes ATG7 (enzim E1, activador) i ATG10 (enzim E2, conjugació) medien en la conjugació d'ATG5 a ATG12. A continuació ATG16L1 s'associa a ATG5 per formar trímers que oligomeritzen amb altres trímers. El complex multimèric presenta activitat E3 lligasa. B, La cisteïna proteasa ATG4 processa LC3 i queda exposat un residu glicina carboxiterminal. A continuació, les proteïnes ATG7 (enzim E1), ATG3 (enzim E2) i el complex multimèric ATG5-ATG12 (enzim E3 lligasa) conjuguen LC3-I al lípid de membrana fosfatidiletanolamina (PE) i generen LC3-II. La unió LC3-PE pot revertir-se per l'acció proteolítica d'ATG4. Figura modificada de Parzycki i Klionsky. *An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. Antioxidants & Redox Signaling 2014.*

En mamífers, el procés és molt semblant al descrit en llevats però hi ha 4 isoformes d'Atg4 i diverses proteïnes semblants a Atg8, que es subdivideixen en les subfamílies LC3 i GABARAP. Es creu que ambdues subfamílies participen en diferents etapes del procés d'elongació del fagofor. D'entre les proteïnes semblants a Atg8 la més ben caracteritzada és LC3. La forma de LC3 processada per Atg4 és coneguda com a LC3-I, mentre que la LC3 conjugada a PE s'anomena LC3-II (Kabeya et al., 2004; Weidberg et al., 2010). La lipidació de la proteïna LC3 en les cèl·lules de mamífer és utilitzada com un marcador per monitoritzar la inducció d'autofàgia. S'ha proposat que Atg8/LC3 controla la curvatura i mida de l'autofagosoma, de

manera que la quantitat de proteïna Atg8/LC3 determinarà les dimensions de l'autofagosoma (Xie et al., 2008).

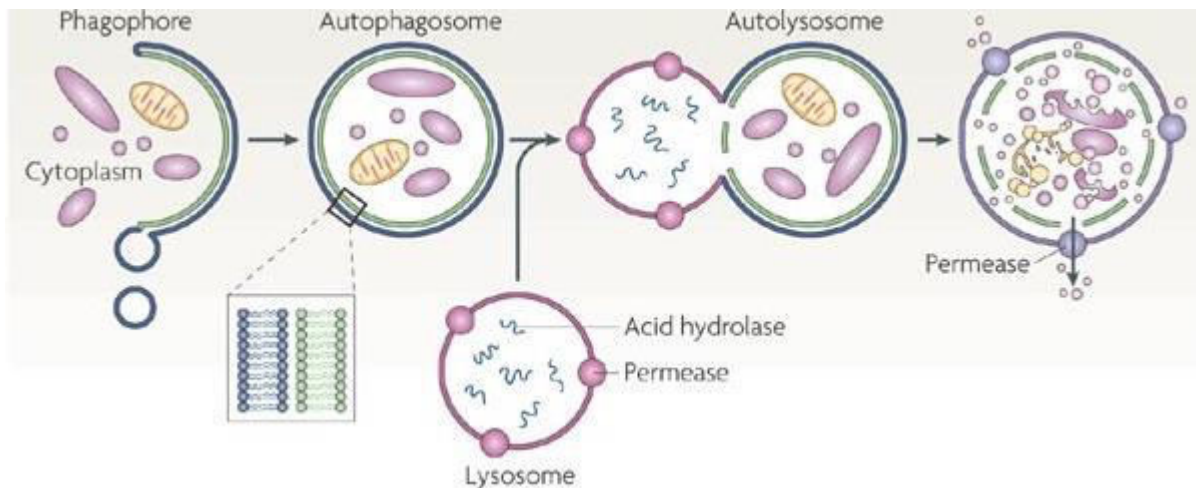
Una altra proteïna que es creu que està implicada en l'elongació és Atg9. En llevat, aquesta proteïna transmembrana circula entre el PAS i altres compartiments cel·lulars. Aquestes regions alternatives es coneixen com a TVCs (*tubulovesicular clusters*) (Mari et al., 2010). El moviment d'Atg9 està regulat pel complex Atg1, així com per la multimerització d'Atg9. La localització dinàmica d'Atg9 i la seva capacitat per multimeritzar són necessàries per a la formació de l'autofagosoma, i es creu que la seva contribució es basa en el reclutament de membrana al fagofor en expansió (Reggiori et al., 2004; Mari et al., 2010). En mamífers l'homòleg d'Atg9 actua de la mateixa manera, en condicions basals es localitza a Golgi i endosomes, mentre que en cas de privació de nutrients Atg9 co-localitza amb marcadors d'autofagosoma (Young et al., 2006; Webber and Tooze, 2010).

**Finalització i fusió.** La maduració de l'autofagosoma és l'etapa de l'autofàgia més desconeguda. El fagofor en expansió ha de tancar-se i formar l'autofagosoma madur però no se n'han descrit els mecanismes subjacents. En llevat s'ha descrit que la dissociació d'Atg8/LC3 de l'autofagosoma és necessària per permetre la seva fusió amb els lisosomes (Vergne et al., 2009). Atg4 actua hidrolitzant l'enllaç de l'Atg8 amb la PE. Per altra banda, és essencial l'acció de fosfatases de fosfoinosítids que hidrolitzen els PI3P de la membrana de l'autofagosoma i alliberen altres proteïnes Atg (Kaur and Debnath, 2015; Nakamura and Yoshimori, 2017).

L'autofagosoma madur ha de desplaçar-se i fusionar-se amb endosomes i/o lisosomes, per generar l'autolisosoma que degradarà el seu contingut. Els autofagosomes es poden formar en regions diverses del citoplasma, mentre que els endosomes i lisosomes es troben de forma predominant a la regió perinuclear. El desplaçament dels autofagosomes fins a aquesta localització depèn dels microtúbuls (Monastyrska et al., 2009; Nakamura and Yoshimori, 2017). Un cop a la regió perinuclear, la fusió està mediada per tres famílies de proteïnes diferents: les GTPases Rab, complexos d'ancoratge a membrana, i proteïnes SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*). Les proteïnes Rab es localitzen a les membranes vesiculars i recluten complexos proteics d'ancoratge que exerciran dues funcions: fer d'estructura pont entre les vesícules a fusionar, i actuar de plataforma per facilitar l'acció de les proteïnes SNARE, que conduiran el procés de fusió de membranes (Atlashkin et al., 2003; Nakamura and Yoshimori, 2017). En cèl·lules de mamífer el procés de fusió requereix la participació de la proteïna de membrana lisosomal LAMP2, la GTPasa Rab7, i les proteïnes SNARE VAMP7, VAMP9 i VAMP8, tot i que els mecanismes moleculars implicats estan poc caracteritzats (Jager et al., 2004; Fader et al., 2009).

## INTRODUCCIÓ

Un cop format l'autolisosoma, la degradació del seu contingut és dependent d'hidrolases lisosomals àcides, incloent-hi les cisteïna-catepsines (B, C, H, K, L) i aspartil-catepsines (D, E). Els productes generats en el procés de degradació són alliberats al citoplasma i seran emprats per a la síntesi i manteniment de les funcions cel·lulars bàsiques (Kaur and Debnath, 2015) (**Figura 11**).



**Figura 11: Esquema general del procés d'autofàgia.** La inducció d'autofàgia resulta en la generació del fagofor, estructura primària que origina l'autofagosoma (vesícula que presenta doble bicapa lipídica), que conté el material cel·lular a degradar. A continuació, l'autofagosoma es fusiona amb un lisosoma (autolisosoma), que conté les hidrolases que digeriran el contingut de l'autolisosoma. Figura extreta de Klionsky. *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007.

### Autofàgia selectiva

Així com l'autofàgia inespecífica sol ser activada en situacions de manca energètica i/o nutricional com a resposta cel·lular de supervivència, l'autofàgia selectiva té una finalitat més orientada al manteniment de l'homeòstasi cel·lular. La degradació específica de components citoplasmàtics és dependent de receptors de càrrega que interaccionen amb ells a través de senyals de degradació. A les cèl·lules de mamífer, el senyal més comú és la ubiquitina. Els receptors de càrrega disposen a la seva estructura d'un domini d'unió a ubiquitina (UBA, *ubiquitin-associated domain*) i un altre d'unió a Atg8/LC3 que s'anomena regió LIR (*LC3 interacting region*) (Rogov et al., 2014; Stolz et al., 2014). D'aquesta manera, els receptors de càrrega actuen com a ponts moleculars que associen proteïnes ubiquitinades amb la via autofàgica, complementant d'aquesta manera el sistema ubiquitina-proteasoma. Alguns receptors de càrrega típics a la cèl·lula mamífer són p62 (també coneguda com a SQSTM1, *sequestrome-1*) (Bjorkoy et al., 2005; Zheng et al., 2009), NBR1 (*neighbor of BRCA1 gene 1 protein*) (Kirkin et al., 2009; Lamark et al., 2009) i HDAC6

(*histone deacetylase 6*) (Lee et al., 2010). L'autofàgia selectiva és especialment rellevant en l'eliminació d'agregats proteics i d'òrgans deteriorats o superflus (**Caixa 2**).

#### 4.2- Regulació de l'autofàgia

L'autofàgia té un paper fonamental en les respostes adaptatives de la cèl·lula davant d'estressos cel·lulars de diferent índole, tals com la manca de nutrients, la hipòxia o l'estrès reticular. L'efector central de la seva regulació és el complex mTORC1, que actua com a sensor integrant vies de senyalització activades per diferents estímuls (Saxton and Sabatini, 2017). En condicions que propicien el creixement cel·lular, el complex mTORC1 és actiu, promou la síntesi proteica i manté inhibida l'autofàgia a través de la fosforilació de la Ser757 d'ULK (Jung et al., 2009; Shang et al., 2011).

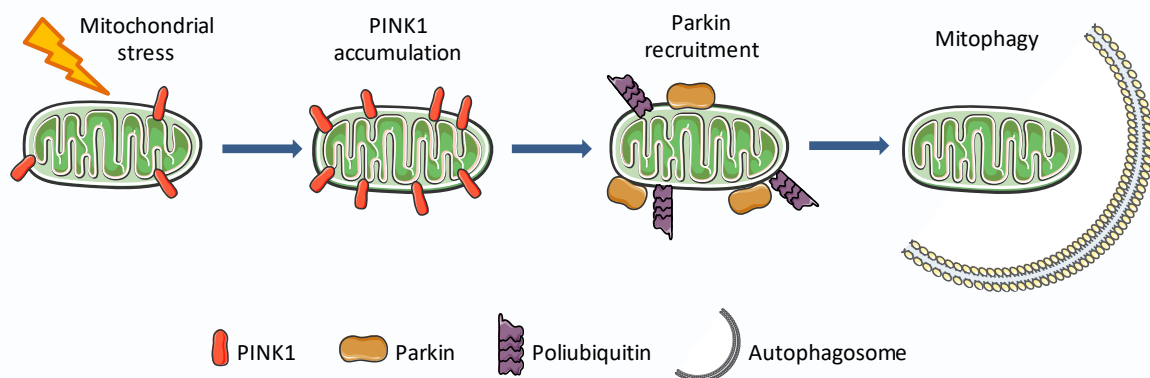
**Promoció d'autofàgia en funció de l'estatus nutricional cel·lular.** L'alteració de determinats paràmetres en situacions de privació de nutrients indueix la inhibició de mTORC1, que resulta en l'activació d'autofàgia que permet mantenir les funcions cel·lulars bàsiques. Un dels millors indicatius de l'estat energètic de la cèl·lula és la ràtio ATP/AMP. En casos com ara la privació de glucosa, la ràtio energètica disminueix i activa l'AMPK, el principal sensor de l'estat energètic de la cèl·lula (Shaw et al., 2004). L'activació d'AMPK té com a conseqüència la inhibició de mTORC1 i la subseqüent activació d'autofàgia. La inactivació de mTORC1 ve donada pel fet que AMPK activa TSC2 (inhibidora de mTORC1) mitjançant la fosforilació en els residus Thr1227 i Ser1345 (Inoki et al., 2003), i per un altre costat AMPK inhibeix Raptor per fosforilació dels residus Ser722 i Ser792 (Gwinn et al., 2009). Alternativament, AMPK pot activar directament l'autofàgia a través de l'activació d'ULK, mitjançant la fosforilació dels residus Ser317 i Ser777 (Kim et al., 2011; Egan et al., 2011).

mTORC1 també actua com a sensor de nivells de nitrogen, essent regulat positivament per la presència d'aminoàcids (Kim and Guan, 2011). Els aminoàcids regulen les proteïnes Rag, GTPases petites relacionades amb Ras, que activen mTORC1. Les Rag són heterodímers formats per RagA o RagB amb RagC o RagD, i estan associades a la membrana lisosomal a través de la interacció amb el complex regulador pentamèric MP1, p14, p18, HBXIP i C7ORF59 (Sanack et al., 2010; Bar-Peled et al., 2012). La presència d'aminoàcids activa les proteïnes Rag, que s'uneixen a Raptor i recluten el complex mTORC1 a la superfície dels lisosomes, on també hi ha la proteïna Rheb. Si les proteïnes Rag i Rheb estan actives, indueixen l'activació de mTORC1. Aquesta via d'activació integra la senyalització procedent de l'estat nutricional de la cèl·lula i la presència de factors de creixement (Zoncu et al., 2011).

## Caixa 2 – Mitofàgia dependent de PINK1/parkina

La mitofàgia consisteix en un procés d'autofàgia selectiva que té com a objectiu la degradació específica de mitocondris. La via canònica de regulació de la mitofàgia està ben definida i està controlada principalment per tres proteïnes: PINK1, parkina i ubiquitina. Alternativament, s'ha descrit una mitofàgia independent de PINK1/Parkina que està regulada per les proteïnes Nix i Bnip3. PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) és una serina/treonina quinasa que conté un senyal de localització mitocondrial que promou el seu reclutament a la membrana externa dels mitocondris. PINK1 actua com a sensor de l'estat dels mitocondris (Matsuda et al., 2010). En condicions normals, PINK1 és importada a l'interior dels mitocondris en un procés dependent de potencial de membrana i de les translocases de membrana externa i interna del mitocondri (TOM i TIM). En el procés, PINK1 és escindida seqüencialment per les proteases PMPCB i PARL fins a ser degradada i es manté així un equilibri en els nivells de PINK1 exposada a la membrana externa (Jin et al., 2010; Meissner et al., 2011). Quan la funcionalitat dels mitocondris està afectada, el potencial de membrana s'altera i la ràtio d'internalització i degradació de PINK1 disminueix. PINK1 s'autofosforila, dimeritza i s'estabilitza a la membrana mitocondrial externa, exposant el seu domini quinasa al citosol. Tot seguit, PINK1 recluta la proteïna Parkina (Matsuda et al., 2010; Lazarou et al., 2012).

Parkina és una proteïna ubiquitina E3 lligasa citosòlica que en condicions basals adopta una conformació tancada que inhibeix la seva activitat (Shlevkov and Schwarz, 2014). PINK1 fosforila la Ser65 de la ubiquitina (monomèrica o poliubiquitina). Algunes de les ubiquitines fosforilades (pUb) per PINK1 es troben ja conjugades a la membrana externa mitocondrial i actuen com a senyal de reclutament de la parkina, que hi interacciona. La unió a pUb indueix un canvi conformacional a la parkina que exposa el domini Ubl (*ubiquitin like*), que serà fosforilat també al residu Ser65 per PINK1 i l'estabilitza (Narendra et al., 2008; Koyano et al., 2014). Un cop activa i localitzada a la membrana mitocondrial externa, la parkina pot ubiquitinar diverses proteïnes i/o generar cadenes a partir de les ubiquitines ja presents (Sarraf et al., 2013; Shlevkov and Schwarz, 2014). La darrera part de la via de mitofàgia és regulada per les proteïnes de càrrega de la maquinària d'autofàgia selectiva. Aquestes proteïnes disposen de dominis d'interacció amb ubiquitina (UBA) i dominis d'interacció amb LC3 (LIR). D'aquesta manera, els mitocondris deteriorats que han sigut marcats amb ubiquitina són dirigits als autofagosomes que mediaran la seva degradació (Youle and Narendra, 2011; Bingol and Sheng, 2016).



**Figura 12: Fases de la via canònica de mitofàgia regulada per PINK1, parkina i ubiquitina.** L'estrès mitocondrial resulta en l'acumulació de la serina/treonina quinasa PINK1 a la membrana mitocondrial externa i el subseqüent reclutament de la ubiquitina E3 lligasa parkina. A continuació, la parkina genera cadenes de poliubiquitina en proteïnes de la superfície mitocondrial que seran reconegudes per proteïnes de càrrega que coordinaran l'associació dels mitocondris marcats amb els autofagosomes que els degradaran.

**Promoció d'autofàgia en resposta a estrès cel·lular.** Condicions d'estrès com ara la manca de factors de creixement o la hipòxia són factors que alteren l'homeòstasi cel·lular. Com a resposta cel·lular adaptativa s'activa l'autofàgia via inhibició mTORC1. Mentre que en el cas dels factors de creixement la seva mancança provoca una baixada en la senyalització de l'eix PI3K-Akt-mTORC1, en el cas de la hipòxia l'activitat de mTORC1 és regulada per REDD1 (*regulated in development and DNA damage*) i REDD2, que inhibeixen mTORC1 indirectament estabilitzant el complex TSC, tot i que els mecanismes implicats es desconeixen (Brugarolas et al., 2004; Sofer et al., 2005).

Altres tipus d'estrès cel·lular promouen autofàgia a través de la resposta UPR. El desequilibri en el sistema cel·lular indueix estrès reticular i activació de les vies UPR. L'eix de PERK controla especialment l'activació d'autofàgia via expressió de TRIB3 i inhibició de l'eix Akt/mTORC1 (Ohoka et al., 2005; Örd and Örd, 2017). Alternativament, la desestabilització del RE provoca un increment del nivell de  $Ca^{2+}$  citosòlic que activa la proteïna CAMKK2 (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*) que subseqüentment activa AMPK per fosforilació al residu Thr172, que inhibeix mTORC1 i activa autofàgia (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007; Fogarty et al., 2010). En aquestes circumstàncies en què els sistemes de degradació ERAD i ubiquitina-proteasoma estan compromesos, l'autofàgia col·labora amb la degradació de proteïnes mal plegades insolubles i d'agregats proteics (Ding et al., 2007; He et al., 2009).

### 4.3- Mort cel·lular mediada per autofàgia

En aquells casos en què les respostes cel·lulars adaptatives són incapaces de revertir la situació, l'autofàgia es presenta com a un mecanisme essencial per eliminar les cèl·lules danyades. La mort cel·lular que implica autofàgia és anomenada mort mediada per autofàgia o mort cel·lular programada de tipus II (l'apoptosi és referida com a tipus I) (Yonekawa and Thorburn, 2014). Les característiques morfològiques i bioquímiques de les morts cel·lulars de tipus I i II són diferents. En el cas de la mort mediada per autofàgia, no hi ha activació de caspases, ni degradació de DNA o fragmentació nuclear aparent. En canvi, s'observa la fragmentació del Golgi i del RE abans de l'eliminació del nucli i també l'acumulació d'autofagosomes. A dia d'avui, hi ha controvèrsia sobre si l'autofàgia és en si mateixa el procés que indueix la mort cel·lular o bé si és un mediador del programa de mort que finalment és executat per apoptosi (Denton et al., 2012; Aredia et al., 2012). La determinació d'aquest tipus de mort es fa seguint dos criteris bàsics: (1) hi ha un increment del flux autofàgic, i (2) el bloqueig farmacològic o genètic de l'autofàgia reverteix la mort (Kroemer and Levine, 2008). Alguns autors inclouen en la definició de mort per autofàgia la necessitat que es produeixi de forma independent a l'apoptosi o necrosi, tot i que aquest criteri és considerat excessiu per d'altres autors (Shen et al., 2011). La caracterització d'aquest tipus de mort no es trivial i requereix la combinació de diverses aproximacions experimentals. La dificultat per assegurar amb evidències científiques que la mort

cel·lular és deguda exclusivament a l'autofàgia ha portat a parlar de “mort mediada per autofàgia”, evitant referir-se a aquest tipus de mort com a “mort per autofàgia” (Levine and Kroemer, 2008; Klionsky et al., 2016).

Apoptosi i autofàgia són dues vies de mort cel·lular interconnectades que compensen en molts casos la inhibició d'una o altra, malgrat que aquesta connexió encara no està ben caracteritzada. Per exemple, les proteïnes membres de la família Bcl-2 poden regular ambdós processos directament. La dissociació de Bcl-2 de Beclin 1 permet la inducció d'autofàgia, i té com a conseqüència un increment de la població de Bcl-2 lliure que interaccionarà amb Bax tot inhibint apoptosi (Shimizu et al., 2004; Gump and Thorburn, 2011). Un altre cas descrit en cèl·lules deficientes en autofàgia és l'acumulació de la proteïna p62, que actuaria promovent la poliubiquitinació, agregació i activació de la caspasa-8, activadora de la via extrínseca d'apoptosi (Lum et al., 2005). En altres casos, s'ha observat que un mateix estímul estressant pot induir diferents tipus de mort en funció de la línia cel·lular tumoral testada (Rubinstein et al., 2012). Els mecanismes subjacents a aquestes diferències es desconeixen. Tanmateix, es creu que el perfil genètic de cada línia n'és un factor determinant (Eisenberg-Lemer et al., 2009; Rubinstein et al., 2012).

#### **4.4- Autofàgia i càncer**

L'autofàgia és un procés amb un paper eminentment adaptatiu, fet que pot ser aprofitat per les cèl·lules tumorals. En l'actualitat, hi ha controvèrsia sobre el paper que desenvolupa l'autofàgia en el context tumoral. Mentre que en etapes primerenques del desenvolupament del tumor s'ha descrit que l'autofàgia actua antagonitzant la proliferació cel·lular, en etapes més avançades pot contribuir a la progressió tumoral essent modulada per sustentar les elevades demandes metabòliques de les cèl·lules canceroses i permetre la seva adaptació a l'estrès a què estan sotmeses, tant el derivat del microambient tumoral com el procedent de tractaments farmacològics (Kondo et al., 2005; Levy et al., 2017).

##### **Autofàgia com a promotor tumoral**

L'aprofitament del flux autofàgic és propi de cèl·lules tumorals ja establertes, que comencen a patir les condicions extremes pròpies de l'ambient tumoral en progressió: manca d'oxigen (Rouschop and Wouters, 2009), nutrients limitats (Onodera and Ohsumi, 2005) i demanda energètica creixent per sostenir l'alta ràtio metabòlica (Rabinowitz and White, 2010). En aquestes circumstàncies l'autofàgia apareix com una resposta cel·lular adaptativa que permet a les cèl·lules tumorals subsistir en condicions extremes. Les cèl·lules Ras-mutades són altament dependents de l'autofàgia, i són anomenades cèl·lules addictes a l'autofàgia. Les mutacions oncogèniques en Ras es troben en aproximadament un 30% dels càncers humans i són tumors amb alt potencial proliferatiu i metastàtic (Guo et al., 2013; Mariño et al., 2011). Diversos estudis han

descriu que aquestes cèl·lules depenen de l'activació d'autofàgia per mantenir el metabolisme oxidatiu i la glucòlisi que sustenten el creixement, la supervivència, la invasió i la metàstasi (Lock et al., 2011; Lock et al., 2014). Contràriament, la capacitat de l'autofàgia de limitar la inflamació i la necrosi, restringeix la metàstasi (Degenhardt et al., 2006).

L'autofàgia també es presenta com una estratègia de les cèl·lules tumorals per evadir l'efecte de diverses teràpies i promoure quimioresistència i supervivència tumoral (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009; Levy et al., 2017). S'ha descrit que fàrmacs com el tamoxifè (Bursch et al., 1996), la temozolamida (Kanzawa et al., 2004), el resveratrol (Opirari et al., 2004), o el triòxid d'arsènic indueixen autofàgia en cèl·lules de càncer de mama, pròstata, colon i glioma maligne (Kanzawa et al., 2005). Així mateix, la radioteràpia també activa autofàgia (Yao et al., 2003; Ito et al., 2005). En molts casos, l'activació de l'autofàgia observada s'ha relacionat amb el desenvolupament de resistència a aquests tractaments. En aquesta línia, s'ha descrit que la combinació d'inhibidors d'autofàgia amb quimioteràpia, radioteràpia, inhibidors de receptors tirosina-quinasa o teràpia hormonal sensibilitza les cèl·lules a aquests tractaments (Paglin et al., 2001; Kanzawa et al., 2003; Ito et al., 2005). La caracterització dels mecanismes subjacents a la manipulació de l'autofàgia en cada cas és de gran rellevància per al disseny d'estratègies terapèutiques efectives.

### **Autofàgia com a supressor tumoral**

Deficiències en l'autofàgia comporten l'acumulació de macromolècules i d'òrgans deteriorats que alteren l'homeòstasi cel·lular i provoquen dany al DNA i inestabilitat de la cromatina, factors clau en l'acumulació de mutacions oncogèniques. Majoritàriament, la inhibició de l'autofàgia a les cèl·lules canceroses rau en la sobre-activació de la via PI3K-Akt-mTORC1, que indueix supervivència i proliferació cel·lular (Manning and Toker, 2017). Seguint en aquesta línia, diversos gens supressors de tumors com ara PTEN (Arico et al., 2001), LKB1, AMPK (Liang et al., 2007), TSC (Parkhitko et al., 2011) o Bif1 (*Bax-interacting factor-1*) (Takashi et al., 2007) són promotors d'autofàgia.

Algunes de les evidències més importants que demostren el rol de l'autofàgia com a supressor de tumors provenen d'estudis realitzats amb la proteïna Beclina 1 (BCN1). Ratolins amb BCN1 delecionat mostren una major incidència de limfoma, càncer de pulmó i càncer de fetge (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003). A més a més, s'han descrit delecions mono-al·lèliques de BCN1 en el 40-75% dels càncers humans de mama, ovari i pròstata (Futreal et al., 1992; Aita et al., 1999; Choi et al., 2013). En consonància amb aquests resultats, el silenciament d'ATG5 provoca l'acumulació d'agregats de la proteïna p62, de mitocondris defectuosos i de proteïnes mal plegades, esdeveniments que indueixen la producció de ROS (*reactive oxygen species*). Com a conseqüència de l'increment de ROS, s'indueix inestabilitat de la cromatina i s'afavoreix l'aparició de mutacions potencialment oncogèniques (Mathew et al., 2007; Mathew et al., 2009).

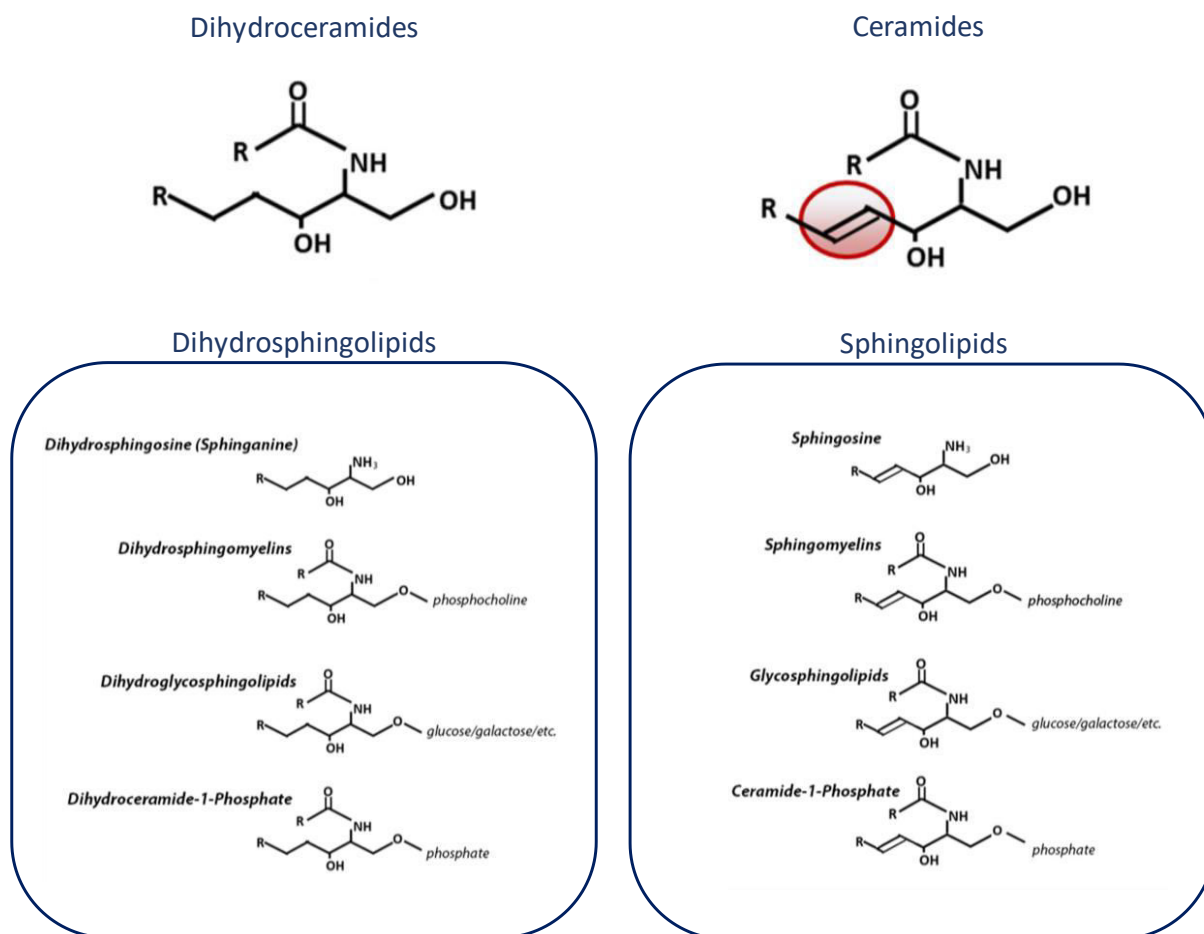


Els últims anys s'ha caracteritzat el mecanisme d'acció de diferents composts amb activitat antitumoral que indueixen citotoxicitat via activació d'autofàgia. L'efecte dels cannabinoides, per exemple, està mediat per l'activació d'autofàgia, que acaba induint apoptosi (Salazar et al., 2009a; Salazar et al., 2009b). Per altra banda, agents moduladors del metabolisme dels esfingolípid, com ara el resveratrol o l'àcid retinoic, exerceixen el seu efecte antitumoral a través de l'acumulació de determinats esfingolípid que activen autofàgia i medien la mort de les cèl·lules tumorals (Signorelli et al., 2009; Rodríguez-Cuenca et al., 2015). La desregulació farmacològica de l'autofàgia s'erigeix com una diana amb potencial antitumoral degut a l'alta dependència de les cèl·lules tumorals d'aquest procés, tant per defecte com per excés.

### 4.5- Autofàgia i esfingolípid

Els importants avenços en l'última dècada en el camp de la lipidòmica han permès una millor comprensió de les propietats biofísiques de les membranes cel·lulars i han comportat un replantejament del rol bioactiu que juguen tant aquestes membranes com els lípids que les conformen. Els esfingolípid són una família àmplia de lípids de membrana que juguen un important paper bioactiu regulant funcions diverses com ara la divisió cel·lular, la diferenciació i la mort (Rao et al., 2013). Malgrat que contribueixen en baixa proporció al *pool* de lípids cel·lulars, variacions en els nivells d'esfingolípid tenen gran rellevància en la funcionalitat cel·lular i estan relacionats amb l'etiologia de diverses malalties, com ara diabetis, malalties neurodegeneratives o càncer (Lahiri and Futerman, 2007).

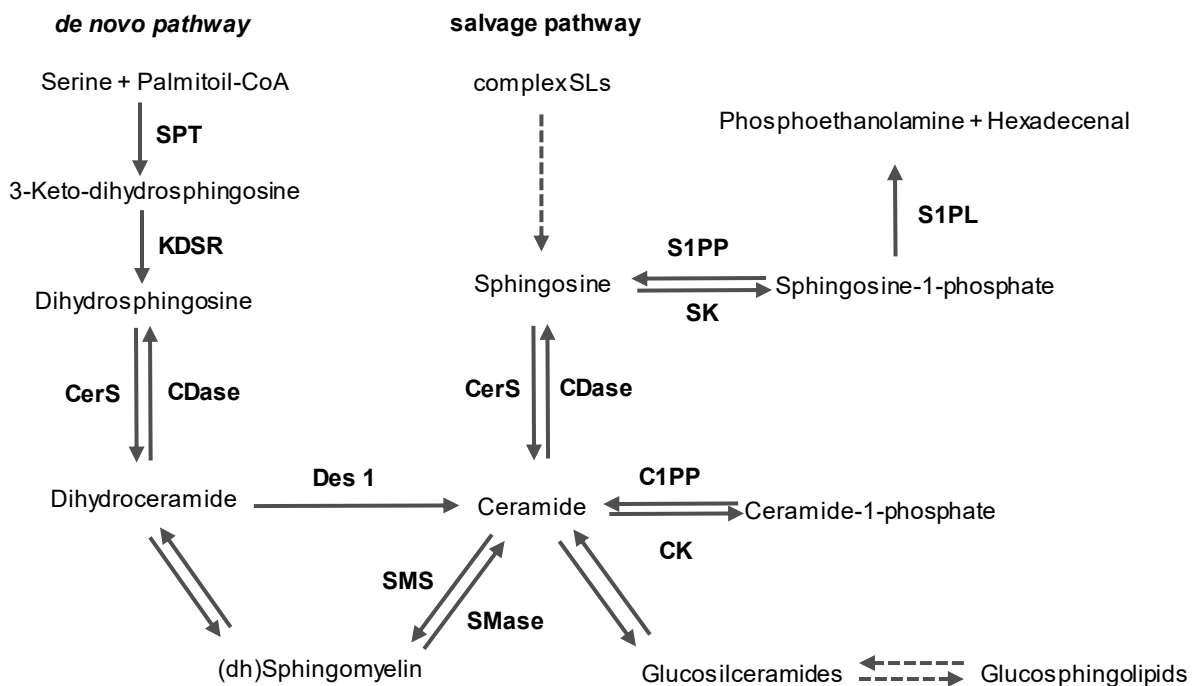
La base estructural dels esfingolípid és una espècie esfingoide de cadena llarga, essent majoritàriament esfingosina o esfinganina (dihidroesfingosina). Es diferencien una de l'altra pel fet que l'esfingosina conté un doble enllaç trans 4-5, que és essencial per a la seva funció senyalitzadora (Brockman et al., 2004; Li et al., 2014). La molècula central esfingosina és *N*-acilada al carboni 2 amb un àcid gras per formar la ceramida, espècie central en la biologia dels esfingolípid. A aquesta molècula de ceramida se li addicionen grups de diferent naturalesa (neutres, carregats, glicosilats, fosforilats) al carboni 1 per a formar els esfingolípid complexos. Els diferents grups conjugats generen regions polars i no-polars, fet que aporta a les molècules un caràcter amfipàtic bàsic per a la seva funció reguladora del metabolisme cel·lular (Menaldino et al., 2003) (**Figura 13**).



**Figura 13: Estructura química dels esfingolípid i dihidroesfingolípid.** La presència d'un doble enllaç trans 4,5 diferencia les ceramides de les dihidroceramides. A partir d'aquestes dues molècules base es generen els dihidroesfingolípid (derivats de la dihidroceramida) i esfingolípid (derivats de la ceramida). Figura modificada de Siddique i col·laboradors. *Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors. The Journal of Biological Chemistry* 2015.

#### 4.5.1- Metabolisme dels esfingolípid

El metabolisme dels esfingolípid està compartimentat i altament coordinat. Aquesta xarxa metabòlica integra diverses vies en què la ceramida fa de nexa, ocupant una posició central tant en el flux biosintètic com en el catabòlic. La ceramida és l'intermediari clau en el metabolisme d'esfingolípid, i com a molècula està implicada en diferenciació cel·lular, senescència, migració, adhesió i apoptosi (Rao et al., 2013). Es distingeixen dos eixos bàsics de síntesi de ceramida: síntesi *de novo* i la via de recuperació (**Figura 14**). L'equilibri entre la síntesi *de novo* i el recanvi d'espècies d'esfingolípid és bàsic per mantenir l'homeòstasi metabòlica de l'esfingolipidoma.



**Figura 14: Representació esquemàtica de les vies de síntesi de ceramida.** El metabolisme de la ceramida s'articula en dos eixos de síntesi: via *de novo* i via de reciclatge o recuperació. Ambdues vies convergeixen en la molècula central de síntesi de tots els esfingolípids, la ceramida. La via de síntesi *de novo* s'inicia amb la conjugació de la serina i el palmitoil-CoA catalitzada per la serina palmitoiltransferasa (SPT), per sintetitzar 3-ketodihidroesfingosina. La 3-ketodihidroesfingosina reductasa (KDSR) redueix la 3-ketodihidroesfingosina a dihidroesfingosina. A continuació, les ceramida sintases (CerS) converteixen la dihidroesfingosina en diferents espècies moleculars de dihidroceramida, que són transformades en ceramides per la introducció d'un doble enllaç 4,5-trans catalitzada per la Desaturasa-1 (Des-1). Per altra banda, la via de reciclatge es basa en la reutilització de les bases de cadena llarga esfingoides, alliberades per la degradació d'esfingolípids complexos, per formar ceramida gràcies a l'acció de les ceramida sintases (CerS). Altres punts de recuperació es troben en la degradació de l'esfingomielina per part de les esfingomielinases (SMasa), en la degradació dels glucoesfingolípids, en la conversió de l'esfingosina-1-fosfat a esfingosina per part de l'esfingosina-1-fosfat fosfatasa (S1PP) o en la conversió de la ceramida-1-fosfat a ceramida per part de la ceramida-1-fosfat fosfatasa (C1PP). CDasa: ceramida desacilasa; CK: ceramida quinasa; SK: esfingosina quinasa; SMS: esfingomielina sintasa; S1PL: esfingosina-1-fosfat liasa.

**Síntesi *de novo* de ceramida.** El primer pas consisteix en la condensació d'una serina i un palmitoil-CoA. Aquesta reacció està catalitzada per l'enzim serina palmitoiltransferasa (SPT) i produeix 3-cetoesfinganina, que és subseqüentment reduïda per la 3-cetoesfinganina reductasa (KDSR) per generar esfinganina (Hanada, 2003). Seguidament, la dihidroceramida sintasa (esfinganina N-aciltransferasa) acila l'esfinganina per produir dihidroceramida. La dihidroceramida sintasa forma part de la família de les ceramida sintases, un grup ampli de proteïnes integrals de membrana que es distribueixen cadascuna a teixits diferents (Pewzner-Jung et al., 2006). Finalment, la dihidroceramida és processada per l'enzim dihidroceramida

desaturasa (Des) que introdueix un doble enllaç trans 4,5 al motiu esfingoide per formar la ceramida (Michel et al., 1997). Totes aquestes reaccions es duen a terme a la cara citosòlica del RE (Futerman and Riezman, 2005).

La ceramida és precursora de diferents molècules: esfingomielina, galactosilceramida, glucosilceramida i ceramida-1-fosfat. D'aquestes destaca l'esfingomielina, que es forma a l'aparell de Golgi per transferència de fosforilcolina procedent de la fosfatidilcolina a la ceramida, en una reacció catalitzada per l'esfingomielina sintasa (SMS)(Futerman et al., 1990; Yamaoka et al., 2004). La ceramida és produïda al RE i és transferida fins al Golgi per la proteïna CERT (*ceramide transport protein*), que transfereix ceramides de cadena acil curta de forma específica des del RE al Golgi (Huitema et al., 2004). La ceramida genera galactosilceramida en la regió luminal del RE a través de la transferència d'una galactosa per part d'un donador UDP-galactosa. La galactosilceramida serveix de precursor d'un ampli ventall de glucoesfingolípid obtinguts per la transferència seqüencial de carbohidrats. Un cop sintetitzats són transportats en vesícules fins a la membrana plasmàtica (Sprong et al., 1998). La glucosilceramida es genera a la cara citosòlica de l'aparell de Golgi. La ceramida és transportada fins al golgi per transport vesicular independent de CERT. Com en el cas de la galactosilceramida, serveix de precursor de molts glucoesfingolípid que formaran part de la membrana plasmàtica (Futerman and Riezman, 2005). Per últim, la ceramida és fosforilada per la ceramida quinasa per generar ceramida-1-fosfat, que té un paper rellevant en la mediació de senyalització pro-supervivència (Van Overloop et al., 2006).

La ceramida també pot ser desacilada per ceramidases, generant esfingosina i àcids grassos lliures. La cèl·lula eucariota expressa diferents ceramidases, que actuen a pH neutre (membrana plasmàtica) (Tani et al., 2003), àcid (lisosomes) (Bernardo et al., 1995) o bàsic (RE i Golgi) ( Xu et al., 2006). L'esfingosina produïda pot ser fosforilada per l'enzim esfingosina quinasa a esfingosina-1-fosfat, molècula que conjuntament amb la ceramida-1-fosfat tenen una funció senyalitzadora rellevant en processos de remodelació de citoesquelet, angiogènesi, creixement cel·lular o migració, entre d'altres (Spiegel and Milstien, 2003). L'enzim esfingosina-1-fosfat fosfatasa actua revertint la reacció, regulant així els nivells d'esfingosina-1-fosfat. Alternativament, l'esfingosina-1-fosfat pot ser degradada per l'esfingosina-1-fosfat liasa, formant dos productes no-esfingoides, l'hexadecanal i l'etanolamina fosfat. Aquesta és l'única via de sortida de metabòlits de la xarxa de biosíntesi d'esfingolípid (Tettamanti et al., 2003; Futerman and Riezman, 2005).

**Via de recuperació de la ceramida.** Permet l'aprofitament d'esfingolípid degradats per les vies lisosomal i no-lisosomal (esfingomielinases i ceramidases situades a membrana plasmàtica), que són reincorporats a les vies de síntesi (Tettamanti et al., 2003). La hidròlisi d'esfingolípid complexos genera bases esfingoides (esfingosina i esfinganina), que són reciclades per sintetitzar ceramida. Aquesta entrada al sistema de

metabolisme d'esfingolípid aporta una major capacitat de regulació dels nivells de ceramida i el fa més robust davant de possibles alteracions (Kolter and Sandhoff, 2005; Schulze and Sandhoff, 2011).

### 4.5.2- Esfingolípid com a reguladors de l'autofàgia

Diverses espècies d'esfingolípid participen en vies de senyalització cel·lular que controlen supervivència o mort. L'autofàgia és un procés finament regulat que pot ser modulats pels esfingolípid. Així, diferents espècies d'esfingolípid no tant sols formen part de la membrana de l'autofagosoma sinó que també poden regular diferencialment l'autofàgia, promovent-la com a mecanisme adaptatiu o bé com a medidora de mort cel·lular (Li et al., 2014).

La ceramida està lligada a la inducció d'autofàgia. El tractament amb tamoxifè induïx acumulació de ceramida que promou mort mediada per autofàgia (Scarlati et al., 2004). Els mecanismes subjacents estan parcialment caracteritzats. La ceramida pot actuar inhibint l'eix PI3K/mTORC1 a través de l'activació de la fosfoproteïna fosfatasa 2A (Ruvolo et al., 1999) o promovent la dissociació de Bcl-2 de la Beclina 1 (Schubert et al., 2000; Pattingre et al., 2009). La ceramida interacciona directament amb la proteïna Atg8/LC3 a les membranes mitocondrials per induir mitofàgia, que acaba sent letal per a la cèl·lula (Lee et al., 2011; Sentelle et al., 2012). En tot cas, l'autofàgia induïda per ceramida acaba provocant mort cel·lular per apoptosi. La mateixa inhibició de PI3K-mTORC1 activa vies pro-apoptòtiques i la mateixa ceramida es pot inserir a la membrana externa mitocondrial i permeabilitzar-la (Colombini, 2013; Dany and Ogretmen, 2015). Contràriament, l'esfingosina-1-fosfat exerceix un rol pro-supervivència i inhibeix apoptosi i activa autofàgia protectora en condicions de manca de nutrients a través de la inhibició de mTORC1 (Ponnusamy et al., 2010).

Malgrat que fins a principis del segle XXI es centralitzava tota la capacitat senyalitzadora del esfingolípid en la ceramida i els seus derivats, la millora de les tècniques d'anàlisi de l'esfingolipidoma ha permès en l'última dècada diferenciar de forma més específica les diverses espècies d'esfingolípid i avaluar l'activitat de les formes dihidro (Chen et al., 2010). Els dihidroesfingolípid són molt menys abundants que les ceramides i eren catalogats fins al moment com a molècules no bioactives (Rodríguez-Cuenca et al., 2015). L'espècie predominant és la dihidroceramida i les seves funcions biològiques són diferents i no-redundants respecte de les de les ceramides (Zheng et al., 2006; Siddique et al., 2015). La dihidroceramida és un intermediari transitori de la via de síntesi *de novo* de ceramida. L'última reacció per generar ceramida consisteix en la introducció d'un doble enllaç a l'estructura de la dihidroceramida. Aquesta reacció de desaturació està catalitzada per la dihidroceramida desaturasa (Des). S'han identificat dues dihidroceramida desaturases, Des-1 i Des-2, essent la Des-1 la que està present en la majoria dels teixits (Causeret et al., 2005). Des-1 té com a substrat preferencial la dihidroceramida, tot i que a menor escala

també mostra activitat sobre la dihidroesfingomielina (Omae et al., 2004; Causeret et al., 2005). Des-1 es troba a la cara citosòlica de la membrana del RE, regió on té lloc la reacció. Aquesta reacció és dependent del sistema de transport d'electrons del citocrom b5, que co-localitza a la cara citosòlica de la membrana del RE (Michel et al., 1997; Rodríguez-Cuenca et al., 2015). El citocrom b5 presenta una isoforma mitocondrial i una de microsomal, essent la mitocondrial la més rellevant (Geeraert et al., 1997; Plitzko et al., 2013). El doble enllaç diferencial entre les dihidroceramides i ceramides, altera les propietats biofísiques de les molècules, tals com l'elasticitat i assemblatge (Brockman et al., 2004).

L'autofàgia és una de les primeres funcions biològiques assignades a les dihidroceramides (Siddique et al., 2015). Diversos estudis han descrit que el tractament amb dihidroceramides exògenes de cadena curta indueix la formació d'autofagosomes, i que la inhibició de la Des-1 i la subseqüent acumulació de dihidroceramides sensibilitza les cèl·lules als estímuls autofàgics (Zheng et al., 2006; Gagliostro et al., 2012). En canvi, la inhibició de l'acumulació de dihidroceramides a través del bloqueig d'enzims apicals de la via de síntesi inhibeix l'activació d'autofàgia (Breen et al., 2013; Casasampere et al., 2016). Els mecanismes que relacionen dihidroceramides i autofàgia encara no s'han resolt plenament, però s'han obtingut diverses evidències. Siddique i col·laboradors van reportar que la dihidroceramida indueix autofàgia dependent d'AMPK, observant que en fibroblasts embrionics amb Des-1 delecionada es produïa un deteriorament del *pool* mitocondrial degut a una mitofàgia deficient (Siddique et al., 2013; Siddique et al., 2015). Per altra banda, factors estressants com ara la hipòxia o estrès oxidatiu indueixen la inhibició de Des-1, que promou l'augment dels nivells de dihidroceramida i autofàgia com a resposta adaptativa (Idkowiak-Baldys et al., 2010; Devlin et al., 2011). Així doncs, l'autofàgia induïda per les dihidroceramides pot exercir un rol protector o promotor de mort cel·lular.

Considerant que les dihidroceramides són integrants de membrana de diferents orgànuls, entre els quals hi ha el RE, variacions en els seus nivells també tenen un efecte notori en la composició d'aquestes membranes. L'increment en els nivells de dihidroceramides s'ha relacionat amb canvis en la composició de la membrana de RE, que esdevé més rígida com a conseqüència de l'augment de la proporció de dihidroceramides, fet que compromet la seva funció biosintètica i reguladora, i indueix estrès reticular (Puissant et al., 2010; Hernández-Tiedra et al., 2016). La subseqüent activació de la resposta UPR comporta la inducció d'autofàgia i s'estableix un eix d'interconnexió entre la dihidroceramida, estrès reticular i autofàgia (Salazar et al., 2009b; Hernández-Tiedra et al., 2016).

En contraposició a les ceramides, les dihidroceramides prevenen la formació de canals a la membrana externa mitocondrial induïda per les ceramides (Stiban et al., 2006). D'aquesta manera, el pas limitant de desaturació de la dihidroceramida constitueix un punt de regulació de destí cel·lular. L'acumulació de dihidroceramides bloqueja la mort cel·lular per apoptosi mediada per ceramides i activa una autofàgia que

en primera instància desenvolupa un rol adaptatiu. Si les circumstàncies comprometen la viabilitat cel·lular, l'autofàgia pot mediar mort cel·lular. El balanç entre els nivells de ceramides i dihidroceramides és determinant a l'hora de definir si s'activen o no les vies apoptòtiques (Siddique et al., 2012; Siddique et al., 2013).

Els nivells de ceramida, ceramida-1-fosfat i esfingosina-1-fosfat es poden balancejar per fomentar la producció de ceramida, pro-apoptòtica, o bé incrementar els nivells de ceramida-1-fosfat i esfingosina-1-fosfat, pro-supervivència (Cuvillier et al., 1996; Maiuri et al., 2007). Aquest fet evidencia que les diferents espècies d'esfingolípids integren un sistema que regula supervivència i mort cel·lular, i interrelaciona autofàgia i apoptosi (Brocklyn and Williams, 2012).

### 4.5.3- Esfingolípids i càncer

L'alteració de l'homeòstasi de l'esfingolipidoma és una característica comuna en diversos tipus de càncer. Considerant el rol rellevant que desenvolupen diferents espècies d'esfingolípids en la determinació de destí cel·lular, la modulació de la seva biosíntesi constitueix un important mecanisme implicat en la progressió tumoral i quimioresistència (Segui et al., 2006; Ryland et al., 2011). En el context tumoral, les cèl·lules re-canalicen les vies de síntesi *de novo* i de recuperació d'esfingolípids per minimitzar l'acumulació d'espècies pro-apoptòtiques com la ceramida i fomentar la generació d'esfingolípids pro-creixement, com la ceramida-1-fosfat o l'esfingosina-1-fosfat (Samsel et al., 2004; Koybasi et al., 2004). En aquest sentit, en diverses línies cel·lulars derivades de càncers de mama, colon, ovari, estómac, úter i ronyó, s'ha descrit la sobreexpressió de ceramidases, esfingomielina sintasa o de l'enzim esfingosina quinasa (Huang et al., 2011; Ogretmen, 2018). Per disminuir els nivells de ceramida, la cèl·lula tumoral també disposa d'altres estratègies com ara la inhibició de les vies de síntesi de la ceramida. Un altre mecanisme tumorigènic reportat es basa en la glicosilació no-convencional dels glucoesfingolípids. Un cop a membrana plasmàtica, l'exposició d'aquestes cadenes de carbohidrats alterades regula processos d'adhesió cel·lular, promoció d'angiogènesi i metàstasi (Bleicher and Cabot, 2002; Kolesnick, 2002).

Altres autors han relacionat la modulació dels nivells de ceramida de la cèl·lula tumoral amb la resistència al tractament antitumoral. La quimioteràpia i la radioteràpia indueixen acumulació de ceramida, factor relacionat amb l'efecte citotòxic exercit per aquests tractaments (Senchenkov et al., 2001; Ogretmen and Hannun, 2004). Per tamponar l'acumulació de ceramida i minimitzar la seva senyalització pro-apoptòtica, a la cèl·lula s'indueix la sobreexpressió de la glucosil-ceramida sintasa, fet que incrementa la glicosilació de la ceramida i genera glucosil i galactosilceramides, menys actives que la seva precursora (Lavie et al., 1996).

La rellevància dels esfingolípidis a definir supervivència o mort cel·lular fa que siguin dianes atractives per al desenvolupament de teràpies antitumorals. La caracterització de les alteracions pro-tumorals de les vies de síntesi dels esfingolípidis, així com el coneixement de les funcions senyalitzadores que exerceix cada espècie, ha de permetre manipular el sistema per induir la mort de les cèl·lules tumorals o sensibilitzar-les a teràpies estàndard. Estudis en línies cel·lulars de càncer de mama han descrit que la inhibició de la glucosilceramida sintasa sensibilitza les cèl·lules a l'acció del paclitaxel (Gouazé et al., 2005). Altrament, treballs en models *in vivo* han demostrat que la inhibició de l'esfingosina quinasa o de ceramidases redueix el creixement tumoral (Beljanski et al., 2010; Rao et al., 2013). El fet que les cèl·lules tumorals presentin un esfingolipidoma propi que difereix del de les cèl·lules sanes representa un avantatge per a les teràpies moduladores del metabolisme dels esfingolípidis, que són selectives per a les cèl·lules canceroses, que són més sensibles a la desregulació de l'esfingolipidoma (Ogretmen, 2018).





# **OBJECTIUS**



L'ABTL0812 és un derivat lipídic que representa el primer de la seva classe (*first-in-class*). Aquest compost indueix citotoxicitat en un ampli ventall de cèl·lules tumorals humanes i redueix el creixement de tumors xenografts derivats de línies tumorals humanes. Després de superar amb èxit la Fase Clínica 1 en pacients oncològics amb tumors sòlids avançats sense alternatives terapèutiques, en l'actualitat l'ABTL0812 es troba en Fase Clínica 2 en pacients de càncer d'endometri avançat i càncer escamós de pulmó de tipus NSCLC.

Al laboratori s'havia determinat prèviament que l'ABTL0812 activa els receptors PPAR $\alpha/\gamma$  i que indueix mort cel·lular mediada per autofàgia sense induir l'aparició de trets típicament apoptòtics, a les cèl·lules tumorals humanes MiaPaca2 (adenocarcinoma de pàncrees) i A549 (adenocarcinoma de pulmó). En aquest treball s'ha aprofundit sobre els mecanismes implicats en l'activació d'autofàgia per l'ABTL0812 i la seva relació amb els receptors PPAR $\alpha/\gamma$ , així com en els esdeveniments implicats en la mort cel·lular induïda per aquest nou fàrmac. Amb aquesta finalitat, s'han desenvolupat els següents objectius:

- 1. Caracteritzar el paper de la pseudoquinasa TRIB3 en la inhibició de l'eix Akt/mTORC1 induïda per l'ABTL0812.**
- 2. Estudiar el rol de l'estrès de reticle endoplasmàtic i dels esfingolípidis en la citotoxicitat i l'autofàgia induïdes per l'ABTL0812.**
- 3. Identificar marcadors farmacodinàmics útils per al desenvolupament clínic de l'ABTL0812.**
- 4. Caracteritzar el paper de la mitofàgia i de la permeabilització de la membrana lisosomal en la mort cel·lular induïda per l'ABTL0812.**



# RESULTATS



# **RESULTATS – CAPÍTOL 1**



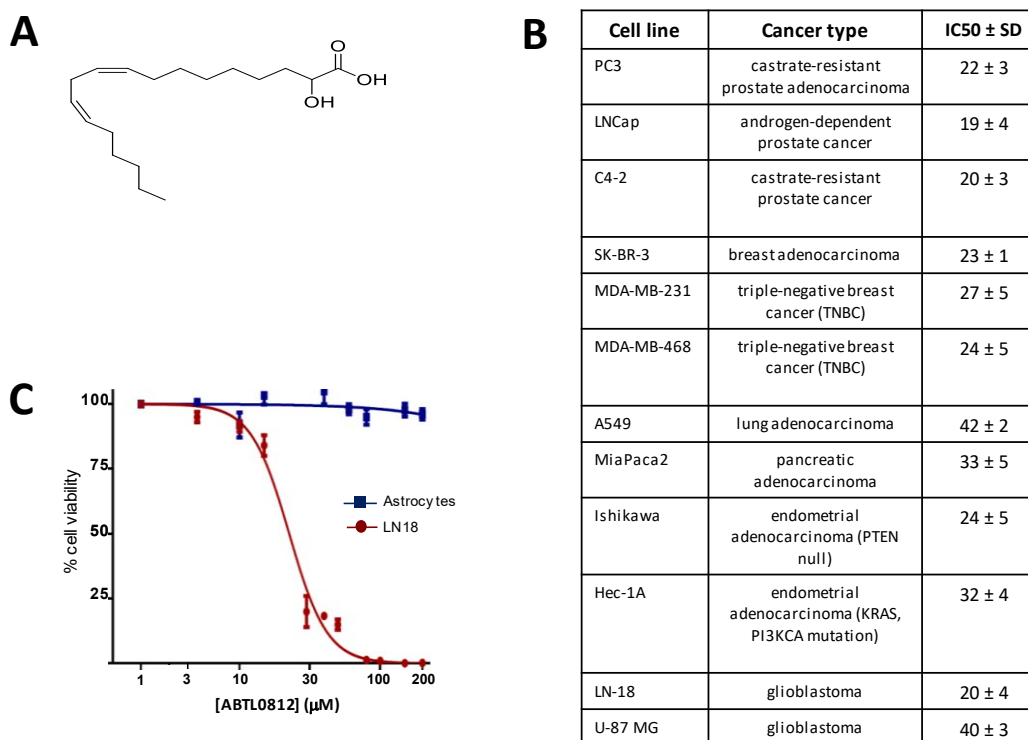


## 1.1- Antecedents

L'ABTL0812 és la forma sòdica de l'àcid 2-hidroxi-oleic, un àcid gras essencial poliinsaturat  $\omega 6$  de 18 carbonis (**Figura 15A**). L'ABTL0812 és una molècula *first-in-class* i forma part d'una nova classe de compostos englobats sota el nom de Fàrmacs Anàlegs de Lípids. Aquests fàrmacs consisteixen en molècules petites de síntesi química derivades de lípids naturals que tenen com a característiques principals un baix perfil toxicològic en models animals i una alta citotoxicitat en un ampli espectre de línies tumorals. L'ABTL0812 es troba en Fase Clínica 2 com a primera línia per al tractament (en combinació amb quimioteràpia: paclitaxel i carboplatí) de pacients amb càncer d'endometri avançat i càncer escamós de pulmó NSCLC (identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT03366480). Recentment, l'ABTL0812 ha obtingut l'*orphan drug designation* per neuroblastoma i adenocarcinoma de pàncrees per part de l'EMA i FDA (Agència Europea del Medicament i *US Food and Drug Administration*, respectivament). Està previst que comenci als EUA la primera fase de desenvolupament clínic en pacients amb càncer metastàtic de pàncrees, com a primera línia de tractament en combinació amb gemcitabina i Abraxane® (nab-paclitaxel) (identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT03417921).

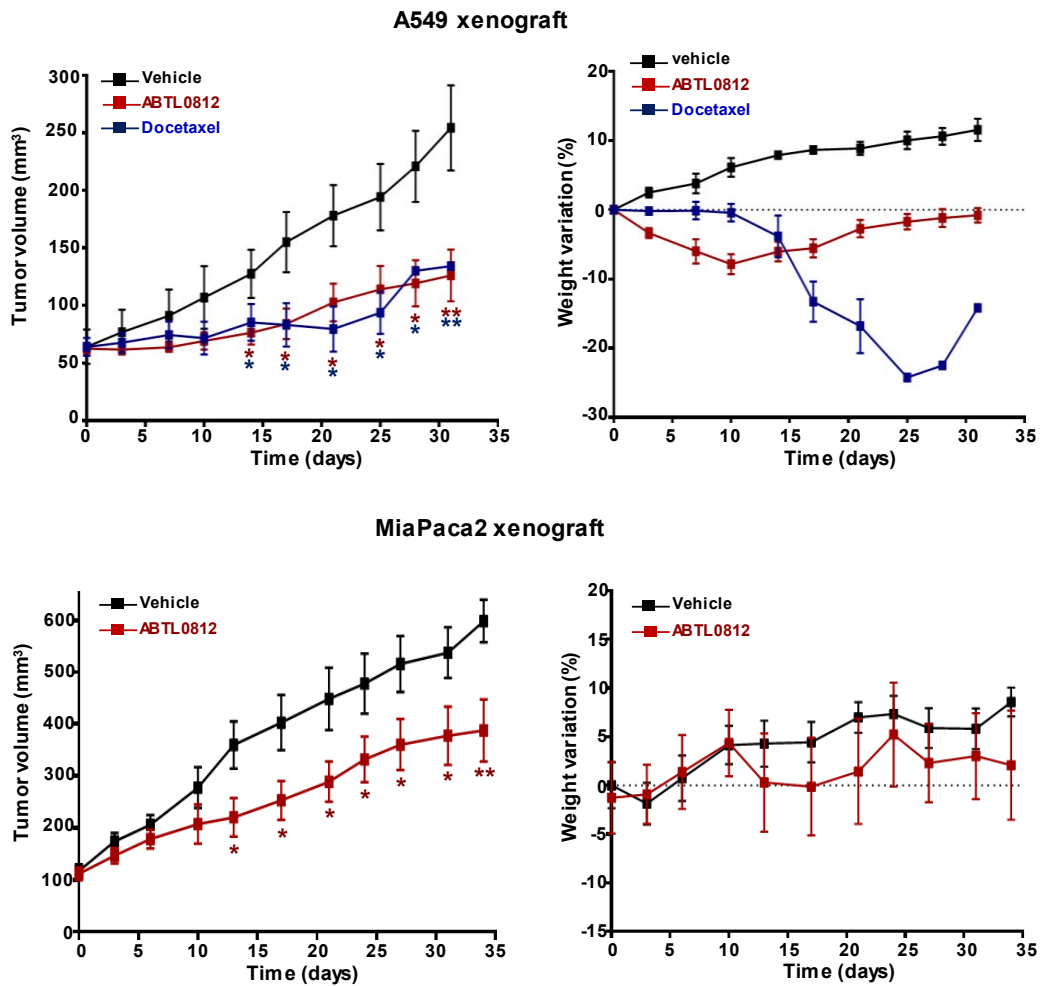
L'ABTL0812 va ser escollit pel seu desenvolupament pre-clínic, basat en el seu comportament en assajos fenotípics: presentava efecte anti-proliferatiu en cèl·lules tumorals, i produïa baixa toxicitat a altes dosis en models animals. Es van dur a terme assajos de viabilitat cel·lular en un ampli espectre de línies tumorals humanes i es va constatar l'alt efecte citotòxic de l'ABTL0812 en cèl·lules canceroses. La **Figura 15B** mostra una taula que recull els valors d'IC<sub>50</sub> obtinguts en diferents línies cel·lulars. Aquests valors oscil·len entre 20-40  $\mu\text{M}$ , uns valors anàlegs al que mostren altres compostos lipídics amb activitat antitumoral (Murray et al., 2015). D'interès, l'ABTL0812 presenta una potència similar en cèl·lules tumorals amb diferent grau de malignitat o resistència a tractaments canònics, com ara cèl·lules de càncer de mama triple negatiu o cèl·lules de càncer de pròstata resistents a la castració química.

Una de les característiques més rellevants de l'ABTL0812 és la seva baixa toxicitat en cèl·lules no tumorals. Així, la **Figura 15C** mostra que els cultius d'astròcits primaris són resistents a l'acció citotòxica de l'ABTL0812, fins i tot a concentracions altes (200  $\mu\text{M}$ ) que indueixen mort cel·lular als cultius de la línia de glioblastoma humà LN-18. Això està en consonància amb el fet que l'ABTL0812 ha demostrat una alta tolerabilitat i baixa toxicitat al ser administrat a altes dosis en models animals (cans i rosegadors). Per altra banda, la determinació dels paràmetres farmacocinètics en ratolins van demostrar que l'ABTL0812 presenta una molt bona biodisponibilitat (F: 103%) quan és administrat per via oral, així com una ràpida absorció ( $t_{\text{màx}}$ : 30 minuts), un pic de concentració elevat ( $C_{\text{màx}}$ : 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), un ampli volum de distribució ( $V_{\text{ss}}$ : 10.4 L/kg) i una ràtio d'eliminació alta (Cl: 82 mL/minut/kg).



**Figura 15: L'ABTL0812 indueix mort a les cèl·lules tumorals.** **A**, Estructura química de l'ABTL0812. **B**, Valors d'IC<sub>50</sub> de la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 en diferents línies tumorals humanes. Les cèl·lules van ser tractades 48 h amb diferents concentracions d'ABTL0812, i la viabilitat cel·lular es va determinar mitjançant assaig de MTT. Cada valor d'IC<sub>50</sub> és la mitjana ± SD de 3 determinacions diferents. **C**, Assaig de viabilitat cel·lular (MTT) en cèl·lules LN-18 de glioblastoma humà i en astròcits primaris de rata, tractades durant 48 h amb les concentracions indicades d'ABTL0812. Es van obtenir resultats similars en 3 determinacions diferents.

L'ABTL0812 ha demostrat activitat antitumoral en models animals de ratolins xenografiats amb cèl·lules de càncer de pàncrees i de pulmó humanes. Les cèl·lules utilitzades van ser MiaPaca2 (adenocarcinoma ductal pancreàtic humà) i A549 (adenocarcinoma pulmonar humà de tipus NSCLC). La **Figura 16** mostra que l'ABTL0812, administrat als ratolins per via oral, inhibeix el creixement tumoral dels xenografts de cèl·lules A549 amb una eficàcia similar a la del quimioterapèutic estàndard docetaxel. A més a més, en contraposició al docetaxel, l'ABTL0812 no presenta toxicitat, tal com mostra el seguiment del pes corporal dels ratolins. L'ABTL0812 també inhibeix el creixement tumoral dels xenografts de cèl·lules MiaPaca2 (**Figura 16**, panells inferiors), amb una potència similar a la que mostra el quimioterapèutic estàndard gemcitabina (resultats no mostrats).

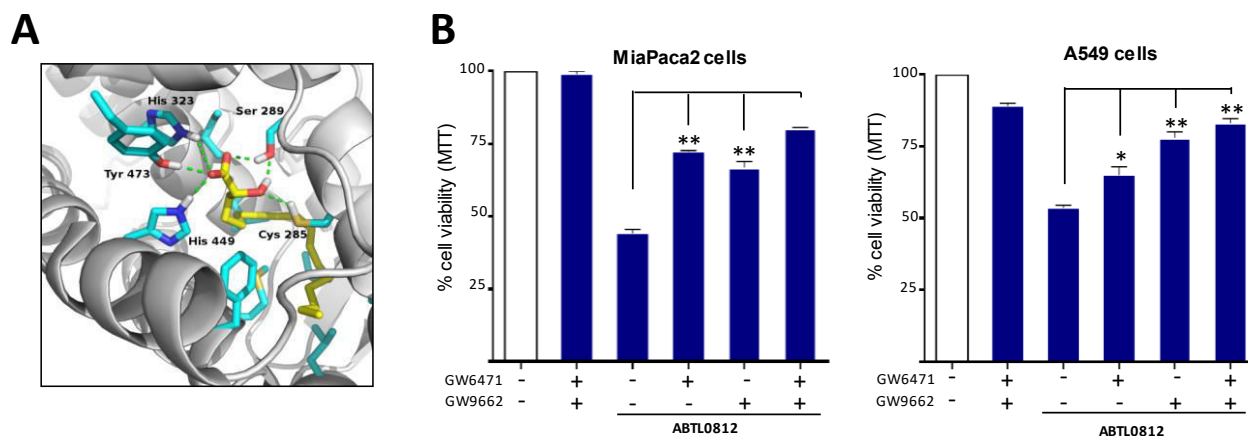


**Figura 16: L'ABTL0812 redueix el creixement de tumors xenograft humans de pulmó i pàncrees.** L'ABTL0812 inhibeix el creixement tumoral en models xenograft de càncer de pulmó (A549) i pàncrees (MiaPaca2) humans. Ratolins atímics *nude* van ser injectats amb cèl·lules A549 o MiaPaca2 i tractats amb vehicle o ABTL0812 per via oral. El docetaxel va ser administrat per via intraperitoneal. Es mostren les corbes de creixement tumoral i de variació de pes. Els resultats són la mitjana  $\pm$  SD de 5 ratolins per grup. Degut a la toxicitat del tractament amb docetaxel, només dos ratolins van assolir el dia 25 de tractament, i només un va superar els 28 dies. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

Amb la finalitat d'identificar les dianes primàries de l'ABTL0812 a la cèl·lula, es va dur a terme un cribratge *in silico* d'ampli espectre. Aquest estudi va ser realitzat en col·laboració amb l'empresa Intelligent Pharma SL, que va utilitzar un algoritme per comparar l'estructura química de l'ABTL0812 amb la base de dades ChEMBL15, aplicant els principis de similitud molecular (Maggiara and Shanmugasundaram, 2011) per tal d'identificar molècules endògenes de la cèl·lula que presentessin similitud molecular amb l'ABTL0812. Amb aquesta estratègia es va determinar que l'ABTL0812 era similar a alguns dels agonistes dels factors de transcripció PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptors*). Els PPARs són una família de

## RESULTATS – CAPÍTOL 1

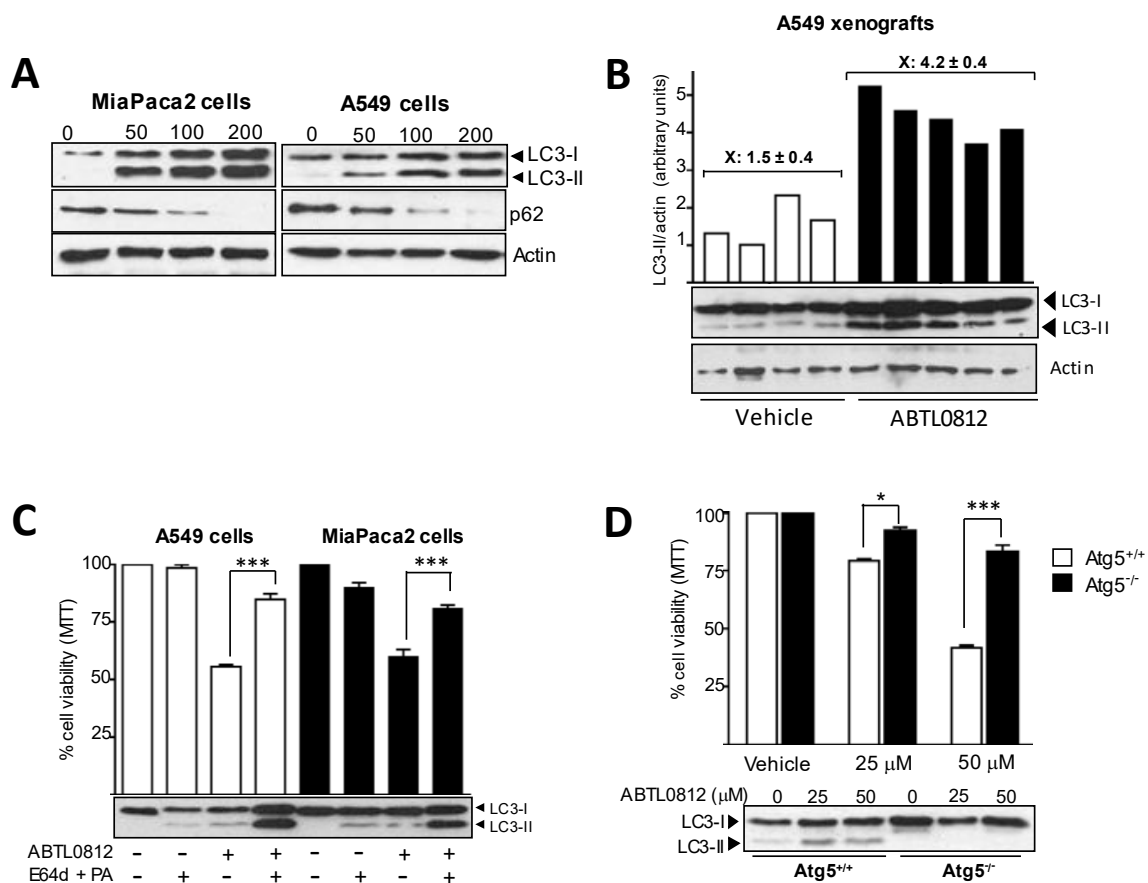
receptors nuclears que heterodimeritzen amb els receptors X-retinoides per modular l'expressió de nombrosos gens implicats en el metabolisme de la glucosa i els lípids. Les cèl·lules de mamífer n'expressen tres isoformes, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  i PPAR $\gamma$  (Li and Palinski, 2006). S'ha descrit que l'activació del PPAR $\gamma$  redueix la proliferació i invasió, i promou apoptosi en models de càncer de mama i carcinoma hepàtic (Shen et al., 2012; Rovito et al., 2013), mentre que l'activació del PPAR $\alpha$  inhibeix el creixement tumoral i angiogènesi en models murins (Panigraphy et al., 2008; Li et al., 2014). El model *in silico* d'interacció va predir que l'ABTL0812 interaccionaria amb el domini d'unió de lligand dels receptors PPARs. En aquest model, el grup carboxílic de l'ABTL0812 estableix ponts d'hidrogen amb les cadenes laterals dels residus clau Ser289, His323, Tyr473 i His449, tal i com ho fan altres agonistes dels PPARs com la rosiglitazona. En aquest model, el grup 2-hidroxil de l'ABTL0812 estableix ponts d'hidrogen amb els residus Cys285 i Ser289, que també estan conservats al domini d'unió de lligand. En primera instància, i utilitzant assajos *in vitro* de desplaçament de radiolligand amb preparacions pures de PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ , es va establir que l'ABTL0812 s'uneix al centre actiu de PPAR $\alpha$  i de PPAR $\gamma$  amb uns valors de  $K_i$  de 7.1  $\mu$ M i 4.7  $\mu$ M, respectivament (**Figura 17A**). Estudis bioquímics realitzats al nostre laboratori van demostrar que: 1) L'ABTL0812 actua com un agonista de PPAR $\alpha$  i de PPAR $\gamma$  induint la seva activitat transcripcional en diferents línies cel·lulars; i 2) el bloqueig farmacològic dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$  reverteix parcialment l'efecte citotòxic de l'ABTL0812 (**Figura 17B**). Aquestes observacions demostren que l'ABTL0812 activa els receptors PPAR $\alpha/\gamma$  i que aquests medien en l'acció citotòxica de l'ABTL0812 a les cèl·lules tumorals.



**Figura 17: L'ABTL0812 indueix l'activitat transcripcional de PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ , que medien en la mort cel·lular induïda per l'ABTL0812. A,** Model de la interacció de l'ABTL0812 (marcat en groc) amb el domini d'unió de lligand de PPAR $\gamma$ . Es mostren les interaccions (línies verdes puntejades) dels grups carboxilat i hidroxil de l'ABTL0812 (marcats de color vermell) amb les cadenes laterals (marcades de color blau) de residus situats al centre actiu del PPAR $\gamma$ . **B,** El bloqueig farmacològic de PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$  reverteix la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812. Les cèl·lules indicades van ser pre-incubades amb vehicle (columnes blanques), 0.2  $\mu$ M GW6471 (antagonista PPAR $\alpha$ ) o 1  $\mu$ M GW9662 (antagonista PPAR $\gamma$ ) durant 2 h, i a continuació tractades amb ABTL0812 50  $\mu$ M 24 h. La viabilitat cel·lular es va determinar per assaig de MTT. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb ABTL0812. Figura extreta d'Erazo *et al.*, 2016.

En els primers assajos realitzats al laboratori es va observar que l'ABTL0812 no induïa l'aparició de trets típicament apoptòtics, com ara la fragmentació nuclear o l'activació de caspases, a les cèl·lules MiaPaca2 i A549, i que inhibidors de caspases com QVD o Z-VAD no revertien la seva citotoxicitat (resultats no mostrats). Amb la finalitat d'identificar el mecanisme d'acció induït per ABTL0812, es van analitzar les cèl·lules tractades mitjançant microscòpia electrònica i es van observar estructures de doble membrana que corresponien a autofagosomes, suggerint que l'ABTL0812 induïa autofàgia (resultats no mostrats). Això es va confirmar mitjançant estudis bioquímics que demostraren que l'ABTL0812 induïa l'acumulació del marcador d'autofagosomes LC3-II (forma lipídada de LC3) i la desaparició de la proteïna de càrrega p62, tant en línies cel·lulars (**Figura 18A**) com en mostres dels tumors xenografts d'animals que havien sigut tractats amb ABTL0812 (**Figura 18B**). L'augment dels nivells de LC3-II pot ser degut a l'activació d'autofàgia o bé al seu bloqueig, ja que ambdós esdeveniments resulten en l'acumulació d'autofagosomes a la cèl·lula. L'aproximació utilitzada per definir en quin cas es trobava l'ABTL0812 es va basar en el co-tractament de les cèl·lules MiaPaca2 i A549 amb ABTL0812 i els inhibidors de proteases lisosomals E64d i Pepstatina-A (bloqueig farmacològic de l'autofàgia). La combinació dels tractaments resulta en una acumulació superior de LC3-II, indicatiu que l'ABTL0812 induïa autofàgia i que els autofagosomes s'acumulen en major mesura com a resultat del bloqueig de la seva degradació per part de l'E64d i la Pepstatina-A (**Figura 18C**). L'ABTL0812, per tant, induïa autofàgia dinàmica a les línies cel·lulars MiaPaca2 i A549 (**Figura 18C**). Per últim, la citotoxicitat de l'ABTL0812 està mediada per autofàgia, donat que cèl·lules MEF incompetents per autofàgia (ATG5<sup>-/-</sup>) són menys sensibles a l'acció citotòxica de l'ABTL0812 (**Figura 18D**).

Així doncs, a l'inici d'aquesta Tesi Doctoral s'havia mostrat preliminarment que l'ABTL0812 tenia com a dianes primàries a la cèl·lula els receptors PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ , i per altra banda que induïa una mort cel·lular mediada per autofàgia en la qual no s'observa un fenotip apoptòtic. Des d'aquest punt parteixen els resultats obtinguts en aquest treball, que s'ha centrat en la caracterització del mecanisme d'acció de l'ABTL0812. Per això, s'han utilitzat les línies cel·lulars humanes de càncer de pulmó A549 i de pàncrees MiaPaca2, models en què l'ABTL0812 havia demostrat alta citotoxicitat i capacitat d'inhibició del creixement tumoral de xenografts derivats.



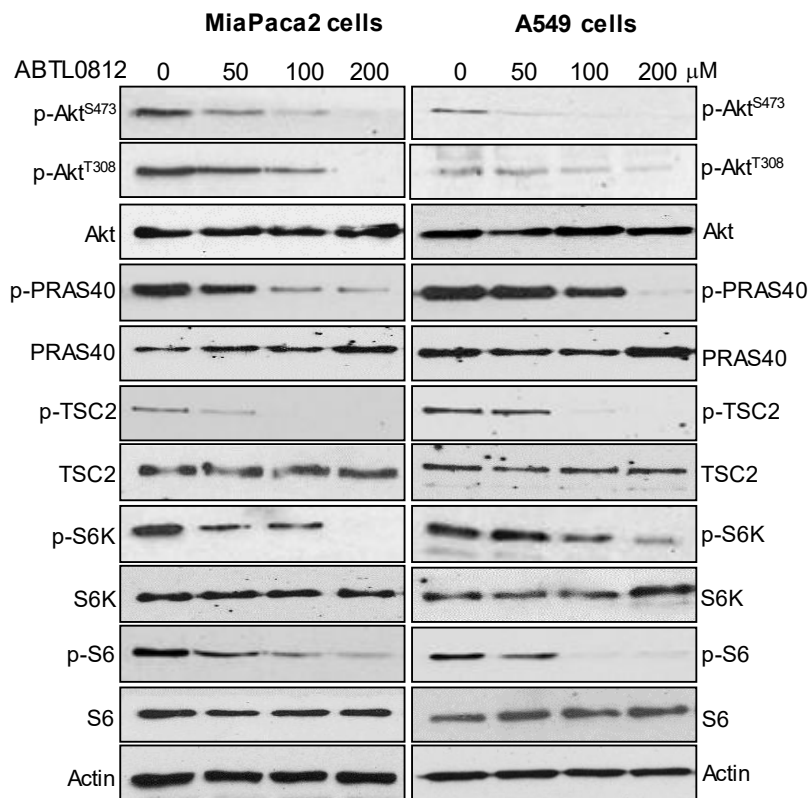
**Figura 18: L'ABTL0812 induïx mort cel·lular mediada per autofàgia a les cèl·lules tumorals.** **A**, Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser tractades 12 h amb les concentracions indicades d'ABTL0812, lisades i els nivells dels marcadors d'autofàgia LC3 i p62 visualitzats per immunoblot. **B**, La proteïna extreta dels tumors xenografts de cèl·lules A549 dels animals tractats amb vehicle o ABTL0812 va ser analitzada per immunoblot pel marcador d'autofagosomes LC3-II. La figura mostra una anàlisi representativa de tumors tractats amb vehicle ( $n=4$ ) o ABTL0812 120 mg/kg ( $n=5$ ). Els nivells de LC3-II van ser normalitzats respecte dels nivells d'actina i s'estimaren emprant unitats densitomètriques. **C**, Cèl·lules A549 (columnes blanques) i MiaPaca2 (columnes negres) van ser pre-incubades amb vehicle o una combinació dels inhibidors de proteases lisosomals E64d (10 μM) i Pepstatina-A (PA, 10 μg/ml), abans d'aplicar un tractament amb ABTL0812 50 μM 24 h. La viabilitat cel·lular va ser determinada per assaig de MTT, i els nivells de la proteïna LC3, monitoritzats per immunoblot. Cada valor és la mitjana ± SD de 3 experiments diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb ABTL0812. **D**, Cèl·lules MEF ATG5<sup>+/+</sup> (columnes blanques) i ATG5<sup>-/-</sup> (columnes negres) van ser tractades amb vehicle o ABTL0812 durant 24 h, i la viabilitat cel·lular, determinada per assaig de MTT. L'acumulació de LC3 va ser visualitzada per immunoblot. Cada valor és la mitjana ± SD de 3 experiments diferents. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les MEF ATG5<sup>+/+</sup>. Figura extreta d'Erazo *et al.*, 2016.

## 1.2- L'ABTL0812 inhibeix l'eix Akt/mTORC1

El complex mTORC1 és un regulador negatiu de l'autofàgia. mTORC1 fosforila i inhibeix a la proteïna del complex d'inducció d'autofàgia ULK1/2 resultant en la inhibició de la formació de l'autofagosoma (Jung *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2011). Conseqüentment, la inhibició mTORC1 resulta en l'activació de l'autofàgia en la

majoria dels contextos cel·lulars. Donat que prèviament el nostre laboratori havia demostrat que l'ABTL0812 indueix autofàgia, en primer lloc es va estudiar l'efecte d'aquest compost sobre el complex mTORC1.

El tractament amb ABTL0812 va resultar en la inhibició del complex mTORC1 (**Figura 19**), donat que va inhibir la fosforilació del motiu hidrofòbic (Thr389) del substrat p70S6K i la fosforilació de la proteïna ribosomal S6, substrat canònic de p70S6K. Com es detalla a la introducció, l'activitat de mTORC1 està regulada per Akt, que fosforila les proteïnes TSC2 i PRAS40 i inhibeix la seva acció repressora sobre mTORC1. La **Figura 19** mostra que l'ABTL0812 inhibeix de forma dosi-dependent la fosforilació dels dos residus crítics per a l'activació d'Akt, la Thr308 (T-loop) i la Ser473 (motiu hidrofòbic). Conseqüentment, s'observa una reducció robusta en els nivells de fosforilació dels substrats d'Akt PRAS40 i TSC2. Aquests resultats demostren que l'ABTL0812 inhibeix l'eix Akt/mTORC1 a les cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549.

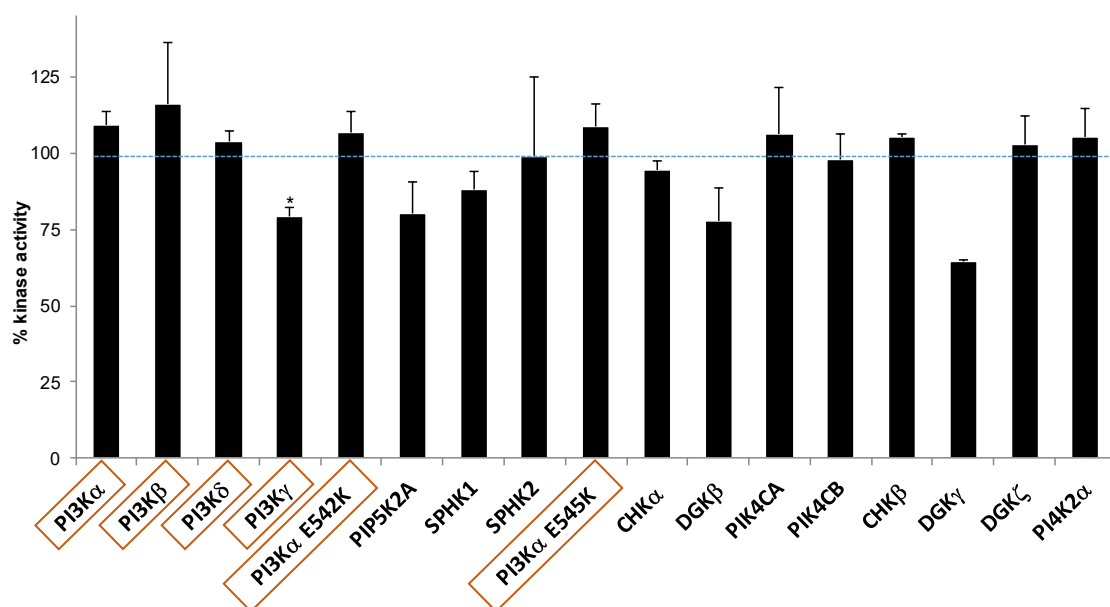


**Figura 19: El tractament amb ABTL0812 inhibeix l'eix Akt/mTORC1 en cèl·lules tumorals.** Anàlisi per immunoblot de llisats de cèl·lules MiaPaca2 i A549 tractades 48 h amb vehicle (etanol) o ABTL0812 (50, 100 o 200 μM). Es van monitoritzar els nivells de fosforilació de les proteïnes Akt, PRAS40, TSC2, S6K i S6. Els nivells de de cada proteïna i els d'actina van ser utilitzats com a control de càrrega. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments diferents.



## RESULTATS – CAPÍTOL 1

L'activació d'Akt depèn de la generació de PIP<sub>3</sub> per part de la PI3K, donat que el PIP<sub>3</sub> permet per una part l'activació del complex mTORC2 (que fosforila la Ser473 d'Akt) i, per l'altra, la co-localització d'Akt amb el seu activador PDK1 (que fosforila la Thr308 d'Akt) (Lizcano and Alessi, 2002). Donada la naturalesa lipídica de l'ABTL0812 i que la família de les PI3K són enzims que actuen sobre substrats lipídics, a continuació ens vàrem plantejar si l'ABTL0812 podia modular l'activitat de les PI3K. Amb aquest propòsit, es va establir una col·laboració amb la *MRC Protein Phosphorylation Unit* de la Universitat de Dundee (UK) que va determinar l'efecte *in vitro* de l'ABTL0812 sobre un panell de quinases de substrats lipídics. L'assaig *in vitro* va consistir a incubar l'ABTL0812 amb preparacions pures de 17 quinases lipídiques recombinants diferents i determinar la seva activitat quinasa. La **Figura 20** mostra que l'ABTL0812 no té cap efecte sobre l'activitat de la PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$  o PI3K $\delta$ , i tan sols va mostrar un lleuger efecte inhibitor sobre l'activitat de la PI3K $\gamma$ . L'ABTL0812 tampoc va tenir un efecte significatiu sobre l'activitat dels mutants de PI3K $\alpha$  E542K i E545K, dos dels mutants amb major prevalença en diferents tumors. Aquests resultats suggerien que l'ABTL0812 no impedia l'activació d'Akt a través de la inhibició de les PI3K. Al contrari, la DGK $\beta$  en menor grau i la DGK $\gamma$  en major grau (però no la DGK $\zeta$ ) van resultar parcialment inhibides per l'ABTL0812.



**Figura 20: L'ABTL0812 no inhibeix l'activitat quinasa de les PI3K *in vitro*.** Assaig quinasa *in vitro*. Preparacions pures de 17 quinases lipídiques recombinants diferents van ser incubades amb ABTL0812 10  $\mu$ M. Les proteïnes PI3K avaluades s'indiquen amb requadres taronges. Els resultats s'expressen en percentatge d'activitat quinasa. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents.

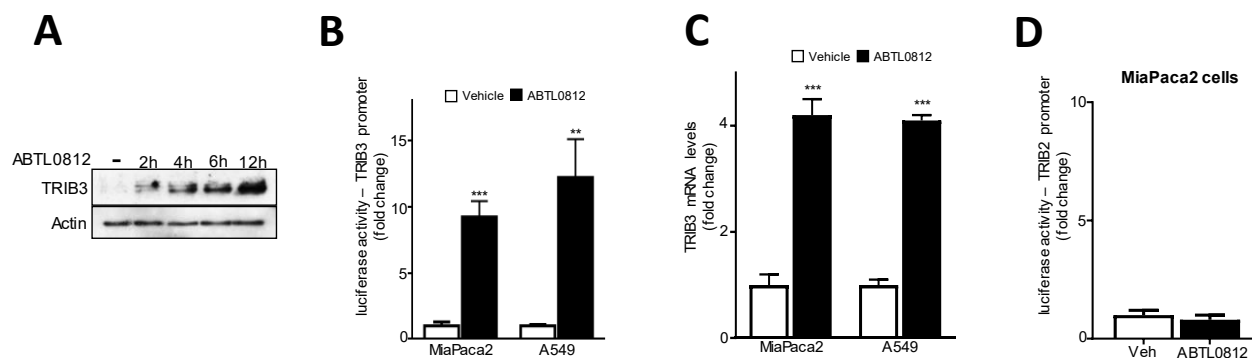
### 1.3- L'ABTL0812 indueix l'expressió de la pseudoquinasa TRIB3 a través de l'activació dels receptors PPAR $\alpha$ i PPAR $\gamma$

Els resultats obtinguts indicaven que l'ABTL0812 no inhibia l'activitat de les PI3K, fet que suggeria que la inhibició d'Akt per part de l'ABTL0812 estava mediada per un mecanisme d'acció alternatiu. Els resultats obtinguts prèviament mostraven que l'ABTL0812 actua com a agonista dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$ , l'activació dels quals era necessària per la citotoxicitat induïda pel fàrmac. Koo i col·laboradors van descriure que els PPARs regulen l'expressió de la pseudoquinasa TRIB3, a través de la unió a una seqüència element de resposta a PPARs localitzada al promotor de TRIB3 (Koo et al., 2004). Altres autors, han reportat que la pseudoquinasa TRIB3 uneix Akt i la inhibeix al·lostèricament i impedeix la seva fosforilació per part de quinases apicals (Du et al., 2003). Amb tot això, es va hipotetitzar que l'ABTL0812 podia induir la sobreexpressió de TRIB3 a través de l'activació dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$ , i que la pseudoquinasa TRIB3 actuaria inhibint Akt i, en conseqüència, mTORC1, activant autofàgia.

Per corroborar aquesta hipòtesi, en primer lloc es va analitzar si el tractament amb ABTL0812 induïa l'augment d'expressió de TRIB3, tractant cèl·lules MiaPaca2 a diferents temps amb ABTL0812. La **Figura 21A** mostra que l'ABTL0812 indueix un augment de l'expressió de la proteïna TRIB3 a les 2 hores de tractament, que incrementa progressivament fins a les 12 hores de tractament.

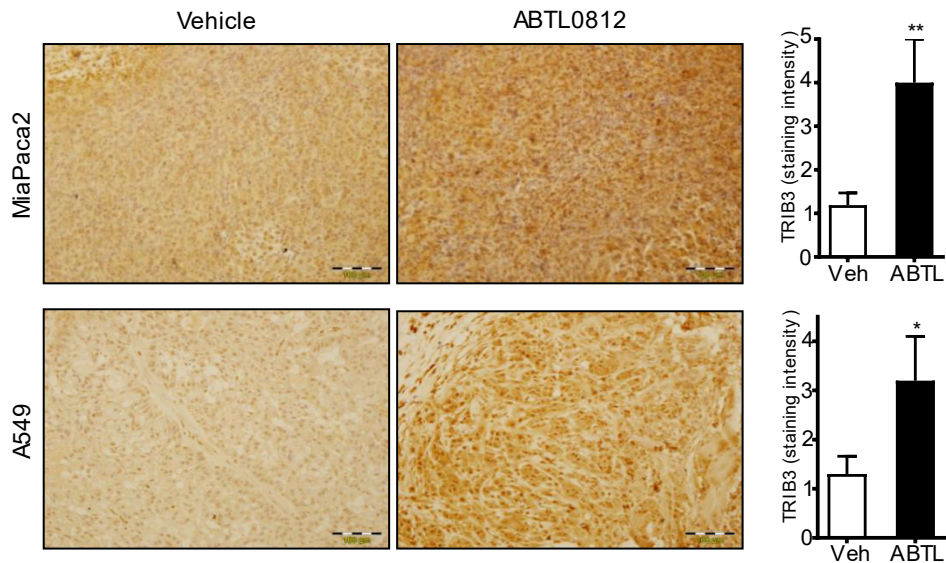
Per un altre costat, es van dur a terme assajos de gen reporter utilitzant el promotor de TRIB3 fusionat al gen de la luciferasa. La **Figura 21B** mostra que l'ABTL0812 indueix de forma robusta la transcripció de TRIB3 a les cèl·lules MiaPaca2 (increment del 700%) i A549 (increment del 1100%). La quantificació de l'mRNA de TRIB3 per RT-qPCR a cèl·lules MiaPaca2 i A549 tractades amb ABTL0812 va demostrar que el tractament resulta en un clar increment (200%) dels nivells del missatger de TRIB3 en ambdues línies cel·lulars (**Figura 21C**). Aquests resultats demostren que l'ABTL0812 indueix la sobreexpressió de la pseudoquinasa TRIB3.

En paral·lel, es va estudiar si l'ABTL0812 induïa el gen de TRIB2, donat que TRIB2 exerceix un rol pro-tumoral a través de la inhibició del factor FOXO o la inducció de la degradació del factor C/EBP $\alpha$ , funcions que antagonitzen les de TRIB3 (Eyers et al., 2017). El corresponent assaig de gen reporter en cèl·lules MiaPaca2 va demostrar que l'ABTL0812 no indueix TRIB2 (**Figura 21D**). Aquests resultats suggereixen que l'ABTL0812 induiria específicament TRIB3 a la cèl·lula tumoral.



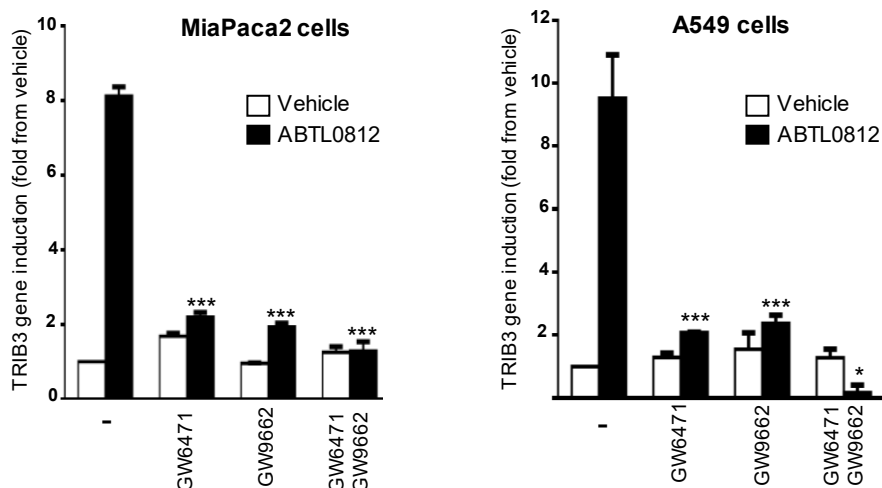
**Figura 21: L'ABTL0812 induïx l'expressió de TRIB3 però no de TRIB2.** **A**, Els nivells de TRIB3 en lisats de cèl·lules MiaPaca2 tractades els temps indicats van ser analitzats mitjançant immunoblot. Es mostren els nivells d'actina com a control de càrrega. Es van obtenir resultats anàlegs en 3 experiments diferents. **B**, Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser transfectades amb un plasmidi que conté el promotor de TRIB3 fusionat al gen de la luciferasa. Les cèl·lules van ser tractades 24 h amb vehicle (etanol, columnes blanques) o ABTL0812 (100 µM, columnes negres), lisades, i la luminescència emesa quantificada al luminòmetre. Dades expressades com a ràtio d'increment de senyal respecte de la condició tractada amb vehicle. Cada valor és la mitjana ± SD de 3 determinacions diferents. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. **C**, Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser tractades 24 h amb ABTL0812 100 µM. S'extragué l'RNA total, i els nivells de l'mRNA de TRIB3 s'analitzaren mitjançant RT-qPCR. Cada valor és la mitjana ± SD de 3 determinacions diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. **D**, Cèl·lules MiaPaca2 van ser transfectades amb un plasmidi que conté el promotor de TRIB2 fusionat al gen de la luciferasa. Les cèl·lules van ser tractades 24 h amb vehicle (etanol, columnes blanques) o ABTL0812 (100 µM, columnes negres), lisades, i la luminescència emesa quantificada al luminòmetre. Dades expressades com a ràtio d'increment de senyal respecte de la condició tractada amb vehicle. Cada valor és la mitjana ± SD de 3 determinacions diferents.

A continuació, es va estudiar si l'ABTL0812 era capaç d'induir la sobre-expressió de TRIB3 en tumors xenograft de cèl·lules MiaPaca2 i A549 de ratolins que havien sigut tractats amb ABTL0812 (**Figura 16**). Amb aquest objectiu, es va dur a terme la detecció de TRIB3 mitjançant anàlisi immunohistoquímica dels tumors. La quantificació de la tinció obtinguda pels talls representatius de les condicions de tractament amb vehicle o ABTL0812 mostra que el tractament amb el fàrmac resulta en un augment significatiu dels nivells tumorals de la proteïna TRIB3 (**Figura 22**). Així, els resultats obtinguts *in vivo* recolzen els generats als models cel·lulars, i mostren que la sobreexpressió de TRIB3 es uns dels trets característics del tractament amb ABTL0812.



**Figura 22: L'administració oral d'ABTL0812 a ratolins indueix la sobreexpressió de TRIB3 en tumors xenografts de cèl·lules MiaPaca2 (pàncrees) i A549 (pulmó).** Els tumors xenograft de cèl·lules MiaPaca2 i A549 de ratolins tractats amb vehicle (n=4) o ABTL0812 (n=5) van ser extrets post-sacrifici i es van avaluar els nivells de TRIB3 per anàlisi immunohistoquímica, seguint el protocol descrit a l'apartat de Material i Mètodes. Barra d'escala, 100 µm. Es mostra una anàlisi representativa. Els histogrames mostren la quantificació de la intensitat de tinció de totes les mostres. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  respecte dels tumors tractats amb vehicle.

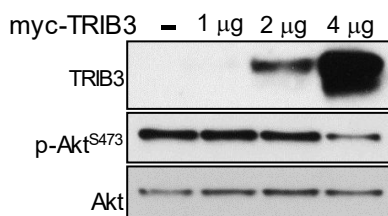
En paral·lel, es van dur a terme un conjunt d'experiments per validar si la sobre-expressió de TRIB3 era dependent de l'activació dels receptors  $PPAR\alpha/\gamma$ . Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser incubades amb antagonistes dels receptors  $PPAR\alpha$  i  $PPAR\gamma$  (GW6471 i GW9662, respectivament) prèviament al tractament amb ABTL0812, i a continuació es van quantificar els nivells de l'mRNA de TRIB3 cel·lular per RT-qPCR. La **Figura 23** mostra que el bloqueig farmacològic dels  $PPAR\alpha/\gamma$ , tant individualment com conjunta, resulta en la inhibició de la inducció gènica de TRIB3 promoguda per l'ABTL0812. En conjunt, els resultats demostren que l'ABTL0812 activa els receptors  $PPAR\alpha/\gamma$  que indueixen la sobreexpressió de la pseudoquinasa TRIB3.



**Figura 23: Els receptors PPAR $\alpha$ / $\gamma$  medien en l'expressió de la pseudoquinasa TRIB3 induïda per ABTL0812.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser pre-incubades amb vehicle o l'antagonista de PPAR $\alpha$  GW6471 (0.2  $\mu$ M) i/o l'antagonista de PPAR $\gamma$  GW9662 (1  $\mu$ M) durant 2 h, i tractades 24 h amb vehicle (etanol; columnes blanques) o ABTL0812 50  $\mu$ M (columnes negres). Els nivells d'mRNA de TRIB3 van ser monitoritzats per RT-qPCR. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. Figura extreta d'Erazo *et al.*, 2016.

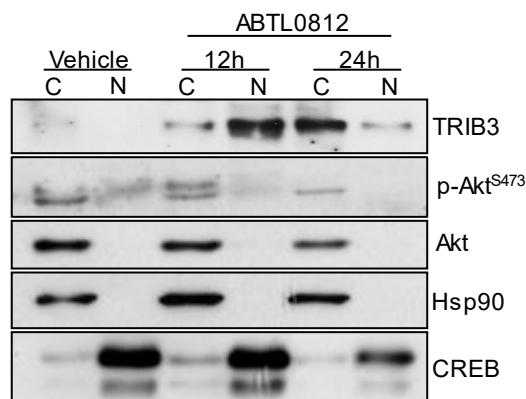
#### 1.4- L'ABTL0812 inhibeix l'eix Akt/mTORC1 via TRIB3

Com s'ha esmentat anteriorment, s'ha descrit que la pseudoquinasa TRIB3 uneix Akt i la inhibeix (Du et al., 2003). A continuació, donat que l'ABTL0812 induïa la sobreexpressió de TRIB3, es va estudiar si l'augment dels nivells d'aquesta pseudoquinasa estava relacionat amb la inhibició de la fosforilació d'Akt. En primer lloc, es van transfectar cèl·lules A549 amb quantitats creixents de proteïna myc-TRIB3 recombinant i es van monitoritzar els nivells de fosforilació d'Akt per assaig d'immunoblot. La **Figura 24** mostra que l'expressió de quantitats creixents de TRIB3 resulta en la disminució dels nivells de fosforilació del residu Ser473 d'Akt, observacions que recolzen el rol inhibidor de TRIB3 sobre Akt.



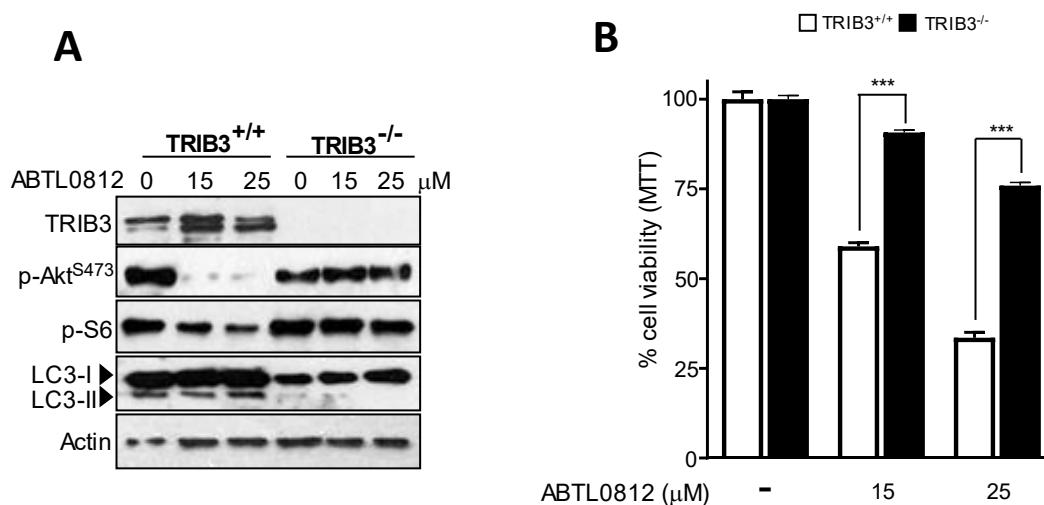
**Figura 24: La sobre-expressió de TRIB3 inhibeix la fosforilació d'Akt cel·lular.** Cèl·lules A549 van ser transfectades amb quantitats creixents d'un plasmidi codificant per TRIB3 humà. Els nivells de les proteïnes TRIB3 i Akt, i la fosforilació d'Akt (Ser473), van ser monitoritzats per immunoblot. S'obtingueren resultats similars en 3 experiments diferents.

TRIB3 es localitza de forma predominant al nucli però du a terme les seves funcions tant al nucli com al citosol (Örd and Örd, 2017). A continuació, es va estudiar la localització subcel·lular de TRIB3 en resposta al tractament amb ABTL0812 a través d'experiments de fraccionament subcel·lular. La **Figura 25** mostra que el tractament amb ABTL0812 de cèl·lules MiaPaca2 indueix inicialment (12 hores) un augment marcat dels nivells de TRIB3 nuclear, mentre que a les 24 hores la població de TRIB3 nuclear disminueix i s'observa un augment robust de la població citosòlica de la pseudoquinasa. L'augment de TRIB3 citosòlica coincideix amb la disminució de la fosforilació d'Akt (Ser473). Aquests resultats suggereixen que TRIB3 transloca del nucli al citosol, on du a terme la seva funció inhibidora sobre Akt.



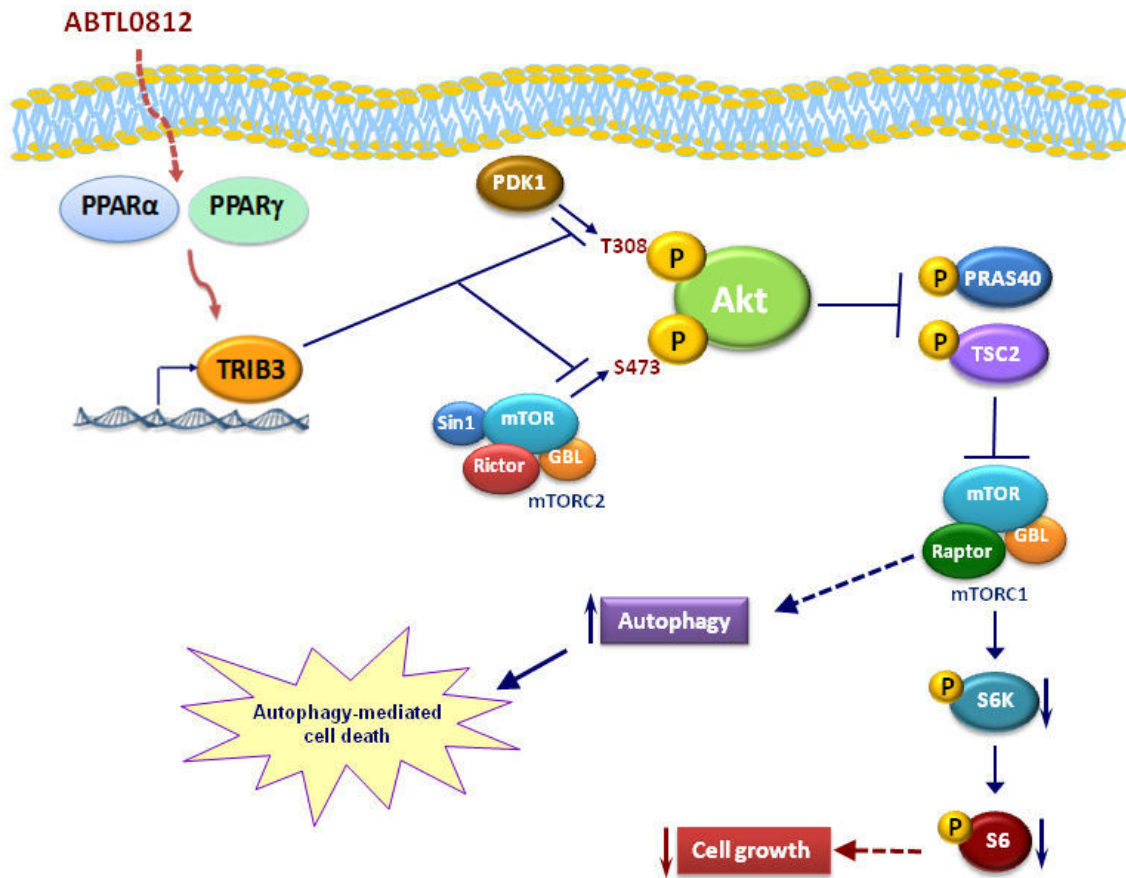
**Figura 25: El tractament amb ABTL0812 indueix inicialment un augment de la població nuclear de TRIB3, que transloca al citosol on inhibeix Akt.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades amb ABTL0812 100  $\mu$ M durant els temps indicats i es va aplicar un protocol de fraccionament subcel·lular (descriu a l'apartat de Material i Mètodes). Les fraccions citosòlica (C) i nuclear (N) van ser analitzades per immunoblot per visualitzar les proteïnes TRIB3 i Akt, i els nivells de fosforilació d'Akt (Ser473). Les proteïnes Hsp90 i CREB es mostren com a marcadors de fracció citosòlica i nuclear, respectivament. Es van obtenir resultats anàlegs en 2 experiments diferents.

A continuació, es van dur a terme dos experiments utilitzant cèl·lules MEF transformades salvatges (TRIB3<sup>+/+</sup>) o deficientes per TRIB3 (TRIB3<sup>-/-</sup>) amb l'objectiu de determinar la rellevància de TRIB3 en la mediació de la inhibició de l'eix Akt/mTORC1, activació d'autofàgia i citotoxicitat induïdes per l'ABTL0812. Per un costat, l'anàlisi per assaig d'immunoblot dels lisats cel·lulars corresponents va constatar que l'ABTL0812 era incapaç d'inhibir l'eix Akt/mTORC1 (fosforilació d'Akt i S6 no disminueixen) i d'induir autofàgia (acumulació de LC3-II) a les cèl·lules deficientes en TRIB3 (**Figura 26A**). Per l'altre costat, es va dur a terme un assaig de viabilitat de MTT per avaluar la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 en ambdues línies MEF. La **Figura 26B** mostra que les cèl·lules MEF TRIB3<sup>-/-</sup> són més resistents a la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812. En conjunt, aquests resultats atorguen a TRIB3 un paper central en el mecanisme d'acció de l'ABTL0812, essent medidora en la inhibició de l'eix Akt/mTORC1 i, en conseqüència, de la mort cel·lular mediada per autofàgia.



**Figura 26: TRIB3 media en la inducció d'autofàgia i la citotoxicitat induïda per ABTL0812.** **A**, Cèl·lules transformades MEF salvatges (TRIB3<sup>+/+</sup>) i deficientes en TRIB3 (TRIB3<sup>-/-</sup>) van ser tractades 24 h amb ABTL0812 a les concentracions indicades, i els nivells de TRIB3, p-Akt (S473), p-S6 i lipídació de LC3 (LC3-II) analitzats per immunoblot. Els nivells d'actina s'empren com a control de càrrega. Es van obtenir resultats anàlegs en 3 experiments diferents. **B**, Cèl·lules MEF TRIB3<sup>+/+</sup> (columnes blanques) i TRIB3<sup>-/-</sup> (columnes negres) van ser tractades 24 h amb ABTL0812 a les concentracions indicades. La viabilitat cel·lular fou determinada per assaig de MTT. Cada valor representa la mitjana ± SD de 3 experiments diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules MEF TRIB3<sup>+/+</sup>.

Els resultats obtinguts ens van permetre definir un model de mecanisme d'acció de l'ABTL0812. Aquest compost, un cop dins de la cèl·lula tumoral, activaria els receptors PPAR $\alpha/\gamma$  que indueixen la sobreexpressió de la pseudoquinasa TRIB3. TRIB3 uneix Akt i impedeix la seva fosforilació als residus Thr308 (fosforilat per PDK1) i Ser473 (fosforilada per mTORC2), crítics per a la plena activació d'Akt. Conseqüentment es produeix la inhibició de l'eix Akt/mTORC1. Finalment, la inhibició del complex mTORC1 comportaria l'activació d'autofàgia que media en la mort induïda per l'ABTL0812 (**Figura 27**).



**Figura 27: Model del mecanisme d'acció de l'ABTL0812 (Erazo et al., 2016).** L'ABTL0812 activa els receptors PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ , que induïxen la sobreexpressió de la pseudoquinasa TRIB3. TRIB3 s'uneix a Akt i impedeix la seva fosforilació en els residus Ser473 (fosforilat pel complex mTORC2) i Thr308 (fosforilat per PDK1), crítics per a la plena activació d'Akt. Conseqüentment es produeix la inhibició de mTORC1, que comporta l'activació robusta d'autòfàgia, que mediarà la mort cel·lular induïda per l'ABTL0812. Figura extreta d'Erazo et al., 2016.

### 1.5- Monitorització de la fosforilació de la Ser473 d'Akt com a marcador farmacodinàmic de la Fase Clínica 1

La Fase 1 de desenvolupament clínic de l'ABTL0812 es va dur a terme a l'Hospital Clínic de Barcelona en pacients amb tumors sòlids en estat avançat (identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT02201823). L'ABTL0812 va ser aprovat per al tractament en humans degut al seu baix perfil toxicològic i al potencial benefici que podia suposar per a pacients oncològics sense alternatives terapèutiques. La Fase Clínica 1 va consistir en un procés d'escalat de dosi d'ABTL0812 (dividit en una primera fase d'escalat i una segona fase d'extensió) que perseguia dos objectius: (1) avaluar possibles efectes tòxics derivats del tractament amb ABTL0812 per definir la seva finestra terapèutica; i (2) determinar la pauta d'administració òptima per garantir una biodisponibilitat màxima del compost. Per al desenvolupament clínic de l'ABTL0812 era imprescindible

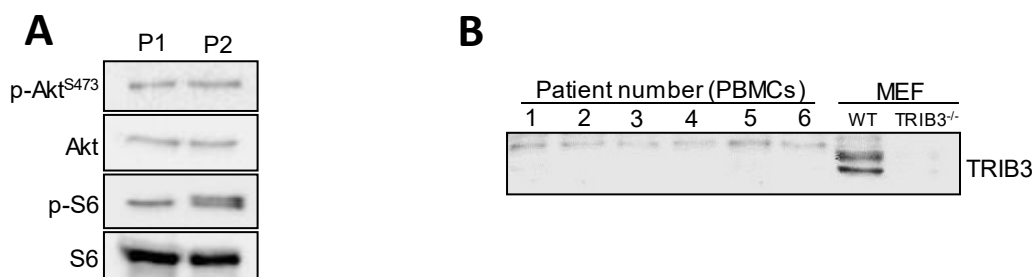


## RESULTATS – CAPÍTOL 1

identificar marcadors farmacodinàmics que permetessin monitoritzar si les pautes de tractament aplicades tenien efecte sobre els pacients.

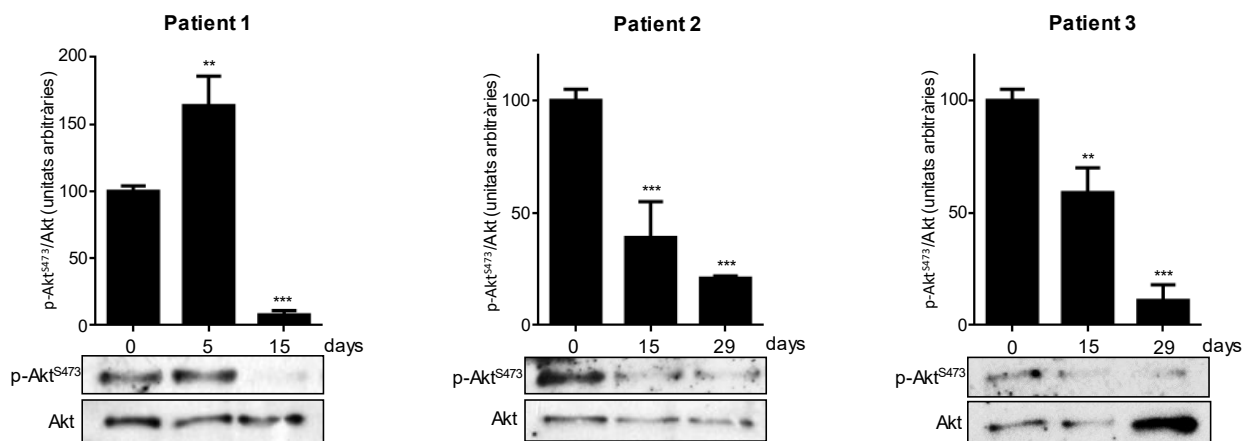
La presa de sang per venopunció és un mètode rutinari i poc invasiu d'obtenció de mostra biològica. Considerant el mecanisme d'acció de l'ABTL0812 caracteritzat, es va decidir monitoritzar l'estat d'activació de l'eix Akt/mTORC1 i dels nivells de TRIB3 a les mostres sanguínies dels pacients enrolats a la Fase Clínica 1. Amb aquest objectiu, es va optimitzar un mètode d'aïllament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) per monitoritzar per assaig d'immunoblot la fosforilació d'Akt (Ser473) i S6 (Ser235-236), i dels nivells de TRIB3. Una PBMC es defineix com a tota cèl·lula sanguínia que té un nucli arrodonit, com ara els limfòcits o monòcits. Aquest tipus de cèl·lules són molt sensibles a estímuls externs i reben l'efecte d'un tractament quan aquest assoleix el torrent sanguini, característiques que les fa bones candidates per a l'anàlisi de biomarcadors farmacodinàmics.

Per optimitzar el protocol d'aïllament de PBMCs i la detecció dels marcadors per immunoblot es va treballar amb mostres sanguínies de donadors sans. A partir de 8 ml de mostra de sang es van obtenir pellets de PBMCs dels que es van poder extreure 3 mg de proteïna, quantitat de proteïna suficient per dur a terme l'estudi dels biomarcadors mitjançant assaig d'immunoblot. La **Figura 28A** mostra la detecció exitosa de les proteïnes Akt i S6, i dels seus nivells de fosforilació, utilitzant 20 µg de proteïna procedent de lisats cel·lulars de PBMCs aïllades de la sang de dos pacients sans diferents. Per contra, amb els anticossos disponibles no es va poder detectar TRIB3 als lisats de PBMCs. Mentre que al control positiu de detecció de TRIB3 (cèl·lules MEF WT) s'aprecien dues bandes intenses, a les mostres de PBMCs procedents de 6 pacients sans diferents només es detecta una banda inespecífica de pes molecular superior al de TRIB3 (42-44 kDa), que no es detecta al control negatiu de detecció de TRIB3 (cèl·lules MEF TRIB3<sup>-/-</sup>) (**Figura 28B**).



**Figura 28:** L'anàlisi per immunoblot de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) permet la monitorització de la fosforilació d'Akt i S6, però no de TRIB3. **A**, PBMCs aïllades de mostres sanguínies de dos pacients sans (P1, P2) van ser lisades i els nivells de fosforilació d'Akt (Ser473) i S6 (Ser235-236), i els de les proteïnes Akt i S6, monitoritzats per immunoblot. **B**, Lisats de PBMCs aïllades de mostres sanguínies de 6 pacients sans van ser analitzats per immunoblot per visualitzar els nivells de TRIB3. Com a control de detecció s'analitzaren lisats de cèl·lules MEF salvatges (WT) i MEF TRIB3<sup>-/-</sup>.

A continuació, es va monitoritzar la fosforilació de la Ser473 d'Akt i de les Ser235-236 de S6 a les PBMCs aïllades de mostres sanguínies de pacients enrolats a la Fase Clínica 1. Els pacients de la cohort 4 van ser sotmesos a un tractament crònic de 4,000 mg d'ABTL0812 diaris (repartits en 2 preses) i les mostres sanguínies es van obtenir en diferents dies durant el període de tractament. La **Figura 29** mostra que el tractament amb ABTL0812 resulta en la disminució progressiva i significativa de la fosforilació d'Akt (Ser473) a les PBMCs dels pacients. La fosforilació detectada de la proteïna S6 era molt variable i va ser descartada com a marcador farmacodinàmic (resultats no mostrats).

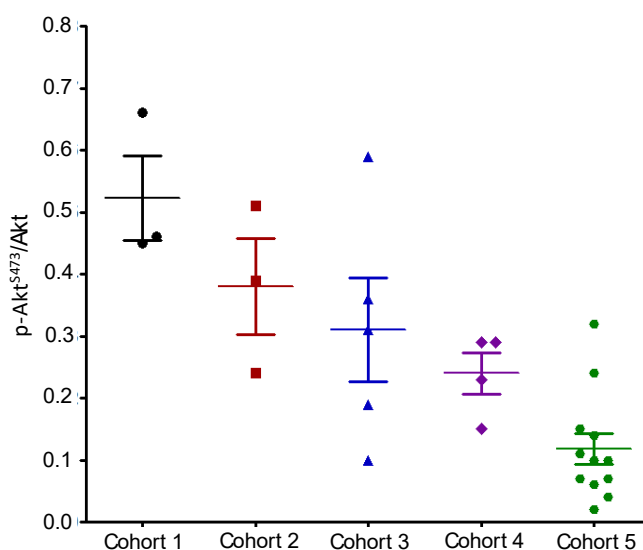


**Figura 29: El tractament amb ABTL0812 redueix la fosforilació d'Akt en pacients de la Fase Clínica 1.** Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) foren aïllades de mostres sanguínies de pacients abans (dia 0) o després de rebre un tractament oral crònic de 4,000 mg d'ABTL0812 al dia (dia 5, dia 15, dia 29). Les PBMCs foren lisades i els nivells de fosfo-Akt-Ser473 i de la proteïna Akt analitzats per immunoblot. Els histogrames superiors corresponen a la quantificació dels nivells de fosfo-Akt-Ser473 amb unitats densitomètriques. Els nivells de fosfo-Akt-S473 van ser normalitzats pels d'Akt total. Es van obtenir resultats similars en 3 determinacions diferents. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les PBMCs obtingudes el dia 0.

Aquests resultats preliminars ens van animar a establir la fosforilació d'Akt com a biomarcador farmacodinàmic de la Fase Clínica 1. Malgrat que l'assaig per immunoblot havia permès visualitzar la fosforilació d'Akt, l'anàlisi de les mostres dels pacients necessitava un mètode més sensible i sotmès a menys factors de variabilitat. Amb aquest objectiu, es va subcontractar l'empresa Kymos Pharma Services per a què duqués a terme l'anàlisi dels nivells de la proteïna Akt i la seva fosforilació (residu Ser473) a cèl·lules plaquetàries. Diversos autors han reportat la detecció de la fosforilació d'Akt en cèl·lules plaquetàries com a biomarcador farmacodinàmic ja que aquest tipus cel·lular té uns nivells basals d'activació d'Akt alts, fet que facilita la monitorització de canvis en la seva fosforilació (Smith et al., 2016). Kymos Pharma Services disposa de la tecnologia *Meso Scale Discovery*, una plataforma d'anàlisi basada en immunoassaig enzimàtic que presenta alta sensibilitat i permet la quantificació simultània dels nivells de la proteïna Akt i de la seva

fosforilació a les cèl·lules plaquetàries aïllades de les mostres sanguínies dels pacients (Bastarache et al., 2014).

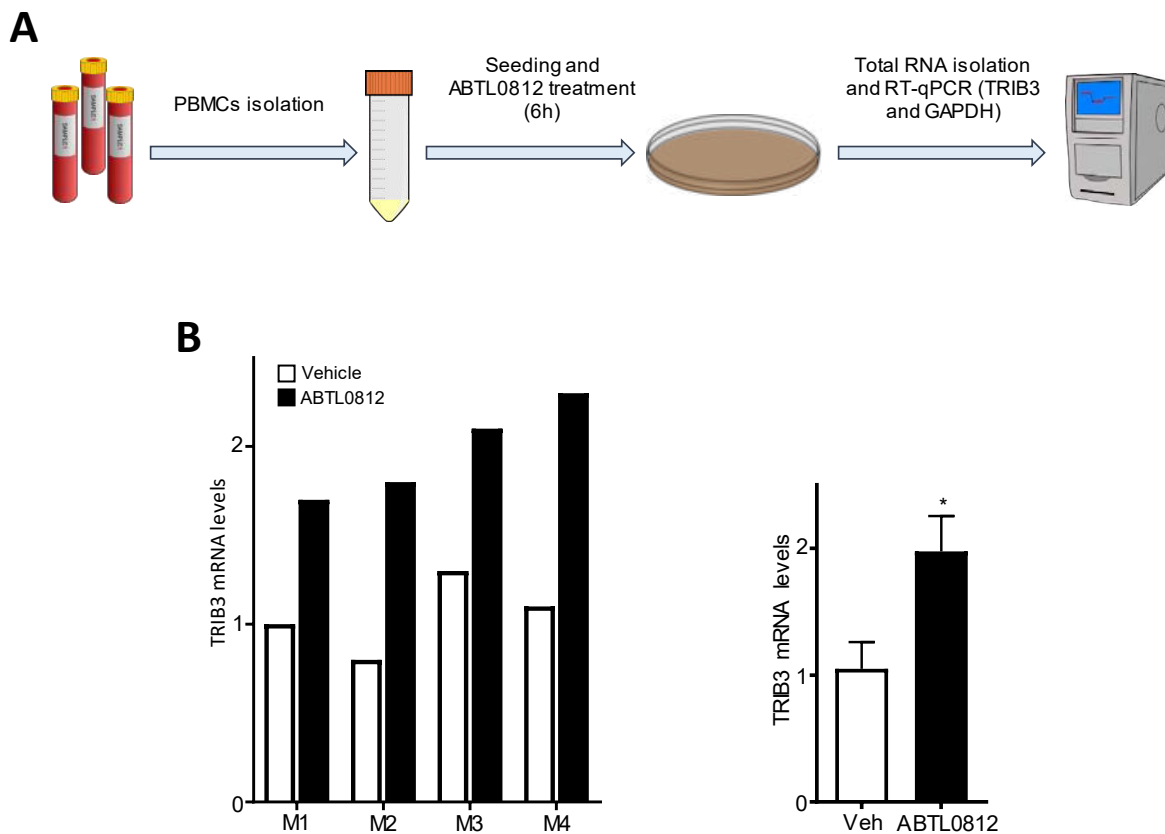
Inicialment els pacients van ser tractats amb una dosi diària de 500 mg d'ABTL0812 (cohort 1) i el patró de dosatge es va anar modificant per maximitzar la biodisponibilitat del compost. Finalment es va establir com a òptima una dosi de 4,000 mg diaris repartits en tres dosis de 1,300 mg, que permetia assolir de forma mantinguda una concentració màxima d'ABTL012 en sang (cohort 5; dosatge utilitzat actualment a la Fase Clínica 2). Els resultats obtinguts utilitzant la tecnologia *Meso Scale Discovery* van permetre fer el seguiment dels pacients inclosos a les diferents cohorts de dosatge d'ABTL0812 i determinar si l'increment de la biodisponibilitat del fàrmac assolit amb el canvi de pauta d'administració correlacionava amb un efecte superior de l'ABTL0812 sobre l'organisme. La **Figura 30** mostra els nivells de fosforilació d'Akt (Ser473) plaquetari dels pacients de cadascuna de les cohorts de dosatge de la Fase Clínica 1 (5 cohorts en total), i s'observa que el procés d'optimització de dosatge correlaciona amb una disminució de la fosforilació de l'Akt plaquetari dels pacients.



**Figura 30: Monitorització de la fosforilació d'Akt plaquetari en pacients de les 5 cohorts de la Fase Clínica 1.** Cèl·lules plaquetàries foren aïllades de mostres sanguínies de pacients enrolats a la Fase Clínica 1, i els nivells de fosfo-Akt-Ser473 i de la proteïna Akt analitzats mitjançant la tecnologia *Meso Scale Discovery* (Kymos Pharma Services). Les dades s'expressen com a ràtio de senyal de fosfo-Akt-Ser473/Akt per a cada cohort de pacients de la Fase Clínica 1. Cohort 1, 500 mg q.d.; Cohort 2, 1,000 mg q.d.; Cohort 3, 1,000 mg bid; Cohort 4, 2,000 mg bid; Cohort 5, 1,300 mg tid. Per a cada cohort es mostra la mitjana  $\pm$  SD. q.d. (*quaque a die*); bid (*bis in die*); tid (*ter in die*).

### 1.6- TRIB3 com a marcador farmacodinàmic en pacients de la Fase Clínica 2

Malgrat que l'ABTL0812 indueix una sobreexpressió robusta de TRIB3, no s'havien pogut monitoritzar els nivells de TRIB3 per immunoblot a les PBMCs aïllades de les mostres sanguínies dels pacients avaluats. Com a alternativa, es va optimitzar la quantificació dels nivells de l'mRNA de TRIB3 per RT-qPCR a les cèl·lules PBMCs, una tècnica més sensible que l'immunoblot. Les PBMCs aïllades de sang de pacients sans es van sembrar en placa de petri, es van incubar durant 6 hores amb ABTL0812, se'n va aïllar l'RNA total i es va quantificar l'mRNA de TRIB3 per RT-qPCR (**Figura 31A**). La **Figura 31B** mostra que el protocol dissenyat permet monitoritzar l'increment del mRNA de TRIB3 induït pel tractament amb ABTL0812 a les PBMCs procedents de cinc pacients sans diferents. L'ABTL0812 va induir l'augment dels nivells de mRNA de TRIB3 en totes les mostres analitzades, obtenint de mitjana un increment significatiu del 100%.



**Figura 31: L'anàlisi per RT-qPCR permet la monitorització dels nivells de l'mRNA de TRIB3 en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs).** **A**, Esquema del protocol utilitzat per posar a punt la quantificació de TRIB3 per RT-qPCR. PBMCs aïllades de mostres sanguínies de pacients sans foren sembrades i tractades durant 6 h amb vehicle (etanol) o ABTL0812 100  $\mu$ M. Les cèl·lules van ser pelletejades, l'RNA total extret i els nivells de mRNA de TRIB3 avaluats per RT-qPCR. **B**, Resultats obtinguts en mostres de PBMCs procedents de mostres sanguínies de 4 pacients sans diferents (M1, M2, M3, M4) tractades amb vehicle (columnes blanques) o ABTL0812 (columnes negres) *in vitro*. **Histograma esquerre**: nivells d'mRNA de TRIB3 per cada mostra expressats com a ràtio de canvi respecte de la mostra M1 tractada amb vehicle (columna blanca) i normalitzat a 1. **Histograma dret**: les dades representades corresponen a la mitjana  $\pm$  SD de totes les mostres analitzades (M1, M2, M3, M4; vehicle o ABTL0812) i mostren la ràtio de canvi dels nivells de mRNA de TRIB3 respecte de les PBMCs tractades amb vehicle i normalitzat a 1. \*,  $P < 0.05$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

## RESULTATS – CAPÍTOL 1

---

La disponibilitat de mostra dels pacients enrolats a les fases de desenvolupament clínic és limitada i el mètode de detecció del biomarcador ha de ser reproduïble. D'acord amb aquestes consideracions, ens vam proposar simplificar el protocol d'anàlisi dels nivells de l'mRNA de TRIB3 i reduir el volum de mostra sanguínia a utilitzar. Amb aquesta finalitat, es va prescindir de la fase d'aïllament de les PBMCs, que requereix un mínim de 8 ml de sang i és un protocol llarg i poc reproduïble. Com a alternativa, es va utilitzar un kit comercial (descriu a l'apartat de Material i Mètodes) optimitzat per a l'extracció de RNA total directament de sang, emprant poc volum de mostra (0.5 ml) (**Figura 32A**).

El nou protocol de detecció de TRIB3 no va poder ser utilitzat durant la Fase Clínica 1 però sí a la Fase Clínica 2 que s'està duent a terme en l'actualitat. L'ABTL0812 és administrat com a primera línia de tractament en combinació amb quimioteràpia estàndard (2 cicles de carboplatí i paclitaxel) a pacients amb càncer d'endometri avançat i càncer escamós de pulmó NSCLC (identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT03366480).

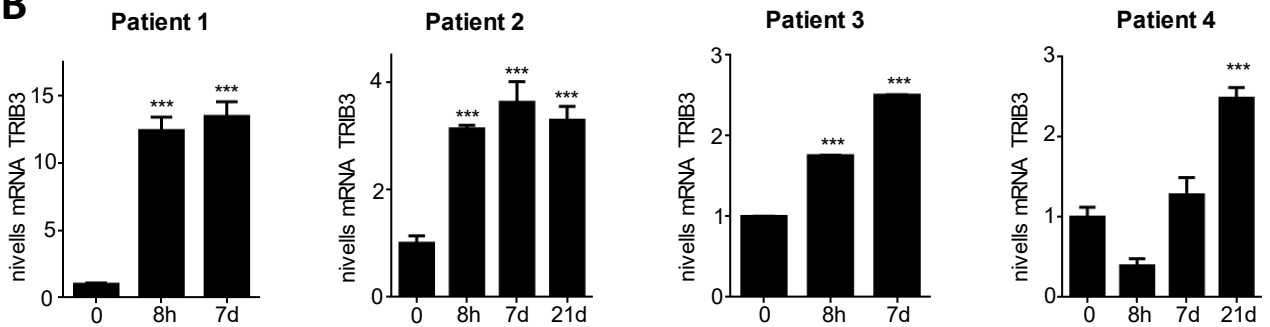
En aquesta fase 2, els pacients són tractats crònicament amb ABTL0812 i prenen una dosi diària de 4,000 mg repartits en tres preses de 1,300 mg. Les mostres sanguínies es recullen abans de la primera presa d'ABTL012 (0), passades 8 hores des de la primera presa (8h), i els dies 7 i 21 de tractament (7d i 21d). Fins al moment, s'han pogut analitzar les mostres procedents de 4 pacients. La **Figura 32B** mostra que a les 8 hores de tractament hi ha un increment marcat (d'entre 3 i 10 vegades) de l'mRNA de TRIB3 en tots els pacients, a excepció del pacient 4. En tots els casos, els nivells del mRNA de TRIB3 incrementen de forma progressiva a mesura que avança el tractament amb ABTL0812. La manca de mostres corresponents al dia 21 dels pacients 1 i 3 va ser deguda a problemes en l'extracció de sang o a un aïllament de RNA deficient.

El protocol que s'ha posat a punt per a la quantificació de l'mRNA de TRIB3 directament de mostra sanguínia està sent utilitzat en l'actualitat a la Fase Clínica 2, conjuntament amb la determinació de fosfo-Akt-Ser473 plaquetari (*Meso Scale Discovery*). Aquesta és la primera vegada que s'estableix l'mRNA de TRIB3 com a biomarcador farmacodinàmic pel desenvolupament pre-clínic i clínic d'un fàrmac.

**A**



**B**



**Figura 32: El tractament amb ABTL0812 induïx un augment dels nivells de l'mRNA de TRIB3 en pacients de la Fase Clínica 2. A,** Diagrama del protocol seguit per a l'anàlisi dels nivells de l'mRNA de TRIB3 a partir de sang total dels pacients inclosos en la Fase Clínica 2. L'RNA total va ser extret directament de mostres sanguínies dels pacients, i els nivells de l'mRNA de TRIB3 avaluats per RT-qPCR. Els nivells de mRNA de GAPDH són emprats com a normalitzador. **B,** Nivells de mRNA de TRIB3 en pacients abans (dia 0) o després de rebre un tractament oral crònic de 4,000 mg d'ABTL0812 al dia (8 h, 7 dies, 21 dies). Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte del dia 0 de tractament.



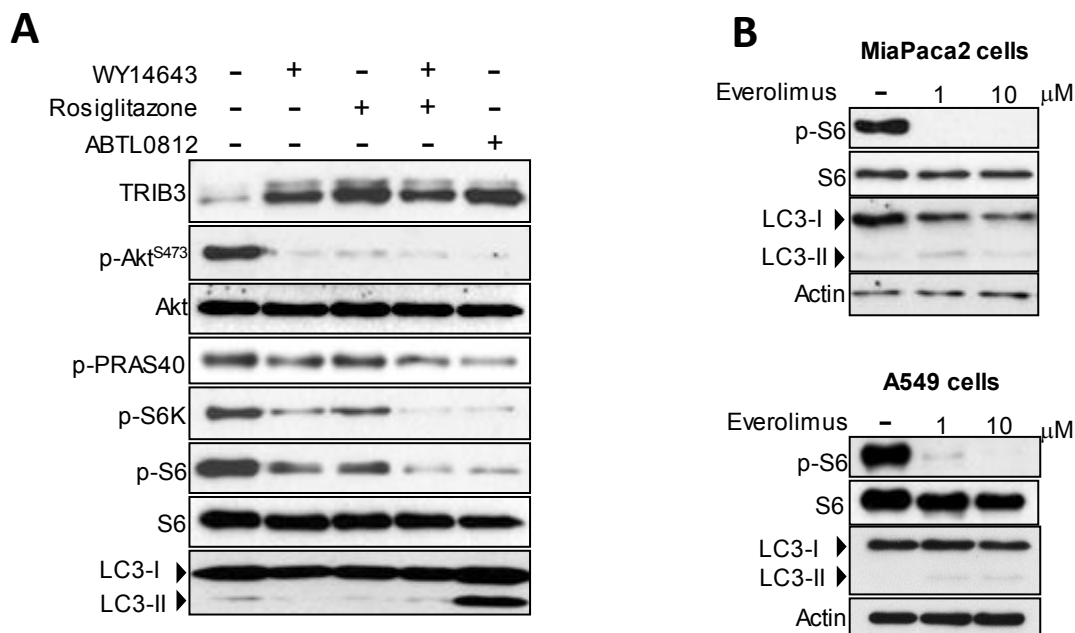
## **RESULTATS – CAPÍTOL 2**

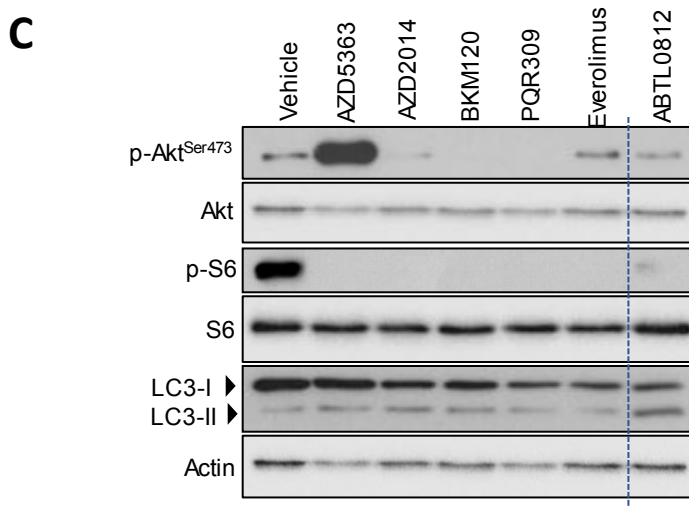




El mecanisme d'acció de l'ABTL0812 descrit pel nostre grup consisteix que l'ABTL0812 actua com agonista dels receptors PPAR  $\alpha$  i  $\gamma$ . L'activació dels PPAR $\alpha/\gamma$  indueix l'expressió de la pseudoquinasa TRIB3, que uneix i inhibeix Akt. La baixada d'activitat d'Akt comporta la inhibició de l'eix Akt-mTORC1, fet que activa una autofàgia robusta que provoca la mort de les cèl·lules tumorals (Erazo et al., 2015). Amb l'objectiu de validar aquest mecanisme d'acció, es van comparar els marcadors bioquímics de cèl·lules A549 tractades amb ABTL0812 amb els de cèl·lules tractades amb agonistes específics del receptor PPAR $\alpha$  (WY14643) i PPAR $\gamma$  (Rosiglitazona). Si l'ABTL0812 actua com a agonista d'aquests receptors, l'activació dels PPAR amb agonistes específics hauria de reproduir els efectes bioquímics propis del tractament amb ABTL0812: sobreexpressió de TRIB3, inhibició de l'eix Akt/mTORC1 i inducció d'autofàgia.

La **Figura 33A** mostra que: (1) El tractament per separat amb els agonistes de PPAR $\alpha/\gamma$  indueix la sobreexpressió de la pseudoquinasa TRIB3 i la subseqüent inhibició de la fosforilació d'Akt al residu serina 473, fosforilat pel complex mTORC2. En conseqüència, s'observa la baixada en la fosforilació del substrat d'Akt PRAS40, i dels substrats de mTORC1 S6K (S6 kinase) i S6. Tanmateix, la inhibició de la fosforilació de PRAS40, S6K i S6 és parcial i els nivells de fosforilació són més alts que els mostrats per les cèl·lules tractades amb ABTL0812. (2) El tractament combinat dels dos agonistes de PPAR $\alpha/\gamma$  sí que inhibeix el complex mTORC1 de forma anàloga a l'ABTL0812. (3) Malgrat que el tractament combinat amb els agonistes dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$  inhibeix mTORC1, no hi ha activació d'autofàgia (visualitzat pel marcador d'autofagosomes LC3-II). Per altra banda, la inhibició del complex mTORC1 per l'inhibidor específic Everolimus no indueix autofàgia robusta a cèl·lules MiaPaca2 i A549 (**Figura 33B**).





**Figura 33: La inhibició de mTORC1 pels agonistes dels receptors PPAR $\alpha$  (WY14643) i PPAR $\gamma$  (Rosiglitazona) i el tractament amb inhibidors específics de la via PI3K-Akt-mTORC1 no indueixen autofàgia.** **A**, Cèl·lules tumorals humanes A549 foren tractades 24 h amb ABTL0812 (100  $\mu$ M), WY14646 (1  $\mu$ M), Rosiglitazona (1  $\mu$ M) o la combinació dels dos agonistes dels receptors PPAR. Les cèl·lules van ser lisades i es va monitoritzar la sobreexpressió de TRIB3, l'estat d'activació de l'eix Akt/mTORC1 i la lipidació de LC3 (LC3-II) per immunoblot. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments separats. **B**, Cèl·lules MiaPaca2 i A549 foren tractades 24 h amb Everolimus (1 i 10  $\mu$ M), lisades, i els nivells de fosforilació de la proteïna S6 i la lipidació de LC3 (LC3-II) es visualitzaren per immunoblot. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments separats. **C**, Cèl·lules A549 van ser tractades durant 24 h amb AZD5363 (inhibidor quinasa pan-Akt; 25  $\mu$ M), AZD2014 (inhibidor competitiu de mTOR; 0.1  $\mu$ M), BKM120 (inhibidor pan PI3K de Classe I; 10  $\mu$ M), PQR309 (inhibidor pan PI3K de Classe I/mTOR; 0.5  $\mu$ M), Everolimus (inhibidor mTOR; 10  $\mu$ M) i ABTL0812 (100  $\mu$ M). Posteriorment, les cèl·lules van ser lisades i els nivells de la proteïna Akt, S6, la fosforilació d'Akt (Ser473) i S6 (Ser235-236) i la lipidació de LC3 (LC3-II) visualitzats per immunoblot. Els nivells d'actina es van utilitzar com a control de càrrega. Es van obtenir resultats anàlegs en 3 experiments diferents.

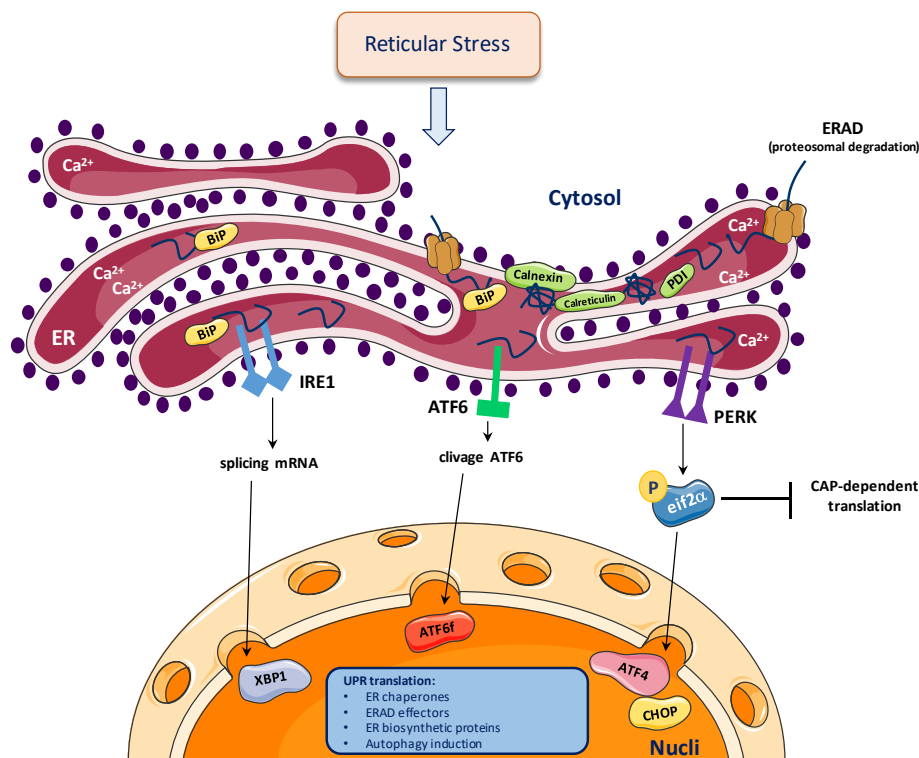
Donat que la inhibició específica de mTORC1 no indueix autofàgia a les cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549, a continuació es va estudiar si el tractament amb diferents composts inhibidors de la via PI3K-Akt-mTORC1 (que estan en desenvolupament clínic) era capaç d'induir autofàgia robusta. La **Figura 33C** mostra que el tractament amb els inhibidors pan-PI3K de Classe I BKM120 i PQR309, l'inhibidor competitiu de mTOR AZD2014 o l'inhibidor quinasa pan-Akt AZD5363 resulten en una inhibició robusta del complex mTORC1 però, malgrat això, no activen autofàgia en nivells anàlegs als mostrats per l'ABTL0812. D'interès, s'observa un augment robust de la fosforilació del residu Ser473 d'Akt com a resposta cel·lular a la inhibició de l'activitat quinasa d'Akt per l'inhibidor AZD5363. El tractament amb Everolimus ratifica els resultats obtinguts anteriorment (**Figura 33B**).

El tractament amb ABTL0812 no indueix apoptosi, activa autofàgia robusta i és altament citotòxic, mentre que el tractament amb inhibidors de mTORC1 promou un fenotip apoptòtic, no sempre indueix autofàgia i és citostàtic. Així mateix, el tractament amb inhibidors específics de diferents components de la via PI3K-

Akt-mTORC1 no indueix autofàgia a les cèl·lules tumorals model A549. Aquestes consideracions ens van fer contemplar la hipòtesi d'un mecanisme addicional que expliqués la inducció robusta d'autofàgia per part de l'ABTL0812.

### 2.1- L'ABTL0812 indueix estrès reticular a les cèl·lules tumorals

Donat que la sobre-expressió de TRIB3 i inducció d'autofàgia són els esdeveniments moleculars més característics del tractament amb ABTL0812, es van considerar mecanismes que relacionessin ambdós esdeveniments. Diferents autors han identificat composts amb activitat antitumoral, com ara els cannabinoides, que exerceixen el seu efecte a través de la inducció d'estrès reticular i l'activació de la resposta UPR (*unfolded protein reponse*) (Figura 34), que comporta la sobreexpressió de TRIB3, inhibició de l'eix Akt/mTORC1 i mort cel·lular mediada per autofàgia (Salazar et al., 2009b; Verfaillie et al., 2010; Salazar et al., 2013).

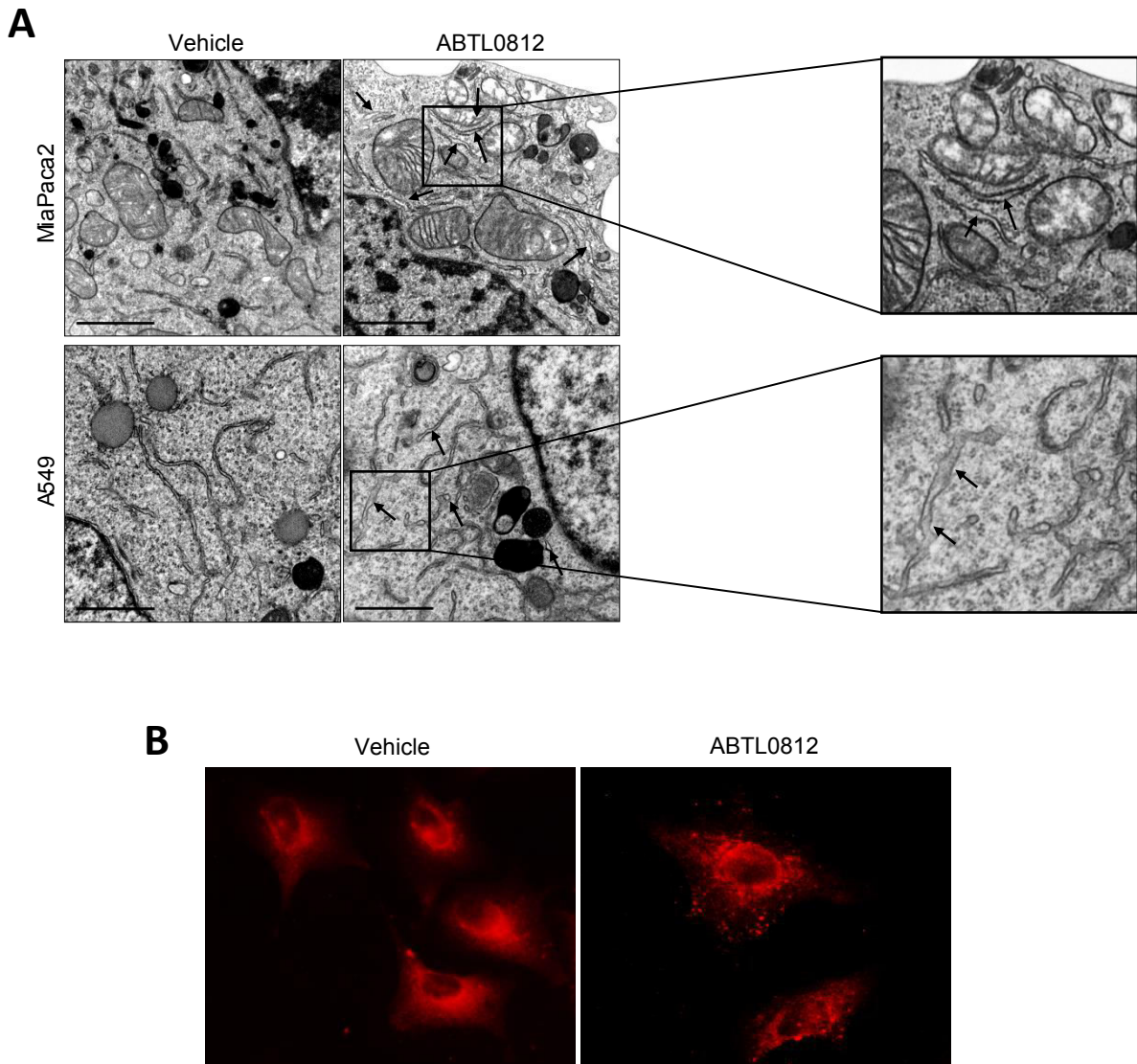


**Figura 34: Esquema de les vies de senyalització que articulen la resposta UPR activada per l'estrès reticular.**

L'estrès reticular comporta l'alteració de les condicions que permeten el correcte plegament proteic a l'interior del reticle endoplasmàtic (RE). Aquest fet condueix a l'acumulació de proteïna mal plegada o parcialment plegada al reticle, que s'acumulen i formen agregats. Amb la finalitat de respondre a aquesta situació que compromet la viabilitat cel·lular, s'activa l'anomenada resposta UPR (*Unfolded Protein Response*). Els receptors transmembrana IRE1, ATF6 i PERK i la xaperona BiP actuen de sensors. Les vies de senyalització activades articulen els 3 eixos bàsics de la resposta UPR, consistents en: la *down*-regulació general de la traducció proteica, la síntesi selectiva de xaperones i proteïnes pròpies del RE que estabilitzin les proteïnes no plegades i permetin el seu correcte plegament, i la degradació de l'excés de proteïna mal plegada potenciant la via ERAD (*Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation*) i activant l'autofàgia.

## RESULTATS – CAPÍTOL 2

A continuació, es van analitzar per microscòpia electrònica mostres de cèl·lules MiaPaca2 i A549 tractades amb ABTL0812 en què prèviament s'havia validat la formació d'autofagosomes en resposta al tractament, per determinar si s'apreciaven evidències d'inducció d'estrès reticular. La dilatació del reticle endoplasmàtic (RE) és una de les principals característiques a nivell morfològic que identifiquen l'existència d'estrès reticular (Smith and Wilkinson, 2017). L'eixamplament del lumen del RE permet incrementar la capacitat de càrrega de proteïna.



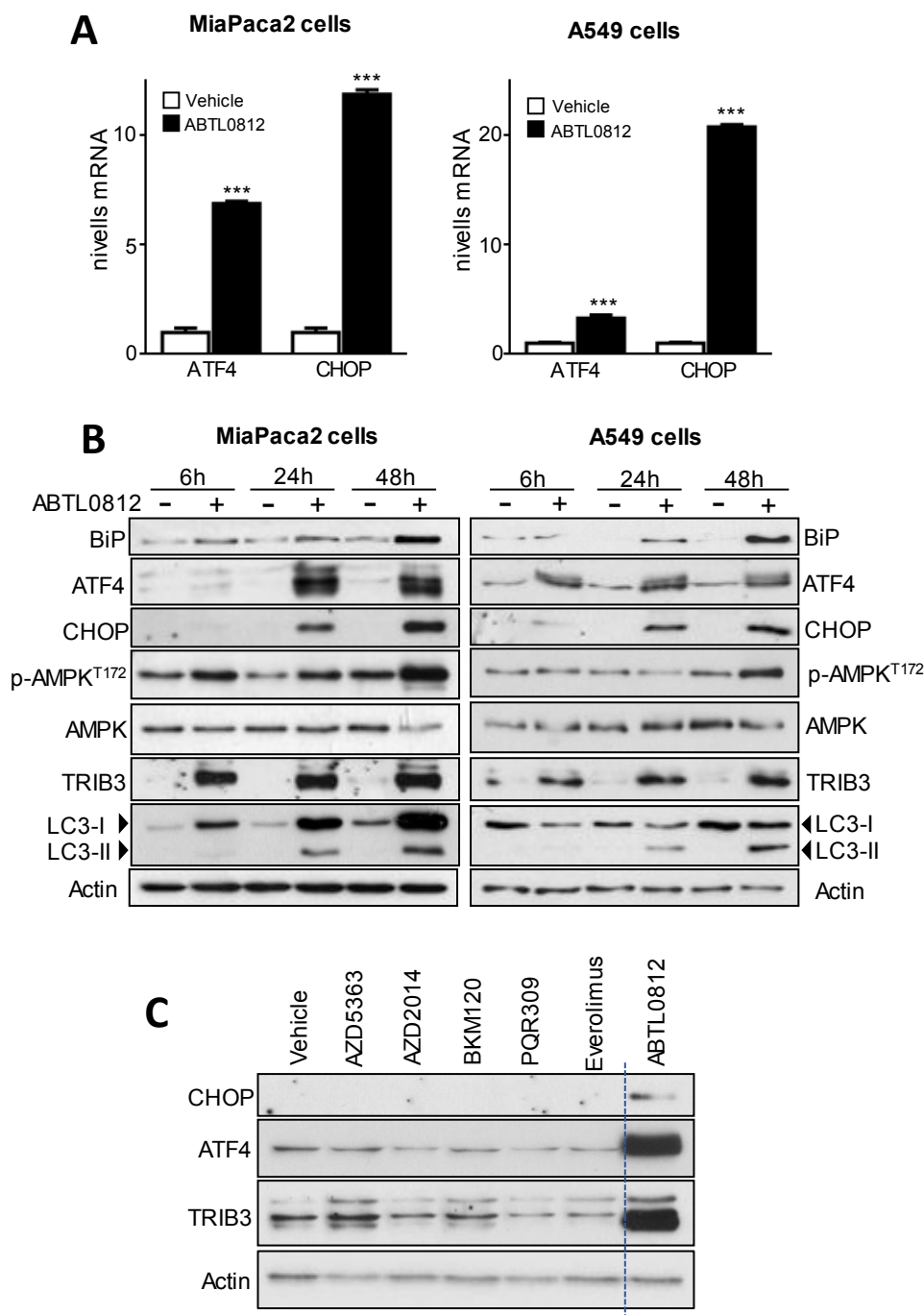
**Figura 35: L'ABTL0812 indueix dilatació de reticle endoplasmàtic a les cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549. A,** Imatges representatives de microscòpia electrònica que mostren dilatacions del reticle endoplasmàtic (fletxes) en cèl·lules de càncer de pàncrees (MiaPaca2) i pulmó (A549) humà. Les cèl·lules foren tractades 10 h amb ABTL0812 60  $\mu$ M, processades com s'indica a l'apartat de material i mètodes i visualitzades per microscòpia de transmissió electrònica (TEM). Barra d'escala, 1  $\mu$ m. **B,** Tinció per immunocitoquímica de la proteïna PDI en cèl·lules A549 tractades 16 h amb vehicle o ABTL0812 100  $\mu$ M. Les cèl·lules van ser processades com s'indica a l'apartat de material i mètodes i visualitzades per microscòpia d'epifluorescència.

La **Figura 35A** mostra les imatges obtingudes al microscopi de transmissió electrònica de cèl·lules MiaPaca2 i A549 tractades amb ABTL0812, en què s'observa que el tractament amb ABTL0812 induïx a ambdues línies cel·lulars l'aparició de fragments de RE amb una amplitud de lumen superior al de les cèl·lules tractades amb vehicle. La dilatació del RE també es pot monitoritzar per marcatge immunocitoquímic de la proteïna resident PDI. En condicions basals el patró de marcatge és uniforme, mentre que quan hi ha estrès reticular i el reticle endoplasmàtic es dilata el patró de marcatge de PDI esdevé puntejat. El tractament amb ABTL0812 induïx un patró puntejat de PDI (**Figura 35B**). Els resultats suggerien que l'ABTL0812 induïa estrès reticular.

Per validar la inducció d'estrès reticular, es van tractar cèl·lules MiaPaca2 i A549 amb ABTL0812 i es van monitoritzar marcadors propis de la resposta UPR (**Figura 34**), tals com l'augment d'expressió de la xaperona BiP, i dels factors de transcripció ATF-4 i CHOP o la fosforilació d'AMPK. La **Figura 36A** mostra que l'ABTL0812 induïx un increment robust dels nivells dels mRNA d'ATF4 (700% a les cèl·lules MiaPaca2 i 500% a les A549), i de CHOP (1,200% a MiaPaca2 i 2,000% a A549). Per altra banda, es va constatar, per assaig d'immunoblot, que el tractament amb ABTL0812 induïx l'augment d'expressió de la xaperona BiP i dels factors de transcripció ATF4 i CHOP (**Figura 36B**). S'ha descrit que l'estrès reticular induïx un increment de  $Ca^{2+}$  citosòlic que promou l'activació de la quinasa CAMKK2, que subseqüentment activa AMPK per fosforilació de la treonina 172 (Fogarty et al., 2010). En consonància amb els resultats anteriors que mostraven una activació de l'estrès reticular, el tractament amb ABTL0812 també va induir un augment de la fosforilació d'AMPK (Thr172) a les cèl·lules MiaPaca2 i A549 (**Figura 36B**).

A continuació, ens vam plantejar si la inhibició de l'eix Akt/mTORC1 podia contribuir a la inducció d'estrès reticular observada en resposta al tractament amb ABTL0812. Amb aquesta finalitat es va dissenyar un experiment en què es va testar l'efecte de diferents inhibidors específics de la via PI3K-Akt-mTORC1. La **Figura 36C** mostra que els inhibidors de PI3K (BKM120, PQR309), d'Akt (AZD5363) o de mTOR (AZD2014, Everolimus) no induïxen estrès reticular a les cèl·lules A549.

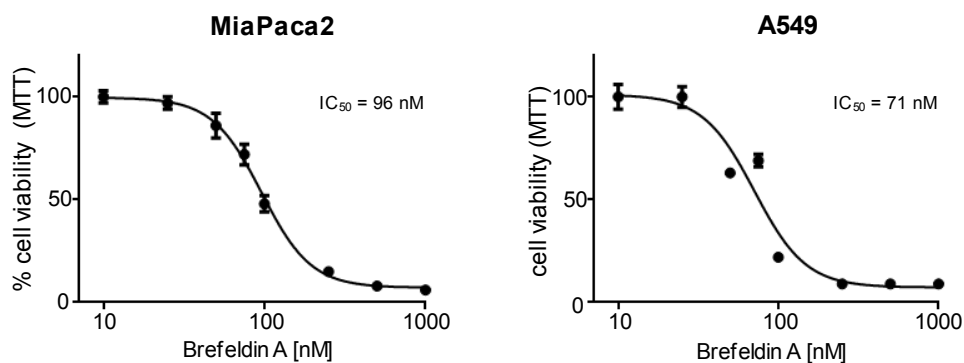
El conjunt de resultats obtinguts mostren que el tractament amb ABTL0812 induïx la dilatació del RE, una robusta inducció gènica d'ATF4 i CHOP, i l'augment d'expressió proteica de marcadors d'estrès reticular (BiP, ATF4, CHOP) i l'activació d'AMPK. Aquestes evidències demostren que l'ABTL0812 induïx estrès reticular i activació de la resposta UPR a les cèl·lules MiaPaca2 i A549. A continuació, es va estudiar si l'estrès reticular era rellevant en la mediació de l'efecte antitumoral mostrat per l'ABTL0812.



**Figura 36: L'ABTL0812 indueix estrès reticular a les cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549.** **A**, Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser tractades 24 h amb ABTL0812 100  $\mu$ M. Les cèl·lules foren pelletejades, s'extragué l'RNA total, i els nivells de l'mRNA d'ATF4 i CHOP s'analitzaren mitjançant RT-qPCR, i es normalitzaren pels nivells de l'mRNA de GAPDH. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. **B**, Les cèl·lules foren tractades 6, 24 i 48 h amb ABTL0812 100  $\mu$ M, lisades, i s'analitzaren els nivells dels marcadors d'estrès reticular BiP, p-eif2 $\alpha$ , ATF4, CHOP i TRIB3 per immunoblot. Els nivells del marcador d'autofàgia LC3 es monitoritzaren per assegurar que el tractament amb ABTL0812 s'havia aplicat correctament. Es varen obtenir resultats similars en 3 experiments separats. **C**, Cèl·lules A549 van ser tractades durant 24 h amb AZD5363 (inhibidor quinasa pan-Akt; 25  $\mu$ M), AZD2014 (inhibidor competitiu de mTOR; 0.1  $\mu$ M), BKM120 (inhibidor pan PI3K de Classe I; 10  $\mu$ M), PQR309 (inhibidor pan PI3K de Classe I/mTOR; 0.5  $\mu$ M), Everolimus (inhibidor mTOR; 10  $\mu$ M) i ABTL0812 (100  $\mu$ M). Posteriorment, les cèl·lules van ser lisades, i els nivells dels marcadors d'estrès reticular CHOP, ATF4 i TRIB3, visualitzats per immunoblot. Els nivells d'actina es van utilitzar com a control de càrrega. Es van obtenir resultats anàlegs en 3 experiments diferents.

## 2.2- L'estrès reticular intervé en l'efecte citotòxic exercit per l'ABTL0812

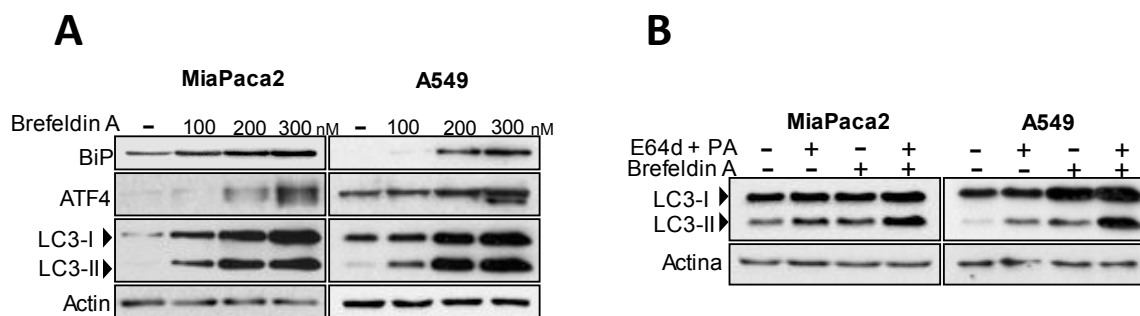
Per tal de valorar la implicació de l'estrès reticular en la citotoxicitat i activació d'autofàgia induïdes per l'ABTL0812 es va utilitzar Brefeldina A, un inhibidor del transport proteic del RE a l'aparell de Golgi, que provoca l'acumulació de proteïnes al RE i activació d'estrès reticular (Oslofsky and Urano, 2013). En primer lloc es va determinar si la inducció d'estrès reticular amb Brefeldina A era suficient per produir citotoxicitat. La **Figura 37** mostra que el tractament de les cèl·lules MiaPaca2 i A549 amb Brefeldina A disminueix la viabilitat cel·lular, amb unes  $IC_{50}$  de 96  $\mu$ M per MiaPaca2, i 71  $\mu$ M per A549.



**Figura 37: L'estrès reticular crònic induïx citotoxicitat a les cèl·lules tumorals.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser tractades 48 h amb concentracions creixents de l'inductor d'estrès reticular Brefeldina A. La viabilitat cel·lular fou determinada per assaig de MTT. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments separats.

L'activació d'estrès reticular induïx la resposta UPR que promou l'activació d'autofàgia com a procés adaptatiu per eliminar l'excés de proteïna mal plegada i afavorir l'activitat del RE (Zou et al., 2009; Smith and Wilkinson, 2017). A continuació, es va comprovar si la Brefeldina A induïa estrès reticular i autofàgia a les cèl·lules MiaPaca2 i A549. La **Figura 38A** presenta que el tractament de cèl·lules MiaPaca2 i A549 amb Brefeldina A durant 48 hores resulta en l'augment dels nivells proteics de BiP i ATF-4, i en l'acumulació del marcador d'autofagosomes LC3-II. L'acumulació de LC3-II pot ser deguda a l'activació del flux autofàgic o al seu bloqueig. La **Figura 38B** mostra que la pre-incubació amb els inhibidors de proteases lisosomals E64d i Pepstatina-A resulta en una major acumulació de LC3-II, i evidencia que la Brefeldina A activa autofàgia dinàmica.

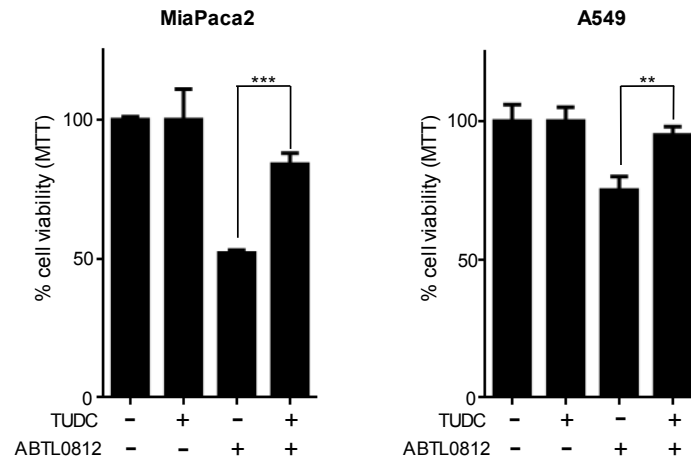




**Figura 38: L'activació d'estrès reticular indueix autofàgia dinàmica.** **A**, Cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549 van ser tractades 48 h amb concentracions creixents de Brefeldina A, lisades, i els marcadors d'estrès reticular BiP i ATF4, i la lipidació de LC3 (LC3-II), monitoritzats per immunoblot. Els nivells d'actina foren emprats com a control de càrrega. Es van obtenir resultats semblants en 3 experiments diferents. **B**, Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser pre-incubades 3 h amb vehicle (etanol) o una combinació dels inhibidors de proteases lisosomals E64d (10  $\mu$ M) i Pepstatina-A (PA, 10  $\mu$ g/ml). Seguidament s'aplicà un tractament de Brefeldina A 100 nM durant 24 h. Les cèl·lules foren lisades i la lipidació de LC3 (LC3-II) visualitzada per immunoblot. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments separats.

Els resultats obtinguts mostren que la inducció d'estrès reticular en cèl·lules MiaPaca2 i A549 per part de la Brefeldina A activa autofàgia i indueix citotoxicitat.

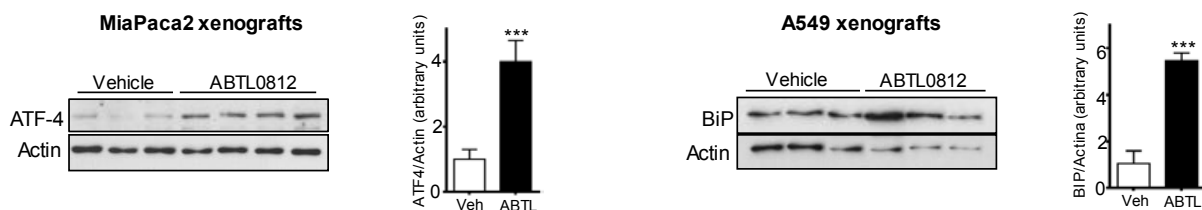
A continuació es va estudiar si l'estrès reticular induït per l'ABTL0812 mediava en el seu efecte citotòxic. Per a tal efecte, es van dur a terme assajos de viabilitat cel·lular per MTT en presència d'ABTL0812 i de l'inhibidor de la resposta UPR TUDC (tauroursodeoxicolat sòdic). Aquest àcid biliar secundari actua com a xaperona química i mitiga la resposta UPR inhibint la fosforilació d'eIF2 $\alpha$  per part de PERK, i ha estat utilitzat per altres autors per inhibir l'estrès reticular (Vang et al., 2014; Uppala et al., 2017). Tant en cèl·lules MiaPaca2 com a les A549, el tractament previ amb TUDC rescata significativament la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 (**Figura 39**). Aquests resultats mostren, preliminarment, que la resposta UPR estaria implicada en la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 i suggereixen que l'eix PERK-eIF2 $\alpha$  juga un paper central en l'activació de la resposta UPR.



**Figura 39: La citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 està mediada parcialment per l'activació d'estrès reticular.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 es pre-incubaren 3 h amb vehicle (aigua destil·lada) o tauroursodeoxicolat sòdic (TUDC, 150  $\mu$ M). A continuació, les cèl·lules foren tractades amb ABTL0812 30  $\mu$ M durant 48 h. La viabilitat cel·lular fou determinada per assaig de MTT. Cada valor representa la mitjana  $\pm$  SD de 3 experiments diferents. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb ABTL0812.

### 2.3- L'ABTL0812 indueix estrès reticular en models *in vivo* (xenografts)

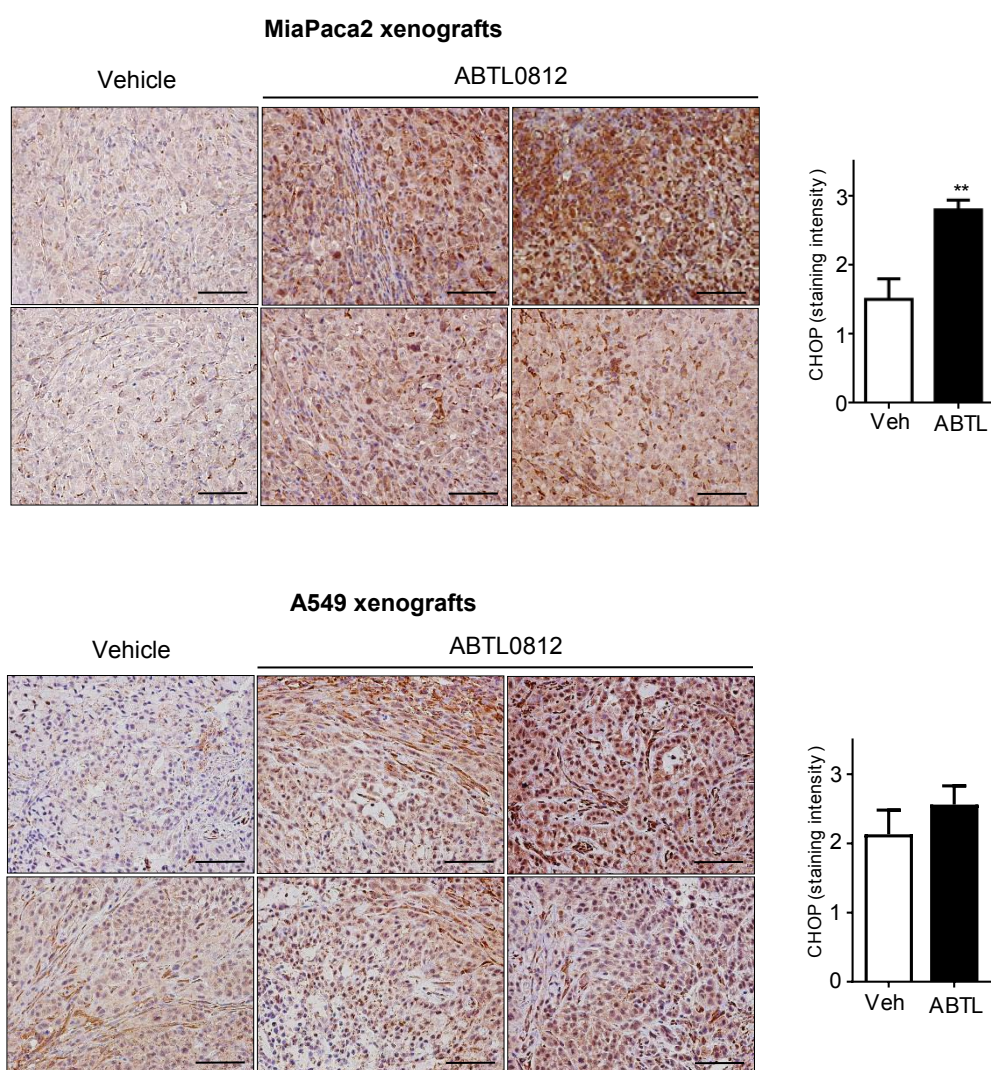
Els resultats obtinguts als models cel·lulars es van validar *in vivo* utilitzant models de tumors xenograft de les línies de càncer humà MiaPaca2 i A549. Ratolins femella atímics de la soca Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu van ser injectats subcutàniament amb la línia cel·lular corresponent i sotmesos als tractaments indicats. Com s'ha comentat amb anterioritat, l'administració oral d'ABTL0812 redueix de forma significativa el creixement tumoral dels xenografts de cèl·lules MiaPaca2 i A549 (Figura 16). L'anàlisi mitjançant immunoblot de la proteïna extreta dels tumors xenograft mostra que l'ABTL0812 indueix l'augment d'expressió dels marcadors d'estrès reticular ATF4 (MiaPaca2) i BiP (A549) (Figura 40).



**Figura 40: L'ABTL0812 indueix estrès reticular en tumors xenograft de cèl·lules MiaPaca2 (adenocarcinoma pancreàtic) i A549 (adenocarcinoma pulmonar).** La proteïna extreta dels tumors xenografts de cèl·lules MiaPaca2 i A549 fou analitzada per immunoblot per detectar els marcadors d'estrès reticular ATF4 o BiP. La figura mostra una anàlisi representativa de tumors tractats amb vehicle ( $n=3$ ;  $n=3$ ) o ABTL0812 120 mg/kg ( $n=4$ ;  $n=3$ ). Els nivells d'ATF4 i BiP van ser normalitzats respecte dels nivells d'actina i s'estimaren emprant unitats densitomètriques. Els histogrames representen la ràtio d'increment de senyal densitomètric respecte dels tumors tractats amb vehicle. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte dels tumors tractats amb vehicle.

## RESULTATS – CAPÍTOL 2

Els tumors obtinguts dels animals tractats també van ser analitzats per tinció immunohistoquímica, per tal de determinar els nivells del marcador d'estrès reticular CHOP (de tots els marcadors d'estrès de reticle testats, aquest es l'únic que va donar un senyal clar a l'assaig). Aquesta aproximació experimental permet l'avaluació del marcador respectant l'estructura tissular del tumor i discernint clarament la regió tumoral derivada de cèl·lules humanes de l'estroma del ratolí. La **Figura 41** mostra que els talls de tumors de MiaPaca2 tractats amb ABTL0812 presenten un marcatge de CHOP significativament més intens que els tractats amb vehicle. En el cas d'A549, l'ABTL0812 indueix un lleuger increment, però no significatiu, en el marcatge de CHOP. En conjunt, aquests resultats mostren que l'ABTL0812 indueix estrès reticular i activa la resposta UPR en models animals xenografts de línies cel·lulars tumorals humanes.



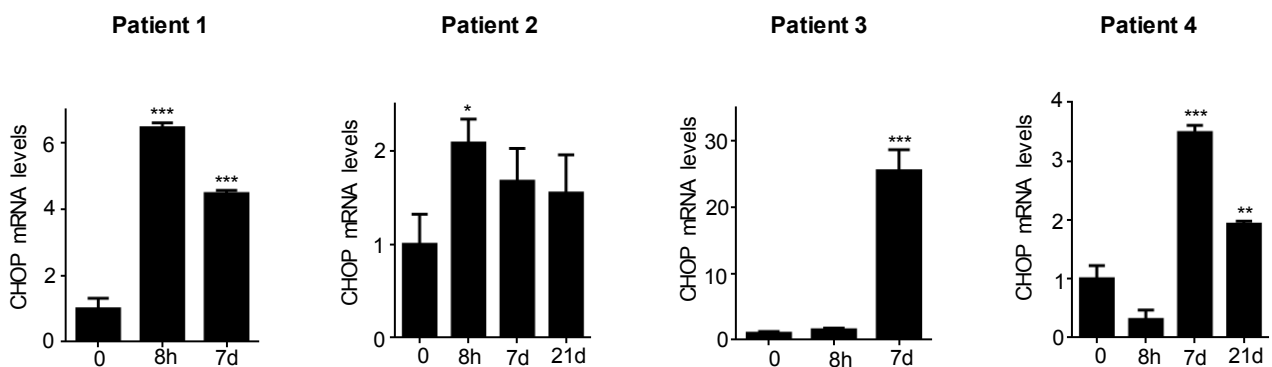
**Figura 41: L'ABTL0812 indueix la sobreexpressió del marcador d'estrès reticular CHOP en tumors xenografts de cèl·lules MiaPaca2 (pàncrees) i A549 (pulmó).** Els tumors xenograft de cèl·lules MiaPaca2 i A549 foren extrets post-sacrifici i s'avaluaren els nivells de CHOP per anàlisi immunohistoquímica, seguint el protocol descrit a material i mètodes. Barra d'escala, 100  $\mu$ m. Els histogrames mostren la quantificació de la intensitat de tinció. \*\*,  $P < 0.01$  respecte dels tumors tractats amb vehicle.

## 2.4- CHOP com a marcador farmacodinàmic

Com s’ha indicat amb anterioritat, l’ABTL0812 es troba actualment en Fase Clínica 2, com a primera línia de tractament en el càncer avançat d’endometri i càncer escamós de pulmó, en combinació amb quimioteràpia estàndard. Per al desenvolupament clínic d’aquest compost era essencial identificar biomarcadors farmacodinàmics adequats que permetessin valorar si el tractament amb ABTL0812 tenia efecte sobre els pacients. Al considerar els resultats anteriors es va decidir posar a punt l’ús de CHOP com a marcador farmacodinàmic del tractament dels pacients amb ABTL0812.

Donat que l’ABTL0812 activa estrès reticular intens, es van considerar les proteïnes implicades en la regulació de la resposta UPR com a biomarcador. A priori, el factor de transcripció CHOP (validat en teixit de tumors xenograft) era la millor opció, ja que els seus nivells en condicions basals són negligibles i els canvis d’expressió en resposta a l’ABTL0812 eren accentuats.

Es va aprofitar l’experiència obtinguda en el disseny del protocol de detecció dels nivells de mRNA de TRIB3 en mostres sanguínies de pacients per avaluar els nivells de l’mRNA de CHOP. Les mostres van ser extretes dels pacients a les 0 i 8 hores del primer dia d’administració d’ABTL0812, i els dies 7 i 21 de tractament. La sang obtinguda va ser analitzada el mateix dia d’extracció. La **Figura 42** presenta els resultats de les quantificacions de l’mRNA de CHOP (RT-PCR) realitzades en mostres sanguínies de 4 pacients diferents. En dos casos no es va poder detectar CHOP a les mostres corresponents al dia 21 de tractament, degut a manca de mostra (problemes en el procés d’extracció de sang), o a deficiències en la quantitat i qualitat d’aïllament de RNA. En tots els pacients analitzats, es va observar un clar increment de l’mRNA de CHOP en resposta al tractament. En el cas dels pacients 1 i 2, a les 8 hores des de la primera administració d’ABTL0812 es produeix un augment marcat de CHOP. Als pacients 3 i 4, en canvi, aquesta pujada de CHOP no s’aprecia fins al dia 7.



**Figura 42: El tractament amb ABTL0812 indueix un increment en els nivells de l’mRNA de CHOP en pacients de la Fase Clínica 2.** Nivells de mRNA de CHOP en pacients abans (dia 0) o després de rebre un tractament oral crònic de 4,000 mg d’ABTL0812 al dia (8 h, 7 dies, 21 dies). L’RNA total fou extret directament de mostres sanguínies dels pacients, i els nivells de l’mRNA de CHOP van ser avaluats per RT-qPCR. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte del dia 0 de tractament.

## RESULTATS – CAPÍTOL 2

---

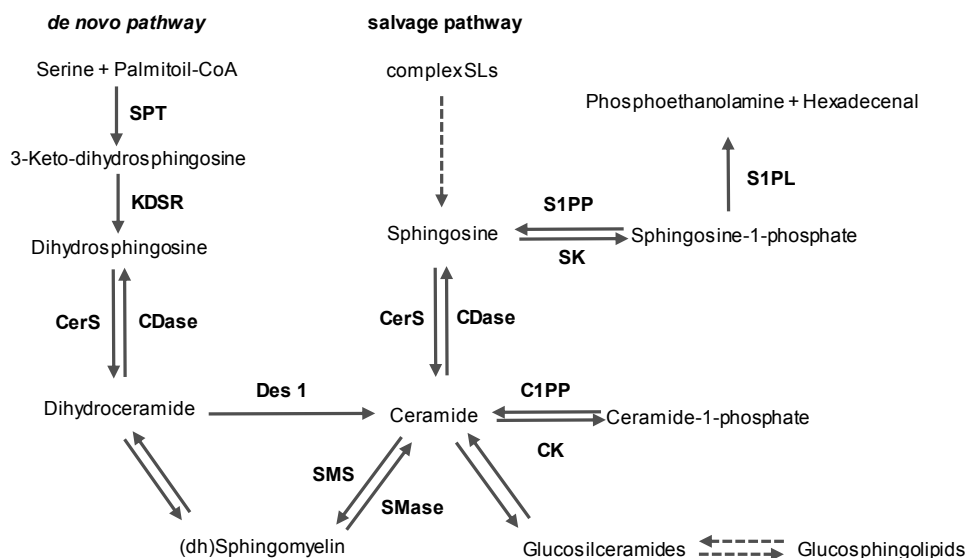
Els resultats obtinguts en l'anàlisi d'aquests 4 primers pacients recolzen la idoneïtat de la monitorització dels nivells de l'mRNA de CHOP com a marcador farmacodinàmic de la Fase Clínica 2, per ser emprat conjuntament amb la detecció de l'mRNA de TRIB3 en els pacients tractats. De fet, aquest resultat ha comportat la realització d'un *addendum* al protocol de la Fase Clínica 2 perquè els marcadors farmacodinàmics a utilitzar a l'estudi siguin la quantificació dels nivells dels mRNAs de TRIB3 i CHOP. Aquesta es la primera vegada que s'estableix la detecció directament en sang de l'mRNA d'una proteïna associada a la resposta UPR com a marcador farmacodinàmica d'un estudi clínic.

## **RESULTATS – CAPÍTOL 3**



### 3.1- L'ABTL0812 indueix acumulació de dihidroceramides a les cèl·lules tumorals

Els esfingolípids són una família àmplia de molècules bioactives que desenvolupen un paper rellevant en la regulació de funcions cel·lulars bàsiques (Rao et al., 2013). El seu sistema de metabolisme està altament coordinat per garantir el balanç adequat entre les diferents espècies d'esfingolípids (Figura 43). Dos dels processos en què s'ha caracteritzat la implicació de molècules esfingoides són estrès reticular i mort cel·lular. Per exemple, l'increment en els nivells de ceramida, espècie central del metabolisme dels esfingolípids, activa vies pro-apoptòtiques a les cèl·lules tumorals (Dany and Ogretmen, 2015), mentre que l'acumulació de dihidroceramides en resposta a factors estressants o a fàrmacs com ara el resveratrol, ha demostrat activar autofàgia com a mecanisme adaptatiu o de promoció de mort (Siddique et al., 2015). A més a més, s'ha reportat que l'acció de les dihidroceramides es contraposa a l'acció pro-apoptòtica de les ceramides (Stiban et al., 2006). D'aquesta manera, el balanç entre dihidroceramides i ceramides pren una especial importància en la definició del destí cel·lular i tipus de mort. Altres treballs experimentals han posat en relleu que, tenint en compte que els esfingolípids són integrants de membrana de diferents orgànuls, l'alteració en la seva proporció té un impacte directe sobre les propietats biofísiques d'aquestes membranes i, de retruc, sobre els orgànuls en qüestió (Hernández-Tiedra et al., 2016). En aquesta línia, s'ha descrit que l'acumulació de dihidroceramides a la membrana de RE altera la seva funcionalitat i promou estrès reticular (Noack et al., 2014; Siddique et al., 2015).

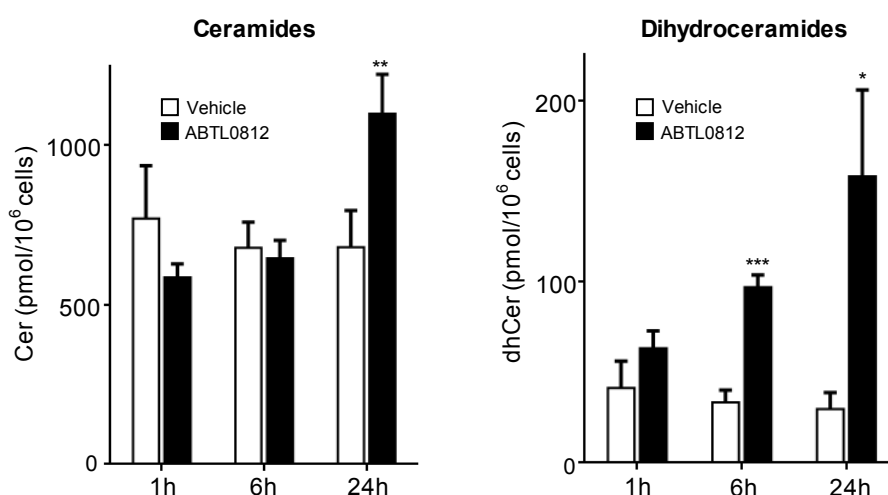


**Figura 43: Representació esquemàtica de les vies de síntesi de ceramida.** El metabolisme de la ceramida s'articula en dos eixos de síntesi: via *de novo* i via de reciclatge o recuperació. Ambdues vies convergeixen en la molècula central de síntesi de tots els esfingolípids, la ceramida. La via de síntesi *de novo* s'inicia amb la conjugació de la serina i el palmitoil-CoA catalitzada per la serina palmitoiltransferasa (SPT), per sintetitzar 3-ketodihidroesfingosina. La 3-ketodihidroesfingosina reductasa (KDSR) redueix la 3-ketodihidroesfingosina a dihidroesfingosina. A continuació, les ceramida sintases (CerS) converteixen la dihidroesfingosina en diferents espècies moleculars de dihidroceramida, que són transformades en ceramides per la introducció d'un doble enllaç 4,5-trans catalitzada per la desaturasa-1 (Des-1). CDasa: ceramida desacilasa; CK: ceramida quinasa; SK: esfingosina quinasa; SMS: esfingomielina sintasa; S1PL: esfingosina-1-fosfat liasa.



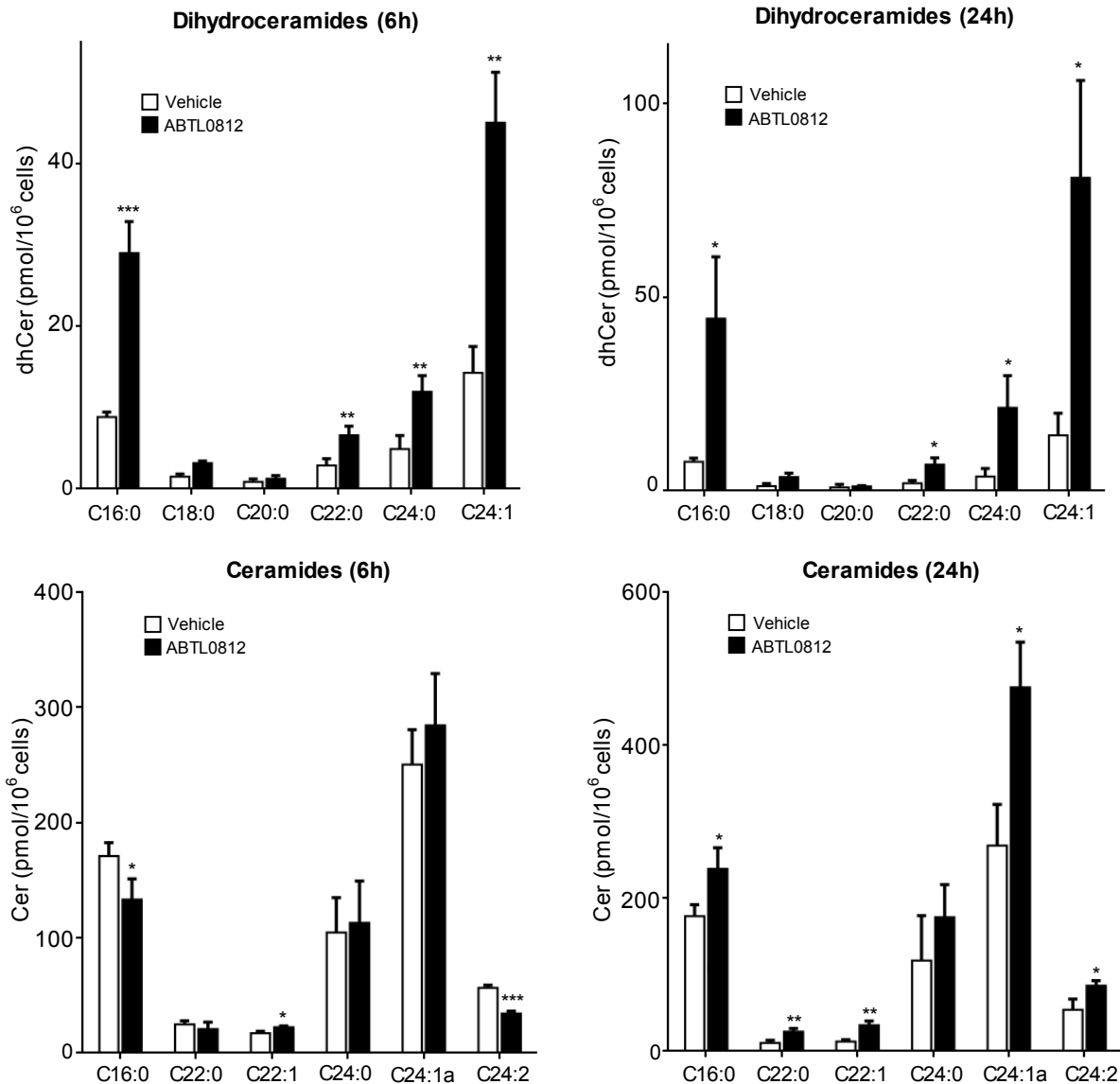
Donat el paper dels esfingolípidis en la regulació de l'estrès reticular i l'autofàgia, a continuació ens vam proposar estudiar si el tractament amb ABTL0812 alterava la composició de l'esfingolipidoma de les línies tumorals utilitzades en aquest estudi. Per tal efecte, es van tractar cèl·lules MiaPaca2 amb ABTL0812 durant 1, 6, i 24 hores i es van determinar els nivells de diferents espècies d'esfingolípidis mitjançant cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses per temps de vol (sistema LC (UPLC)-TOF MS). Es van escollir aquests temps de tractament perquè anteriorment havíem mostrat que l'ABTL0812 induïx estrès reticular a les 6 hores (**Figura 36**) i una robusta autofàgia a les 24 hores. Els valors numèrics de les determinacions es detallen als annexos I, II i III.

En primer lloc, es va determinar si el tractament amb ABTL0812 induïa canvis en els nivells de dihidroceramides i ceramides, dues espècies d'esfingolípid lligades a la inducció d'autofàgia o apoptosi, respectivament (Siddique et al., 2015). El tractament d'ABTL0812 durant una hora no promou canvis significatius en els nivells de ceramides i dihidroceramides cel·lulars. En canvi, el tractament de 6 hores (temps en què l'ABTL0812 induïx estrès reticular) promou un augment significatiu dels nivells de dihidroceramides (200%), sense afectar els nivells de ceramides cel·lulars (**Figura 44; Annex I**). Això indicaria preliminarment que les dihidroceramides, i no les ceramides, podrien estar implicades en la inducció d'estrès reticular. Per últim, el tractament d'ABTL0812 durant 24 hores (que induïx autofàgia) resulta en un lleuger però significatiu augment dels nivells de ceramides (40%), i en un robust augment del 500% dels nivells de dihidroceramides.



**Figura 44: L'ABTL0812 induïx l'acumulació de dihidroceramides però no de ceramides a les cèl·lules tumorals.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades amb vehicle (columnes blanques) o ABTL0812 100  $\mu$ M (columnes negres) els temps indicats. El contingut lipídic fou extret i analitzat per espectrometria de masses. Les dades de ceramides i dihidroceramides totals estan expressades en pmol d'esfingolípid per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

A continuació, es va realitzar un estudi exhaustiu amb la finalitat de quantificar els canvis que l'ABTL0812 induïa en les diferents espècies de ceramides i dihidroceramides cel·lulars. A les 6 hores de tractament l'ABTL0812 promou un robust augment de més del 200% en les dihidroceramides de cadena llarga C16:0, C22:0, C24:0 i C24:1 (Figura 45; Annex I). Per contra, l'únic efecte observable de l'ABTL0812 sobre les ceramides és una lleugera però significativa disminució de les ceramides C16:0 i C24:2. Aquests resultats identifiquen l'augment a les dihidroceramides de cadena llarga com un dels primers esdeveniments que tenen lloc a la cèl·lula en resposta al tractament amb ABTL0812.

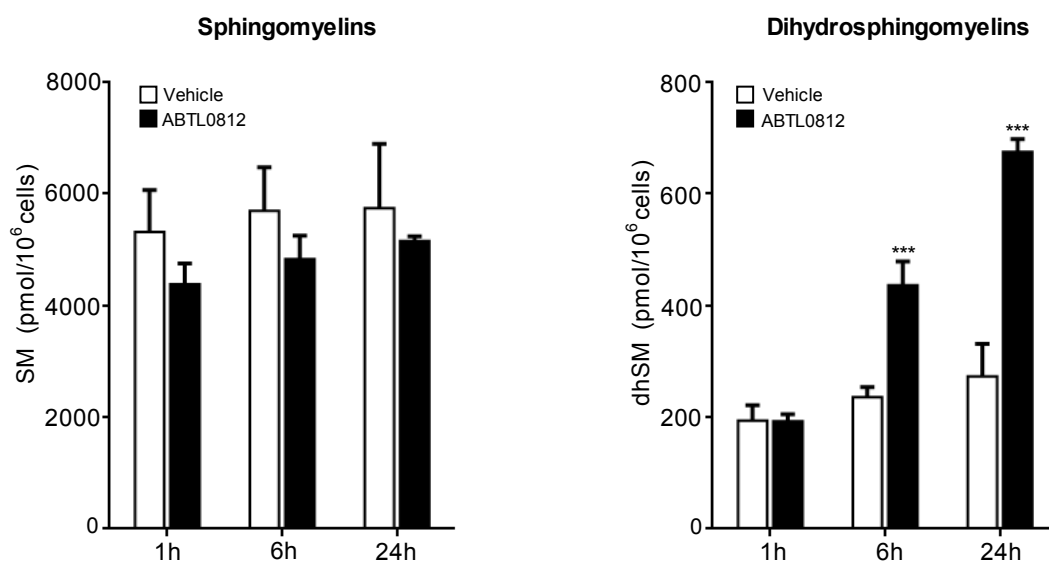


**Figura 45: El tractament amb ABTL0812 induïx l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades amb vehicle (columnes blanques) o ABTL0812 100 µM (columnes negres) els temps indicats. El contingut lipídic fou extret i analitzat per espectrometria de masses. Les quantitats de les diferents espècies de dihidroceramides (histogrames superiors) i ceramides (histogrames inferiors) estan expressades en pmol d'esfingolípids per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada valor és la mitjana ± SD de 3 determinacions diferents. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

## RESULTATS – CAPÍTOL 3

A les 24 hores de tractament, s'observa un major canvi (>300%) dels nivells de dihidroceramides de cadena llarga (C16:0, C22:0, C24:0 i C24:1), mentre que tan sols es produeix un lleuger augment (<40%) a les ceramides C16:0, C22:0, C22:1, C24:1 i C24:2. Així doncs, a les 24 hores de tractament amb ABTL0812, quan s'observa autofàgia, els canvis més rellevants a l'esfingolipidoma serien deguts a l'augment de les dihidroceramides de cadena llarga.

Per tal de confirmar l'augment de dihidroceramides en resposta a l'ABTL0812, a continuació es va determinar si el fàrmac també provocava un augment dels nivells cel·lulars de dihidroesfingomielina, un esfingolípid derivat de les dihidroceramides. Altres autors han mostrat un augment de dihidroesfingomielina en resposta a una acumulació de dihidroceramides (Fabriàs et al., 2012; Testai et al., 2014). L'ABTL0812 no indueix canvis a la concentració d'esfingomielines cel·lulars, a cap dels temps avaluats (**Figura 46; Annex II**). Com s'esperava, el tractament amb ABTL0812 a 6 o 24 hores va induir un augment robust en els nivells de dihidroesfingomielines similar a l'observat per les dihidroceramides. Aquest resultat, recolza l'observació que l'ABTL0812 indueix un augment de les dihidroceramides cel·lulars.

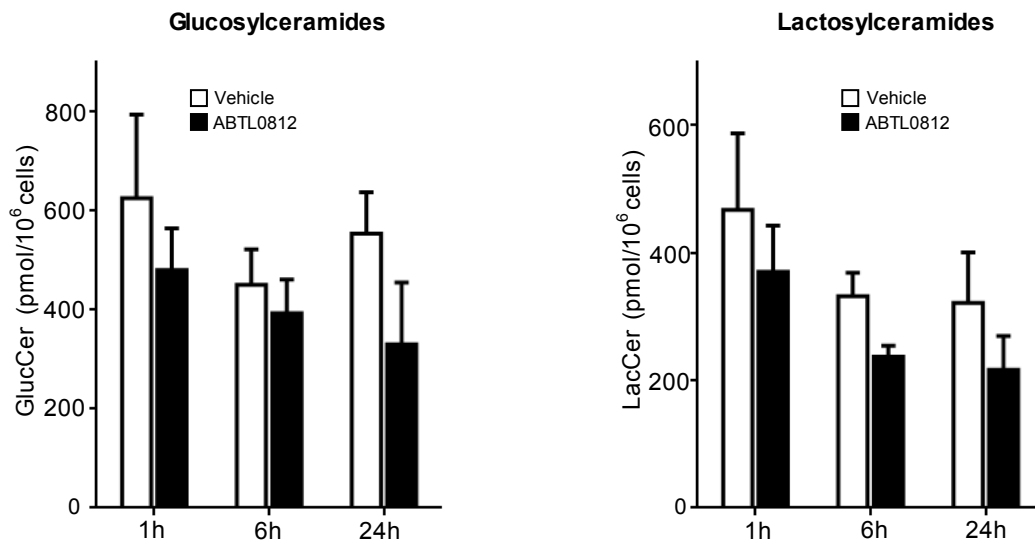


**Figura 46: El tractament amb ABTL0812 indueix l'acumulació de dihidroesfingomielines, però no d'esfingomielines.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades amb vehicle (columnes blanques) o ABTL0812 100  $\mu$ M (columnes negres) els temps indicats. El contingut lipídic fou extret i analitzat per espectrometria de masses. Les quantitats d'esfingosines i dihidroesfingosines estan expressades en pmol d'esfingolípid per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

Per últim es van determinar els nivells de glucosilceramides i lactosilceramides, esfingolípid derivats de les ceramides i sintetitzats generalment per tamponar l'excés citotòxic de ceramides (Ogretmen and Hannun, 2004; Huang et al., 2011). L'ABTL0812 no indueix canvis significatius en els nivells de glucosil-

lactosilceramides, si bé s’observa una tendència a la reducció dels nivells d’aquests esfingolípid (Figura 47; Annex III).

En conclusió, el tractament amb ABTL0812 indueix l’acumulació d’esfingolípid derivats de dihidroceramides, però no afecta els nivells dels esfingolípid derivats de les ceramides.

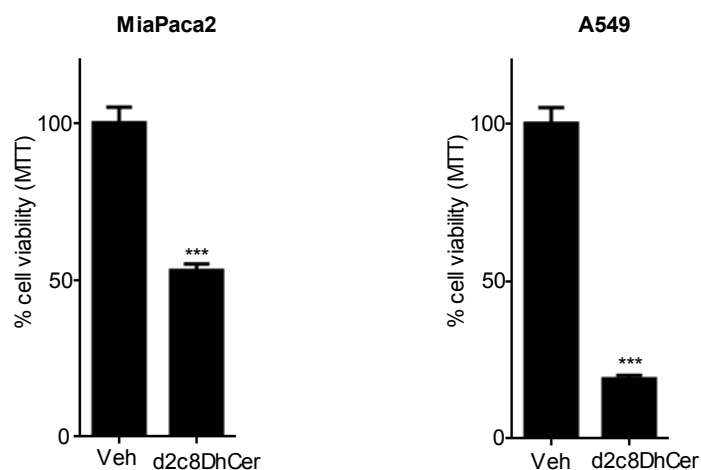


**Figura 47: El tractament amb ABTL0812 no indueix canvis en els nivells de glucosil i lactosilceramides.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades amb vehicle (columnes blanques) o ABTL0812 100  $\mu$ M (columnes negres) els temps indicats. El contingut lipídic fou extret i analitzat per espectrometria de masses. Les quantitats de glucosilceramides i lactosilceramides estan expressades en pmol d’esfingolípid per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*,  $P < 0.05$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

### 3.2- L’acumulació de dihidroceramides indueix autofàgia, estrès reticular i citotoxicitat a les cèl·lules tumorals

Diversos autors han descrit que l’acumulació de dihidroceramides indueix autofàgia, estrès reticular i mort cel·lular en cèl·lules de glioma i de càncer gàstric (Signorelli et al., 2009; Noack et al., 2014; Hernández-Tiedra et al., 2016; Casasampere et al., 2016). Donats els resultats que mostraven que l’ABTL0812 indueix acumulació de dihidroceramides de cadena llarga, a continuació es va estudiar si aquest esdeveniment estava relacionat amb la inducció d’estrès reticular, l’autofàgia i la citotoxicitat promogudes pel fàrmac. Amb aquest objectiu, es van tractar cèl·lules MiaPaca2 i A549 amb una dihidroceramida de cadena curta dideuterada (d2c8DhCer). Aquesta molècula promou l’acumulació de dihidroceramides de cadena llarga: és assimilada fàcilment per la cèl·lula, on és desaturada a un ritme lent degut a la presència de l’isòtop deuteri a la seva estructura. Mentre roman a la cèl·lula, la d2c8DhCer és *N*-transacilada i genera dihidroceramides de cadena llarga. Com a conseqüència, es produeix l’acumulació progressiva de dihidroceramides deuterades de cadena llarga (Savile et al., 2001).

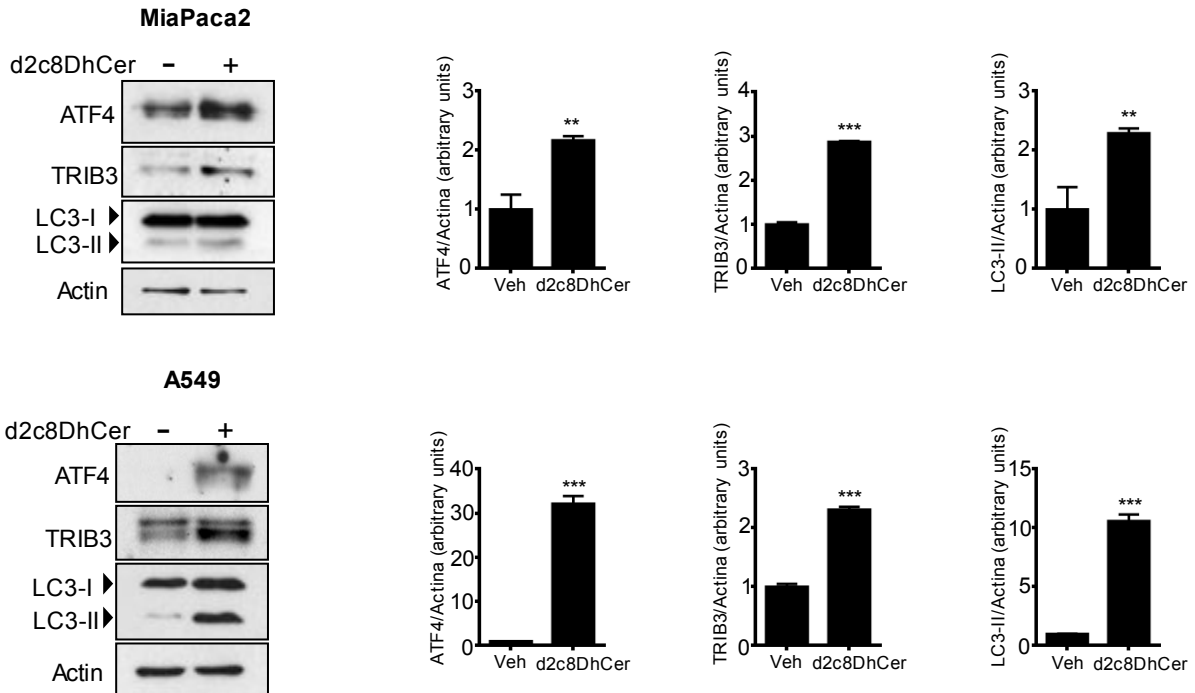
D'acord amb resultats anteriors, es va observar que la d2c8DhCer induïx citotoxicitat. La **Figura 48** mostra que el tractament de 48 hores amb d2c8DhCer resulta en una pèrdua de la viabilitat cel·lular del 50% (cèl·lules MiaPaca2) o del 80% (cèl·lules A549).



**Figura 48: L'acumulació de dihidroceramides induïx citotoxicitat en línies tumorals humanes.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 foren tractades 48 h amb dihidroceramida dideuterada (d2c8DhCer) 25  $\mu$ M. La viabilitat cel·lular va ser determinada per assaig de MTT. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. Es van obtenir resultats similars en 2 experiments separats.

A continuació, es van utilitzar assajos d'immunoblot per tal d'identificar si el tractament amb d2c8DhCer induïa estrès reticular i autofàgia. En cèl·lules MiaPaca2 i A549 la d2c8DhCer promou un augment significatiu en els nivells d'expressió del marcador d'estrès reticular ATF4, i de TRIB3 (la transcripció de la qual està regulada per ATF4) (**Figura 49**). D'interès, el tractament durant 48 hores amb d2c8DhCer induïx autofàgia (monitoritzada per l'augment dels nivells de LC3-II, **Figura 49**).

En conjunt, aquests resultats suggereixen que l'acumulació de dihidroceramides induïx estrès reticular, autofàgia i citotoxicitat a les línies cel·lulars MiaPaca2 i A549.



**Figura 49: El tractament amb d2c8DhCer activa estrès reticular i autofàgia en cèl·lules tumorals.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 foren tractades 48 h amb 25  $\mu$ M de dihidroceramida dideuterada (d2c8DhCer). S’anализaren els marcadors d’estrès reticular ATF4 i TRIB3, i la lipidació de LC3 (LC3-II) per immunoblot. Els nivells d’ATF4, TRIB3 i LC3-II van ser normalitzats respecte l’actina i estimats emprant unitats densitomètriques. Els histogrames representen la ràtio d’increment de senyal densitomètric respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. Es van obtenir resultats similars en 2 experiments diferents.

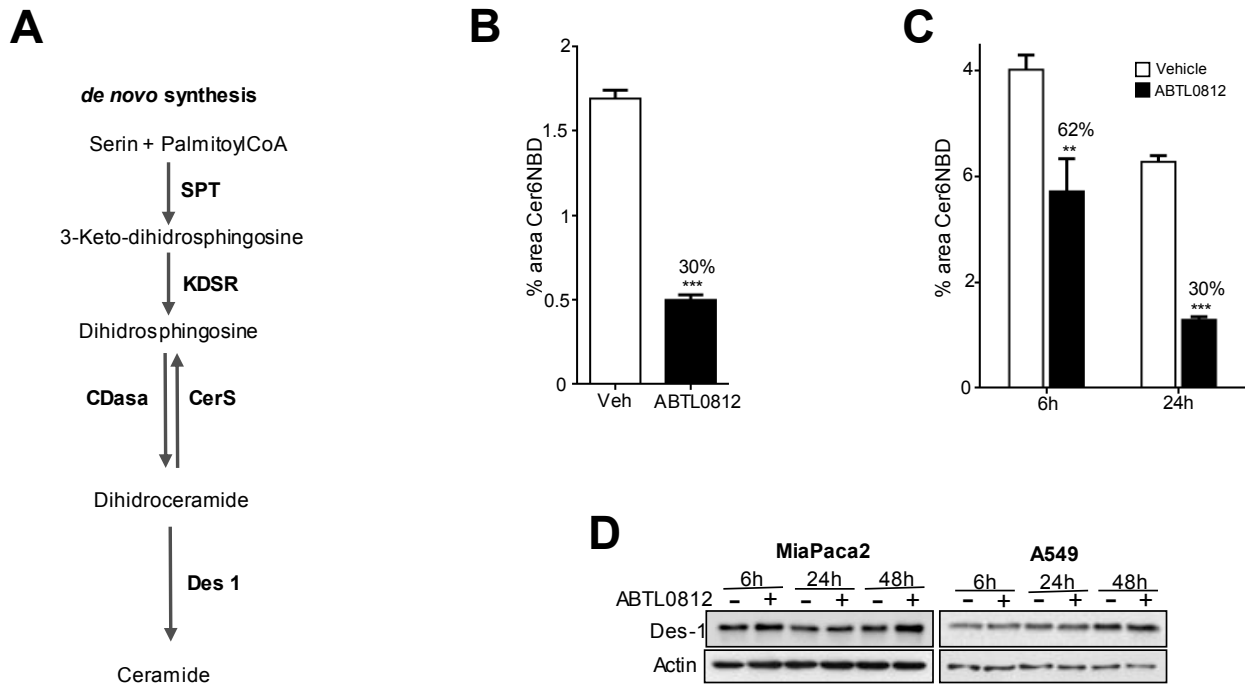
### 3.3- El tractament amb ABTL0812 resulta en la inhibició de la desaturasa-1, fet que indueix l’acumulació de dihidroceramides, estrès reticular, autofàgia i citotoxicitat

Els resultats obtinguts mostraven que l’ABTL0812 induïa acumulació de dihidroceramides però en desconeixíem la causa. A la via de síntesi *de novo*, la ceramida es forma en un últim pas limitant gràcies a la introducció d’un doble enllaç trans 4,5 a la dihidroceramida. Aquesta reacció està catalitzada pels enzims dihidroceramida desaturasa, dels quals se n’han descrit dos gens que codifiquen per la desaturasa-1 i desaturasa-2 (Des-1 i Des-2) (Figura 50A). Des-1 es distribueix de forma ubiqua pels diferents teixits i és la desaturasa que catalitza de forma predominant la síntesi de ceramida (Rodríguez-Cuenca et al., 2015). La reacció de desaturació de dihidroceramides catalitzada per Des-1 és un pas crític per a la regulació dels nivells de dihidroceramides i ceramides. Tenint en compte això, es va estudiar si el tractament amb ABTL0812 tenia algun efecte sobre l’activitat de l’enzim Des-1, fet que explicaria l’acumulació de dihidroceramides observada.

Des-1 és una proteïna integral de la membrana de reticle endoplasmàtic, i per tal de desenvolupar la seva funció necessita el poder reductor generat pel sistema de transport d'electrons del citocrom b5. Aquest fet impossibilita la realització d'assajos d'activitat enzimàtica *in vitro* amb la proteïna pura. En aquest estudi l'avaluació de l'activitat de Des-1 s'ha basat en la utilització del compost DhCerC6NBD, una dihidroceramida de cadena curta marcada amb el fluoròfor NBD. Al ser una molècula de cadena acil curta (6 carbonis) entra fàcilment a la cèl·lula i és desaturada a ceramida CerC6NBD, també fluorescent. Tenint en compte que les dihidroceramides són desaturades de forma majoritària per Des-1, la mesura de la conversió de la DhCerC6NBD a CerC6NBD representa un bon mètode per determinar la seva activitat enzimàtica (Muñoz-Olaya et al., 2008). La quantificació de CerC6NBD fluorescent es va dur a terme per HPLC associat a un detector fluorimètric.

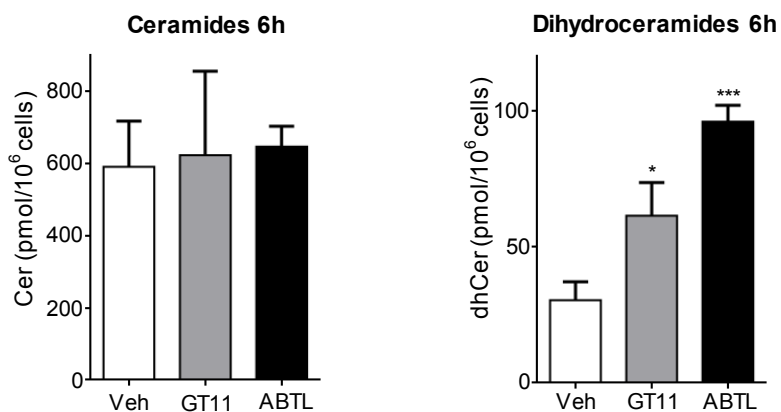
Es van realitzar assajos d'activitat de Des-1 utilitzant lisats cel·lulars i cèl·lules en cultiu. A l'assaig *in vitro*, la incubació del lisats de cèl·lules A549 amb ABTL0812 va reduir un 70% l'activitat de Des-1 (**Figura 50B**). Al corresponent assaig *in vivo*, emprant cèl·lules MiaPaca2, el tractament amb ABTL0812 resultà en una inhibició de l'activitat de Des-1 a les 6 hores (reducció d'un 38%), i de forma més robusta a les 24 hores (reducció d'un 70%) (**Figura 50C**). En paral·lel, i com a control, els corresponents immunoblots mostren que el tractament amb ABTL0812 no induïx canvis en els nivells d'expressió de Des-1 a cèl·lules MiaPaca2 i A549, de manera que es va descartar que la inhibició de l'activitat de Des-1 observada fos deguda a canvis en l'expressió de Des-1 (**Figura 50D**). En conjunt, els resultats obtinguts mostren que el tractament amb ABTL0812 induïx una inhibició de la Des-1 cel·lular.

La inhibició de Des-1 en resposta al tractament amb ABTL0812 podria explicar l'acumulació de dihidroceramides i la inducció d'estrès reticular i autofàgia observades. Per comprovar-ho, es va estudiar l'efecte del tractament de cèl·lules MiaPaca2 i A549 amb un inhibidor específic de la Des-1, el GT11. El GT11 és un derivat de la ceramida que conté un grup ciclopropè que inhibeix competitivament la Des-1 amb una  $K_i$  de 6  $\mu$ M (Triola et al., 2003). En primer lloc, cèl·lules MiaPaca2 es van tractar 6 hores amb GT11 i es va dur a terme una anàlisi esfingolipidòmica per avaluar els canvis que es produïen en els nivells de ceramides i dihidroceramides en resposta al tractament (**Figura 51**). La inhibició específica de Des-1 amb GT11 no induïx canvis en els nivells de ceramides, però sí l'acumulació significativa de dihidroceramides a les 6 hores de tractament, tal i com ho fa l'ABTL0812 (**Figura 44**).



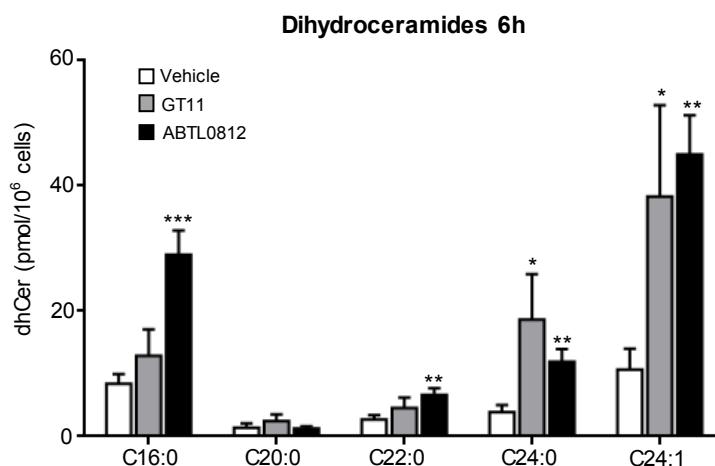
**Figura 50: El tractament amb ABTL0812 inhibeix l'activitat enzimàtica de la desaturasa-1 (Des-1).** **A**, Representació esquemàtica de la via de síntesi d'esfingolípids *de novo*. La Serina palmitoiltransferasa (SPT) catalitza la conjugació del palmitoil-CoA amb serina per a sintetitzar 3-ketodihidroesfingosina. La 3-ketodihidroesfingosina reductasa (KDSR) redueix la 3-ketodihidroesfingosina a dihidroesfingosina. A continuació, les ceramida sintases (CERSs) converteixen la dihidroesfingosina en diferents espècies moleculars de dihidroceramida, que són transformades en ceramides per la introducció d'un doble enllaç 4,5-trans catalitzada per la desaturasa-1 (Des-1). **B**, Lisat cel·lular d'A549 va ser incubat 4 h amb vehicle (columna blanca) o amb ABTL0812 100 µM (columna negra). L'activitat enzimàtica de la Des-1 va ser determinada emprant el substrat fluorogènic dhCerC6NBD, monitoritzant la seva desaturació a CerC6NBD emprant un sistema HPLC associat a un detector fluorimètric. Les dades estan representades com a percentatge d'àrea del pic de CerC6NBD. Cada valor és la mitjana ± SD de 3 determinacions diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. **C**, Cèl·lules MiaPaca2 intactes foren tractades amb vehicle (columnes blanques) o ABTL0812 100 µM (columnes negres) els temps indicats. Les cèl·lules van ser lisades i l'activitat enzimàtica de la Des-1 determinada utilitzant el substrat fluorogènic dhCerC6NBD, monitoritzant la seva desaturació a CerC6NBD emprant un sistema HPLC associat a un detector fluorimètric. Les dades estan representades com a percentatge d'àrea del pic de CerC6NBD. Cada valor és la mitjana ± SD de 3 determinacions diferents. \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. **D**, Cèl·lules MiaPaca2 i A549 foren tractades 6, 24 i 48 h amb ABTL0812 100 µM, i els nivells de Des-1, visualitzats per immunoblot. S'obtingueren resultats similars en 3 experiments separats.





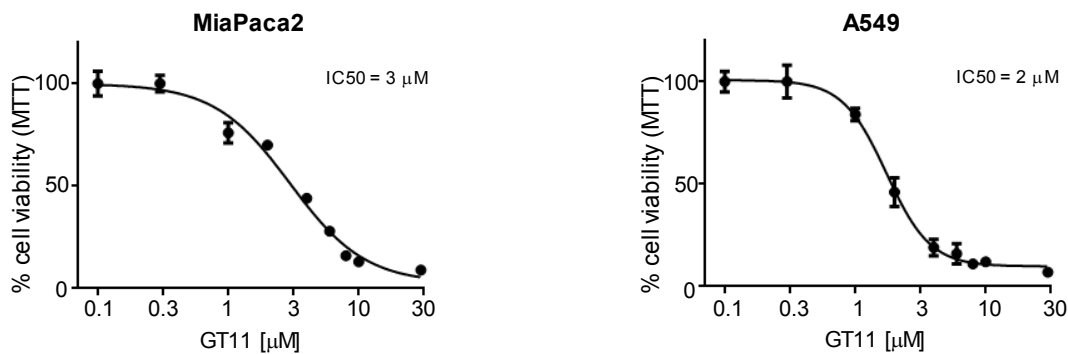
**Figura 51: La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) per part de l'inhibidor específic GT11 induïx l'acumulació de dihidroceràmides però no de ceràmides en cèl·lules tumorals.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades 6 h amb vehicle (columnes blanques), GT11 5  $\mu$ M (columnes grises) i ABTL0812 100  $\mu$ M (columnes negres). El contingut lipídic fou extret i els nivells de ceràmides i dihidroceràmides totals analitzats per LC (UPLC)-TOFMS. Les dades estan expressades en pmol d'esfingolípids per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

A continuació, es va determinar si el tractament amb GT11 mimetitzava l'acumulació específica de dihidroceràmides de cadena llarga observada per l'ABTL0812. La **Figura 52** mostra que el tractament amb GT11 promou un augment significatiu dels nivells de dihidroceràmides C24:0 i C24:1, anàlegs als promoguts per l'ABTL0812. Les dihidroceràmides C16:0 i C22:0 mostren una tendència d'augment en resposta al tractament amb GT11 però no assoleix significació estadística com en el cas de l'ABTL0812. Els resultats obtinguts mostren que la inhibició específica de la Des-1 per GT11 induïx l'acumulació de dihidroceràmides de cadena llarga, tal com succeeix amb l'ABTL0812.



**Figura 52: La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) per part de l'inhibidor específic GT11 induïx l'acumulació de dihidroceràmides de cadena llarga.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades 6 h amb vehicle (columnes blanques), GT11 5  $\mu$ M (columnes grises) i ABTL0812 100  $\mu$ M (columnes negres). El contingut lipídic fou extret, i els nivells de les diferents espècies moleculars de dihidroceràmides, analitzades per LC (UPLC)-TOFMS. Les dades estan expressades en pmol d'esfingolípids per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

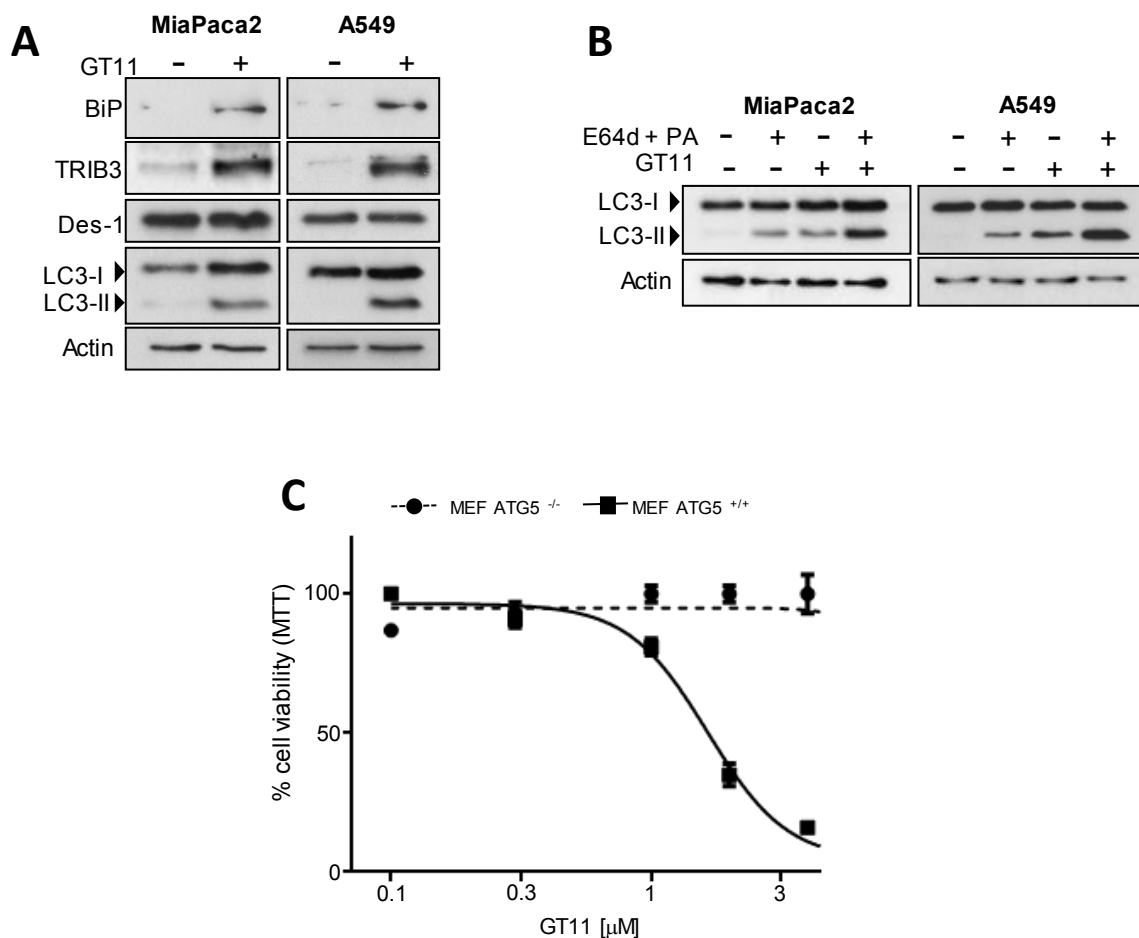
Donat que la inhibició específica de Des-1 amb GT11 resultava en l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga, a continuació es va estudiar si el GT11 afectava la viabilitat cel·lular a les línies cel·lulars emprades en aquest treball. Amb aquesta finalitat, es van tractar cèl·lules MiaPaca2 i A549 amb GT11 durant 48 hores i es va determinar la viabilitat cel·lular per assaig de MTT. La **Figura 53** mostra que el tractament amb GT11 indueix citotoxicitat en ambdues línies cel·lulars, amb valors d'IC<sub>50</sub>s de 2-3 μM.



**Figura 53: La inhibició de la desaturasa-1 indueix citotoxicitat en cèl·lules tumorals.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 foren tractades amb les concentracions indicades de GT11 durant 48 h, i la viabilitat cel·lular fou determinada per assaig de MTT. Cada valor és la mitjana ± SD de 3 determinacions diferents. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments separats.

Tot seguit es va estudiar si el tractament amb GT11 era capaç d'induir estrès reticular i autofàgia. A continuació, i mitjançant assajos d'immunoblot, la **Figura 54A** mostra que el GT11 indueix un augment en els nivells dels marcadors d'estrès reticular BiP i TRIB3, i una acumulació de la forma lipidada de LC3 (LC3-II). Com es va observar per a l'ABTL0812, el GT11 no afecta els nivells d'expressió de Des-1. A la **Figura 54B** es mostra que el GT11 indueix una autofàgia dinàmica, donat que el tractament amb els inhibidors de proteases lisosomals E64d i Pepstatina-A resulta en un augment del marcador d'autofagosomes LC3-II.

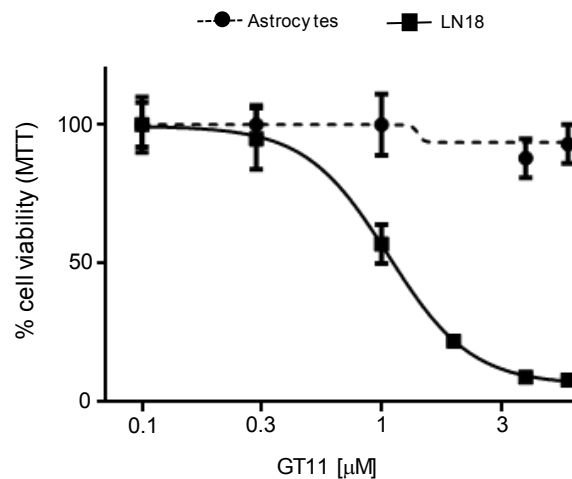
A continuació es va estudiar si l'autofàgia induïda pel tractament amb GT11 mediava en el seu efecte citotòxic. Amb aquest objectiu, cèl·lules MEF salvatges (MEF ATG5<sup>+/+</sup>) o deficientes en ATG5 (MEF ATG5<sup>-/-</sup>) es van tractar amb concentracions creixents de GT11. La proteïna ATG5 és essencial en el procés d'elongació de l'autofagosoma, de manera que les cèl·lules ATG5<sup>-/-</sup> són incompetents per a l'autofàgia (Salazar et al., 2009a). L'assaig de viabilitat per MTT mostra que les cèl·lules ATG5<sup>-/-</sup> són més resistents a l'acció citotòxica del GT11 (**Figura 54C**). Aquests resultats, en el seu conjunt, demostren que la inhibició de Des-1 amb GT11 indueix mort cel·lular mediada per autofàgia.



**Figura 54: La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) indueix estrès reticular i mort mediada per autofàgia a les cèl·lules tumorals.** **A**, Cèl·lules MiaPaca2 i A549 foren tractades amb GT11 5  $\mu$ M durant 48 h, i els nivells dels marcadors d'estrès reticular ATF4, BiP i TRIB3, l'enzim Des-1 i la lipidació de LC3 (LC3-II), van ser analitzats per immunoblot. S'obtingueren resultats similars en 3 experiments separats. **B**, Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser pre-incubades 3 h amb vehicle (etanol) o una combinació dels inhibidors de proteases lisosomals E64d (10  $\mu$ M) i Pepstatina-A (PA, 10  $\mu$ g/ml). Seguidament s'aplicà un tractament de GT11 5  $\mu$ M durant 24 h. Les cèl·lules foren lisades i la lipidació de LC3 (LC3-II) visualitzada per immunoblot. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments separats. **C**, Cèl·lules MEF ATG5<sup>+/+</sup> (corba contínua) i MEF ATG5<sup>-/-</sup> (corba puntejada) van ser tractades amb concentracions creixents de GT11 durant 48 h. La viabilitat cel·lular fou determinada per assaig de MTT. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments separats.

El conjunt de resultats obtinguts aplicant amb GT11 demostren que la inhibició específica de Des-1 indueix l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga, activació d'estrès reticular i mort cel·lular mediada per autofàgia. Això suggereix que la inhibició de Des-1 per l'ABTL0812 podria explicar en part la seva acció antitumoral.

Una de les principals propietats de l'ABTL0812 és la seva alta selectivitat per les cèl·lules tumorals, tot i que encara es desconeixen els mecanismes que hi estan implicats. En aquest sentit, la inhibició de Des-1 podria ser un factor que afectés de forma diferencial les cèl·lules tumorals. Per comprovar aquesta hipòtesi, a continuació es van tractar amb GT11 astròcits primaris de rata i la línia de glioblastoma humà LN-18. La **Figura 55** mostra que la línia tumoral LN-18 és més sensible a la inhibició específica de la Des-1 per part del GT11 que els astròcits primaris. Així, a 5  $\mu$ M el GT11 induïx una pèrdua total de la viabilitat de les cèl·lules de glioblastoma, però no afecta els astròcits primaris. Aquest resultat és anàleg a l'obtingut amb l'ABTL0812 (**Figura 15**) i suggereix que part del mecanisme citotòxic de l'ABTL0812 podria estar mediat per la inhibició de Des-1.



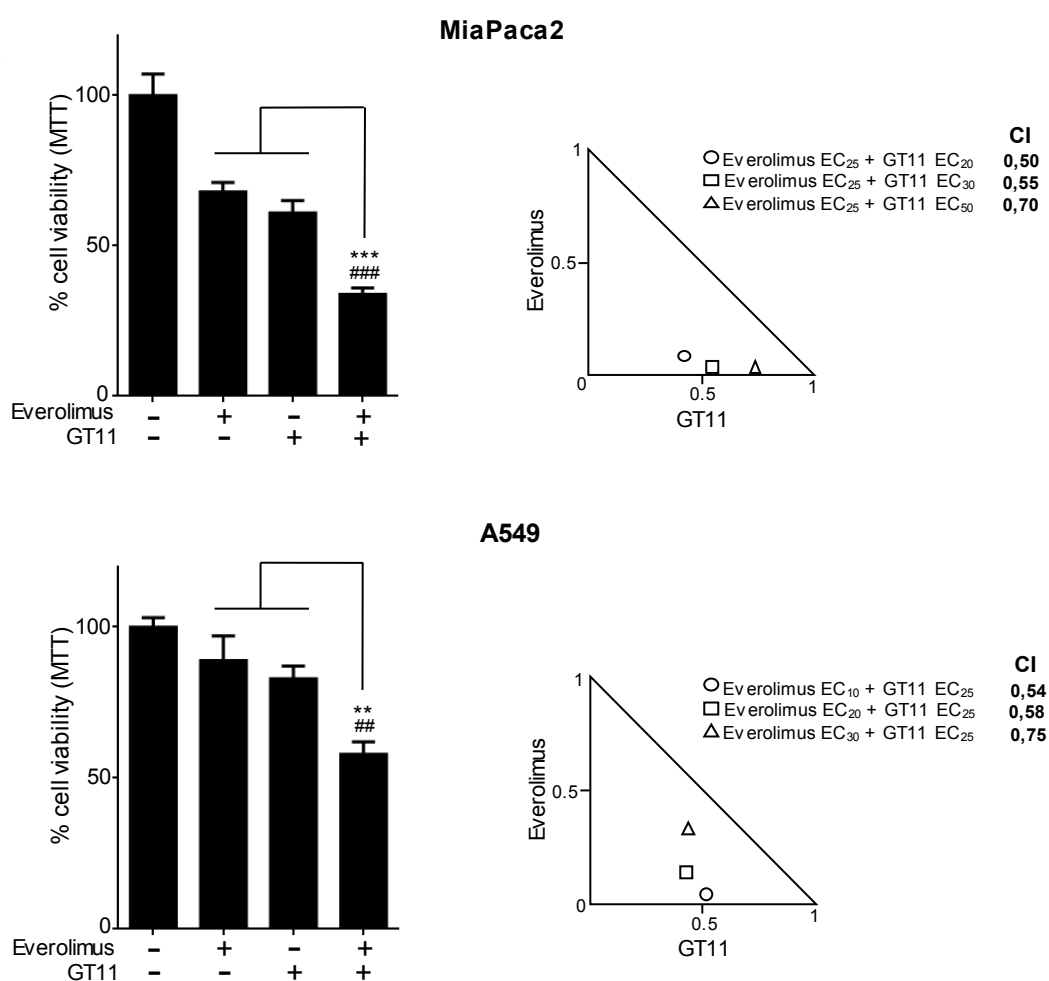
**Figura 55: Les cèl·lules tumorals són més sensibles a la inhibició de la desaturasa-1.** Astròcits primaris de rata (corba puntejada) i cèl·lules de glioblastoma humà LN-18 (corba contínua) van ser tractades amb concentracions creixents de GT11 durant 48 h, i la viabilitat cel·lular determinada per assaig de MTT. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents.

### 3.4- La inhibició de la desaturasa-1 col·labora amb la inhibició de mTORC1 en la inducció d'autofàgia i mort cel·lular

El mecanisme d'acció de l'ABTL0812 descrit prèviament pel nostre grup consisteix que l'ABTL0812 actua com a agonista dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$ , que induïxen la sobreexpressió de la pseudoquinasa TRIB3. TRIB3 uneix i inhibeix Akt i, com a conseqüència, es produeix la inhibició del complex mTORC1 i l'activació d'autofàgia. Els resultats anteriors mostren que l'ABTL0812 també actua inhibint la Des-1, fet que provoca l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga, activació d'estrès reticular i inducció d'autofàgia. La confluència de la inhibició de mTORC1 i la inhibició de Des-1 podia explicar la robusta autofàgia i la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812. Per corroborar aquesta hipòtesi, es van co-tractar cèl·lules MiaPaca2 i A549 amb l'inhibidor de Des-1 GT11 i amb l'inhibidor de mTORC1 Everolimus.

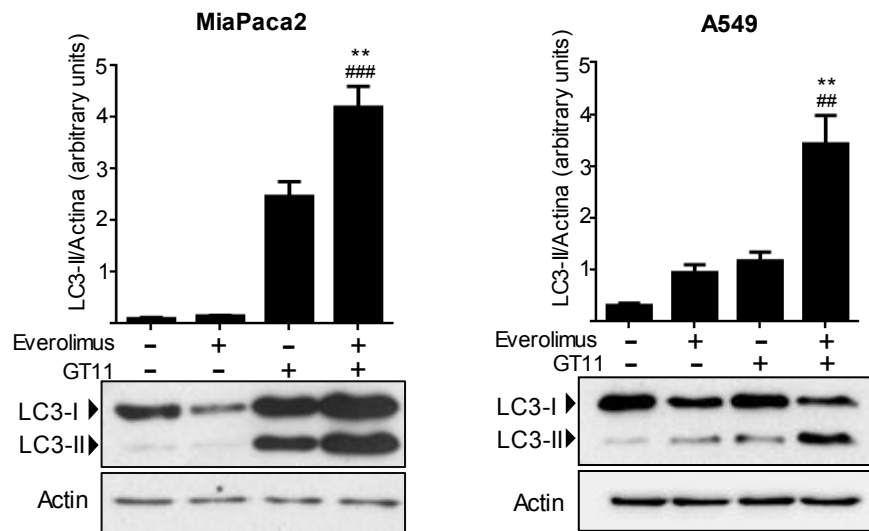
## RESULTATS – CAPÍTOL 3

Es va avaluar per assaig de viabilitat per MTT si el tractament combinat dels inhibidors de mTORC1 i Des-1 tenia un efecte cooperatiu en la reducció de la viabilitat de les cèl·lules tumorals. La **Figura 56** mostra que el tractament combinat de GT11 i Everolimus (inhibidor de mTORC1) té un efecte sinèrgic en induir citotoxicitat a les cèl·lules MiaPaca2 i A549. Aquesta figura mostra els corresponents isoblogrames, on s'observa que el tractament combinat té un índex de combinació (CI) molt inferior a 1 (0.5-0.7). L'índex combinatori és un valor que permet definir l'acció de fàrmacs en combinació:  $CI > 1$  mostra antagonisme,  $CI = 1$  mostra efecte additiu i  $CI < 1$  indica sinèrgia (Chou, 2010).



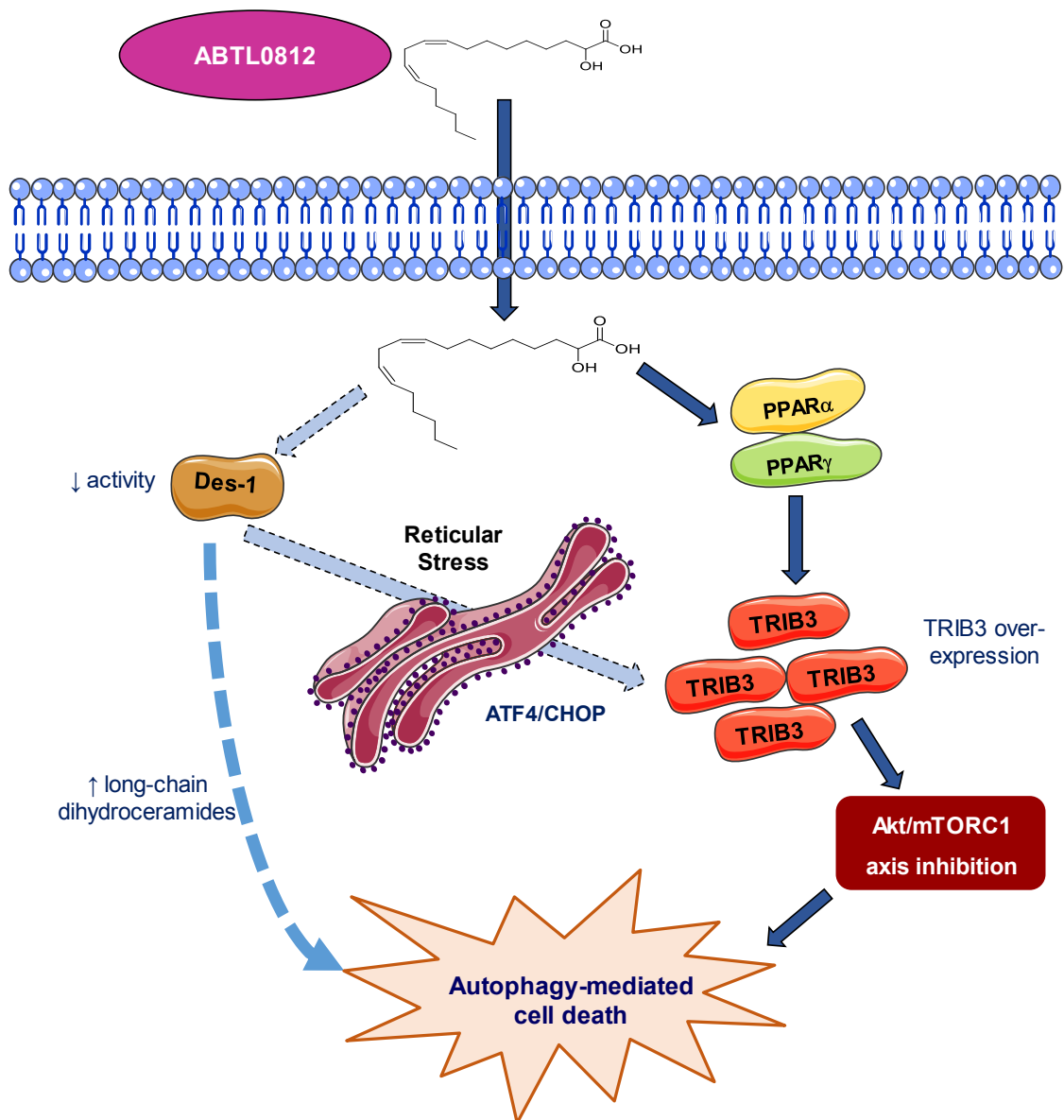
**Figura 56: La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) col·labora amb la inhibició de mTORC1 en la inducció de citotoxicitat en cèl·lules tumorals humanes.** A, Cèl·lules MiaPaca2 (figures superiors) i A549 (figures inferiors) foren tractades durant 24 h amb una combinació de l'inhibidor de Des-1 GT11 i l'inhibidor de mTORC1 Everolimus. La viabilitat cel·lular fou determinada per assaig de MTT (histogrames). Cada valor es la mitjana  $\pm$  SD de 3 experiments diferents fets en triplicat. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb GT11. ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb Everolimus. Els diagrames situats a la dreta mostren l'anàlisi dels índex de combinació (CIs) del GT11 i l'Everolimus. Els isoblogrames i els CIs foren obtinguts emprant les dosis indicades i el programa d'anàlisi Compusyn ( $CI < 1$ , sinèrgisme;  $CI = 1$ , efecte sumatori;  $CI > 1$ , antagonisme). Es varen obtenir resultats similars en 3 determinacions diferents.

A continuació, es van realitzar assajos d'immunoblot per tal de determinar si la combinació de GT11 i Everolimus també sinergitzava en la inducció d'autofàgia a les cèl·lules MiaPaca2 i A549. La **Figura 57** mostra que en ambdues línies cel·lulars el co-tractament amb GT11 i Everolimus indueix una acumulació de LC3-II major que els tractaments per separat. Aquest resultat demostra que la inhibició de Des-1 i de mTORC1 col·laboren en l'activació d'autofàgia.



**Figura 57: La inhibició de la desaturasa-1 (Des-1) col·labora amb la inhibició de mTORC1 en la promoció d'autofàgia.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser tractades durant 24 h amb una combinació de l'inhibidor de Des-1 GT11 i l'inhibidor de mTORC1 Everolimus, i la lipidació de LC3 (LC3-II) va ser monitoritzada per immunoblot. Els nivells de LC3-II van ser normalitzats per l'actina i estimats amb unitats densitomètriques (histogrames). Es van obtenir resultats similars en 3 experiments separats. \*\*,  $P < 0.01$  respecte de les cèl·lules tractades amb GT11. ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb Everolimus.

El conjunt de resultats obtinguts porten a confeccionar un nou mapa conceptual dels mecanismes subjacents a l'acció antitumoral de l'ABTL0812. El fàrmac actuaria de forma paral·lela a través de dos eixos. Per un costat l'ABTL0812 activa els receptors  $PPAR\alpha/\gamma$ , que indueixen la sobreexpressió de TRIB3 que indueix la inhibició d'Akt i, en conseqüència, la inactivació del complex mTORC1. Per l'altre costat, l'ABTL0812 inhibiria l'enzim Des-1, fet que induiria l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga i l'activació d'estrès reticular. Ambdós eixos del mecanisme sinergitzen en l'activació d'autofàgia robusta i mort cel·lular (**Figura 58**).



**Figura 58: Nou esquema del mecanisme d'acció de l'ABTL0812.** L'ABTL0812 actua activant els receptors PPAR $\alpha/\gamma$  i compromentent l'activitat de la desaturasa-1 (Des-1). Aquests dos esdeveniments conflueixen en la sobreexpressió de la pseudoquinasa TRIB3 que uneix i inhibeix Akt i porta a la inhibició del complex mTORC1. L'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga associada a la baixada en l'activitat de la Des-1 col·labora amb la inhibició de mTORC1 per induir mort mediada per autofàgia.

# **RESULTATS – CAPÍTOL 4**





L'ABTL0812 compleix els criteris establerts que defineixen la mort cel·lular mediada per autofàgia. Per un costat l'ABTL0812 indueix autofàgia dinàmica a les cèl·lules tumorals, i per l'altre, el bloqueig farmacològic i genètic de l'autofàgia reverteix la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812. Tanmateix, es desconeixien els mecanismes que regien la mort cel·lular induïda per l'ABTL0812.

Diversos autors han descrit mecanismes que relacionen l'alteració d'esfingolípid, l'activació d'estrès reticular i la inducció de mort mediada per autofàgia, tres dels trets característics de l'acció del ABTL0812. Per un costat, s'han descrit compostos amb activitat antitumoral, com el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) o l'esfingosina, que indueixen mort cel·lular via permeabilització de membrana lisosomal (LMP) (Boya and Kroemer, 2008; Hernández-Tiedra et al., 2016). Per l'altre costat, alguns autors han reportat que l'acumulació de ceramides a la membrana mitocondrial dirigeix els mitocondris als autofagosomes a través d'interacció ceramida amb LC3-II, induint mitofàgia robusta que resulta letal per la cèl·lula (Sentelle et al., 2012; Mizumura et al., 2014). Altres autors han reportat que la inhibició de la Des-1 resulta en l'acumulació de dihidroesfingolípid, alteració de la funció mitocondrial, inducció de mitofàgia robusta i mort cel·lular (Siddique et al., 2013). Tenint en compte aquests antecedents, a continuació es van començar estudis per tal d'establir si la mitofàgia i/o la permeabilització de membrana lisosomal estaven implicades en la mort cel·lular induïda per l'ABTL0812.

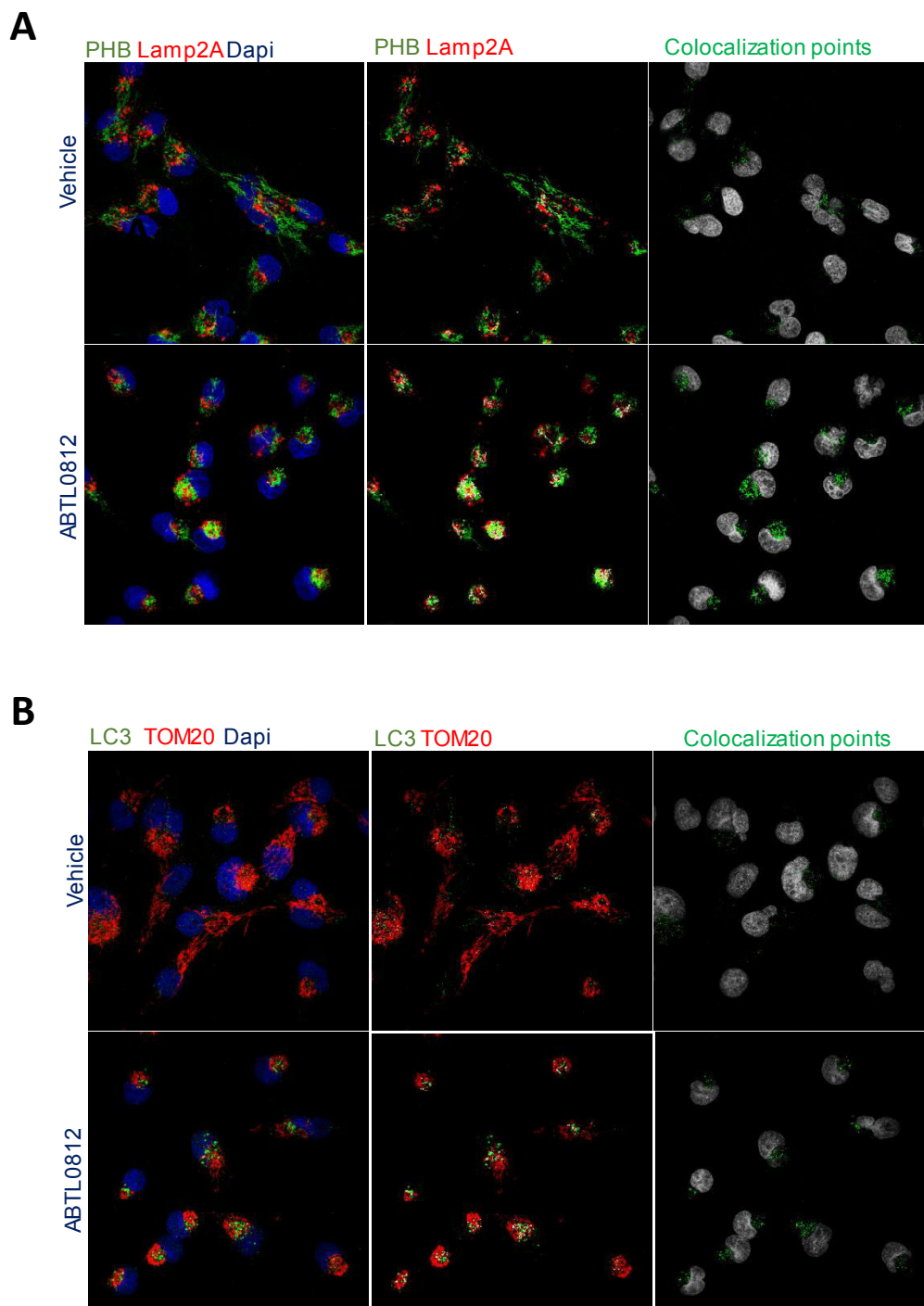
### 4.1- ABTL0812 i mitofàgia

La mitofàgia consisteix en un procés d'autofàgia selectiva que té com a objectiu la degradació específica de mitocondris. Amb l'objectiu de valorar si l'ABTL0812 induïa mitofàgia, en primer lloc es van tractar cèl·lules MiaPaca2 durant 18 hores amb ABTL0812 (temps de tractament suficient per activar autofàgia; **Figura 36**) i es van dur a terme experiments d'immunocitoquímica per avaluar l'estat de la xarxa mitocondrial i la co-localització de mitocondris amb marcadors lisosomals i autofagosomals. Aquests experiments van ser realitzats per la Dra. Sonia Hernández-Tiedra de la Universidad Complutense de Madrid.

En primer lloc, l'ús dels marcadors mitocondrials prohibitina (verd, **Figura 59A**) i TOM20 (vermell, **Figura 59B**) va permetre constatar que l'ABTL0812 indueix una desorganització de la xarxa mitocondrial, que passa d'estar estesa per tota la cèl·lula a retraure's i mostrar un patró puntejat. La **Figura 59A** mostra l'estudi de la co-localització del marcador lisosomal Lamp2A i el marcador mitocondrial prohibitina, on s'observa que el tractament amb ABTL0812 resulta en un augment de la co-localització d'ambdós marcadors. Aquest fet s'observa d'una manera més clara als panells de la dreta, on es representen els nuclis en gris i els punts de co-localització dels marcadors en verd. En paral·lel, a la **Figura 59B** s'observa que el tractament amb ABTL0812 també indueix una major co-localització del marcador d'autofagosomes LC3 i el marcador mitocondrial TOM20.

## RESULTATS – CAPÍTOL 4

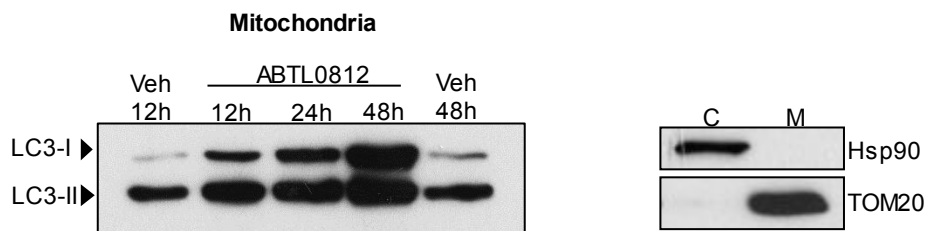
En conjunt, aquests resultats suggereixen que el tractament de cèl·lules amb ABTL0812 indueix una alteració de l'organització de la xarxa mitocondrial, i una co-localització dels mitocondris amb lisosomes i amb autofagosomes que podria ser indicativa de mitofàgia.



**Figura 59: L'ABTL0812 indueix la co-localització de mitocondris amb lisosomes i amb autofagosomes.** Cèl·lules MiaPaca2 foren tractades 18 h amb ABTL0812 100  $\mu$ M, fixades amb paraformaldehid, els marcadors mitocondrials (prohibitina i TOM20), lisosomal (Lamp2A) i autofagosomal (LC3) foren analitzats per immunofluorescència, i visualitzats per microscòpia confocal. **A**, Monitorització del marcador mitocondrial PHB (prohibitina, verd) i el marcador lisosomal Lamp2A (vermell). Nuclis marcats amb Dapi (blau). Els panells de la

dreta mostren els nuclis en gris i els punts de co-localització dels marcadors PHB i Lamp2A en verd. **B**, Monitorització del marcador mitocondrial TOM20 (vermell) i el marcador d'autofagosoma LC3 (verd). Nuclis marcats amb Dapi (blau). Els panells situats a la dreta mostren els nuclis (gris) i els punts de co-localització dels marcadors TOM20 i LC3 (verd).

A continuació, es va dur a terme un fraccionament subcel·lular per aïllar la fracció mitocondrial de cèl·lules MiaPaca2 tractades amb ABTL0812 i corroborar bioquímicament l'associació de mitocondris i autofagosomes suggerida pel resultat obtingut amb immunocitoquímica. La **Figura 60** (panell esquerre) mostra que el tractament amb ABTL0812 induïx una acumulació progressiva temps-dependent del marcador d'autofagosomes LC3-II a la fracció mitocondrial. La puresa de la fracció mitocondrial obtinguda va ser validada a través de la detecció dels marcadors de fracció TOM20 (mitocondrial) i citosòlic (Hsp90) (**Figura 60 panell dret**). En conjunt, els resultats indicaven de forma preliminar que l'ABTL0812 induïx una interacció de mitocondris amb autofagosomes.



**Figura 60: L'ABTL0812 induïx l'acumulació del marcador d'autofagosomes LC3-II a la fracció mitocondrial.** Cèl·lules MiaPaca2 foren tractades 12, 24 i 48 h amb ABTL0812 100  $\mu$ M. Seguidament es va dur a terme un fraccionament subcel·lular per obtenir una fracció enriquida en mitocondris (descriu a l'apartat de Material i Mètodes). La lipidació de LC3 (LC3-II) a la fracció mitocondrial es monitoritzà per immunoblot (panell superior). Les proteïnes Hsp90 (marcador citosòlic, C) i TOM20 (marcador mitocondrial, M) van ser detectades per immunoblot per determinar la puresa de les fraccions obtingudes. Es van obtenir resultats anàlegs en 3 experiments separats.

La via canònica de regulació de la mitofàgia està controlada per tres proteïnes: PINK1, parkina i ubiquitina. PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) és una serina/treonina quinasa que disposa a la seva estructura d'una senyal de localització mitocondrial que promou el seu reclutament a la membrana externa dels mitocondris. PINK1 actua com a sensor de l'estat dels mitocondris. En condicions normals, PINK1 és importada a l'interior dels mitocondris; quan la funcionalitat dels mitocondris està alterada, la ràtio d'internalització i degradació de

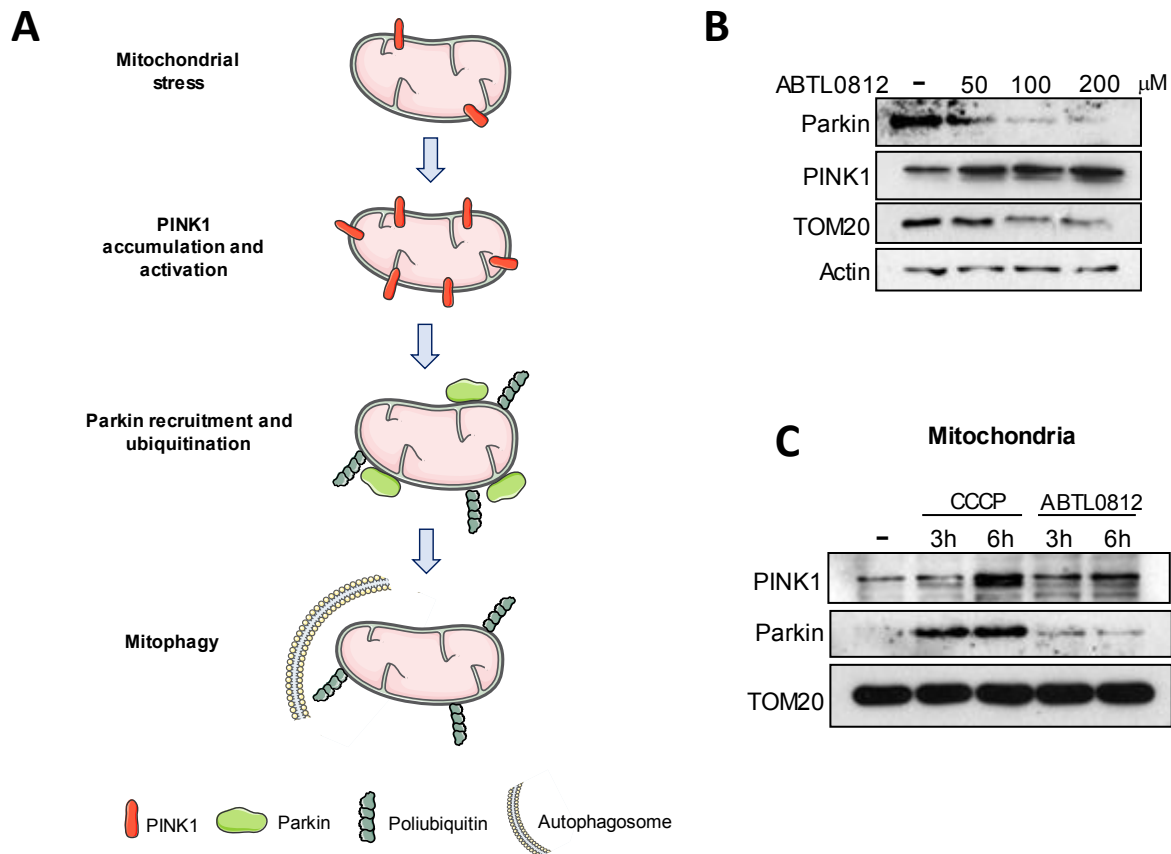
## RESULTATS – CAPÍTOL 4

---

PINK1 disminueix, i PINK1 s'autofosforila, dimeritza i s'estabilitza a la membrana mitocondrial externa, exposant el seu domini quinasa al citosol (Matsuda et al., 2010). Tot seguit, PINK1 recluta la proteïna ubiquitina E3 lligasa citosòlica parkina (Shlevkov and Schwarz, 2014). PINK1 fosforila ubiquitines (monomèriques o poliubiquitines) ja conjugades a la membrana externa mitocondrial, que actuen com a senyal de reclutament de la parkina, que hi interacciona i s'activa (Koyano et al., 2014). Parkina, un cop activa i localitzada a la membrana mitocondrial externa, pot ubiquitinar diverses proteïnes i/o generar cadenes a partir de les ubiquitines ja presents (Shlevkov and Schwarz, 2014). La darrera part de la via de mitofàgia és regulada per les proteïnes de càrrega de la maquinària d'autofàgia selectiva (Bingol and Sheng, 2016) (**Figura 61A**).

Per estudiar si l'ABTL0812 activa mitofàgia regulada per la via PINK1/parkina es van analitzar mitjançant assaig d'immunoblot lisats de cèl·lules MiaPaca2 tractades 48 hores amb concentracions creixents d'ABTL0812. La **Figura 61B** mostra que l'ABTL0812 indueix de manera dosi-dependent un augment en l'expressió cel·lular de PINK1. Per contra, els nivells de parkina i del marcador mitocondrial TOM20 disminueixen (**Figura 61B**), fet que podria ser degut que la mitofàgia es troba en etapes avançades i ja s'ha produït l'eliminació de mitocondris.

Amb la finalitat d'avaluar els efectes derivats de tractament a temps curts, es va obtenir la fracció mitocondrial de cèl·lules MiaPaca2 tractades durant 3 i 6 hores amb ABTL0812 o l'inductor de mitofàgia CCCP. El CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona) actua com un ionòfor i provoca la despolarització dels mitocondris, induint l'acumulació de PINK1 i el reclutament de parkina (Narendra et al., 2008). La **Figura 61C** mostra que el tractament amb ABTL0812 resulta en l'acumulació de PINK1 i el reclutament de parkina a la fracció mitocondrial, com succeeix pel control positiu de mitofàgia CCCP. Tant en el cas del tractament amb ABTL0812 com en el del CCCP s'aprecien una sèrie de bandes per sota de la banda de PINK1 que corresponen a la seva fragmentació, típica de processos de mitofàgia.



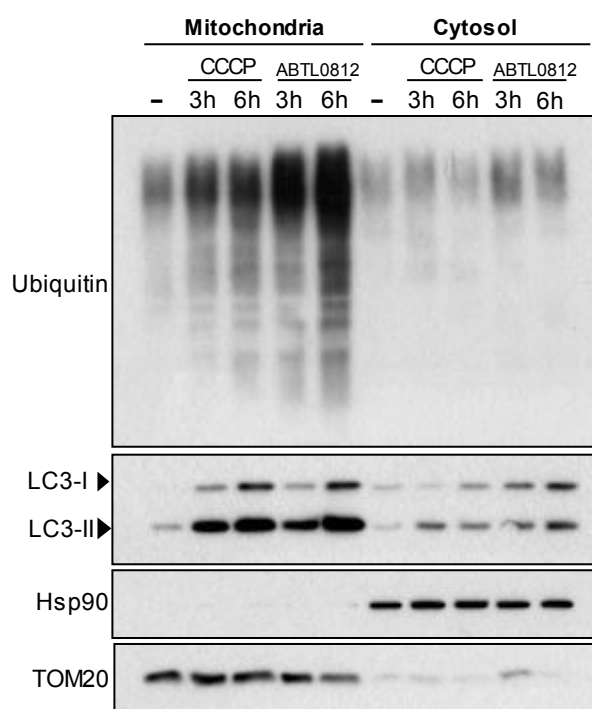
**Figura 61: L'ABTL0812 induïx la fragmentació de PINK1 i l'acumulació de parkina a la fracció mitocondrial. A,** Esquema de la via canònica de mitofàgia. Com a conseqüència de l'alteració mitocondrial es produeix una baixada en el ritme d'internalització de la serina/treonina quinasa PINK1, que s'acumula a la membrana mitocondrial externa. PINK1 estable i activa recluta la parkina citosòlica a la membrana externa mitocondrial, on s'activa i ubiquitina proteïnes de la superfícies del mitocondri. Les proteïnes ubiquitinades són reconegudes per LC3 i d'altres efectors d'inicialització d'autofàgia. **B,** Cèl·lules MiaPaca2 tractades amb ABTL0812 100 μM durant 48h van ser analitzades per immunoblot per visualitzar els nivells dels marcadors de mitofàgia parkina i PINK1, i el marcador mitocondrial TOM20. Els nivells d'actina es mostren com a control de càrrega. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments diferents. **C,** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades 3 i 6 h amb vehicle (etanol), l'inductor de mitofàgia CCCP (50 μM), o ABTL0812 (100 μM), i es va aplicar un protocol de fraccionament subcel·lular (descriu a l'apartat de Material i Mètodes). La fracció mitocondrial va ser analitzada per immunoblot per visualitzar els marcadors de mitofàgia PINK1 i parkina, i el marcador mitocondrial TOM20. Es van obtenir resultats anàlegs en 3 experiments separats.

L'ABTL0812 induïa l'acumulació de PINK1 i el reclutament de parkina a la fracció mitocondrial, per la qual cosa es van analitzar les fraccions citosòlica i mitocondrial de les cèl·lules MiaPaca2, tractades 3 i 6 hores amb ABTL0812, per monitoritzar si el tractament també induïa la ubiquitinació específica de proteïnes de la fracció mitocondrial, esdeveniment propi de la via de mitofàgia regulada per PINK1/parkina. La **Figura 62** mostra que tant l'ABTL0812 com el CCCP induïen la ubiquitinació mitocondrial a les 3 hores de tractament, sense

## RESULTATS – CAPÍTOL 4

observar-se canvis a la fracció citosòlica. A més a més, ambdós tractaments indueixen l'acumulació de LC3-II a la fracció mitocondrial, que és superior a l'observada per la fracció citosòlica. Els marcadors de fracció TOM20 (mitocondrial) i Hsp90 (citosòlic) confirmen la puresa de les fraccions obtingudes.

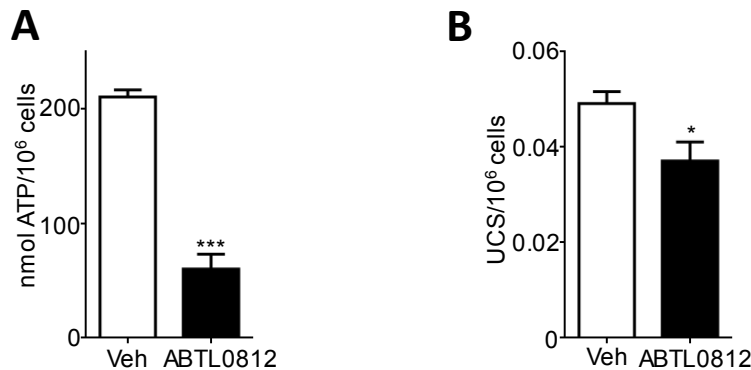
El conjunt de resultats obtinguts mostren que el tractament amb ABTL0812 activa la via canònica de mitofàgia regulada per PINK1, parkina i ubiquitinació de proteïnes mitocondrials.



**Figura 62: El tractament amb ABTL0812 indueix la ubiquitinació de proteïnes mitocondrials.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades 3 o 6 h amb vehicle (etanol), l'inductor de mitofàgia CCCP (50  $\mu$ M) o ABTL0812 (100  $\mu$ M). Es van obtenir les fraccions citosòlica i mitocondrial, que van ser analitzades per immunoblot per monitoritzar la ubiquitinació mitocondrial i la lipidació de LC3 (LC3-II). Hsp90 i TOM20 es mostren com a marcadors de les fraccions citosòlica i mitocondrial, respectivament. Es van obtenir resultats similars en 3 experiments separats.

A continuació es va estudiar si l'activació de mitofàgia observada tenia com a conseqüència la disminució de la massa mitocondrial. Amb aquest objectiu es van dur a terme assajos de determinació de nivells d'ATP i quantificació d'activitat de la proteïna mitocondrial citrat sintasa (mesura acceptada de determinació del contingut mitocondrial cel·lular). El tractament de cèl·lules MiaPaca2 amb ABTL0812 resulta en un dràstic descens dels nivells d'ATP cel·lular, per sota del 40% dels nivells de la condició control (**Figura 63A**). D'altra banda, l'ABTL0812 indueix una significativa disminució d'aproximadament un 20% en l'activitat citrat sintasa

mostra (**Figura 63B**). Aquests resultats indicarien que, als temps avaluats de tractament (24 h), l'ABTL0812 altera la funció mitocondrial que resulta en una disminució marcada dels nivells d'ATP cel·lular i una lleu reducció del *pool* mitocondrial, suggerint que l'ABTL0812 té un efecte inhibidor de la funció mitocondrial sense alterar dràsticament el *pool* mitocondrial. Aquests resultats podrien estar relacionats amb l'activació de la via de mitofàgia regulada per PINK1/parkina per part de l'ABTL0812.



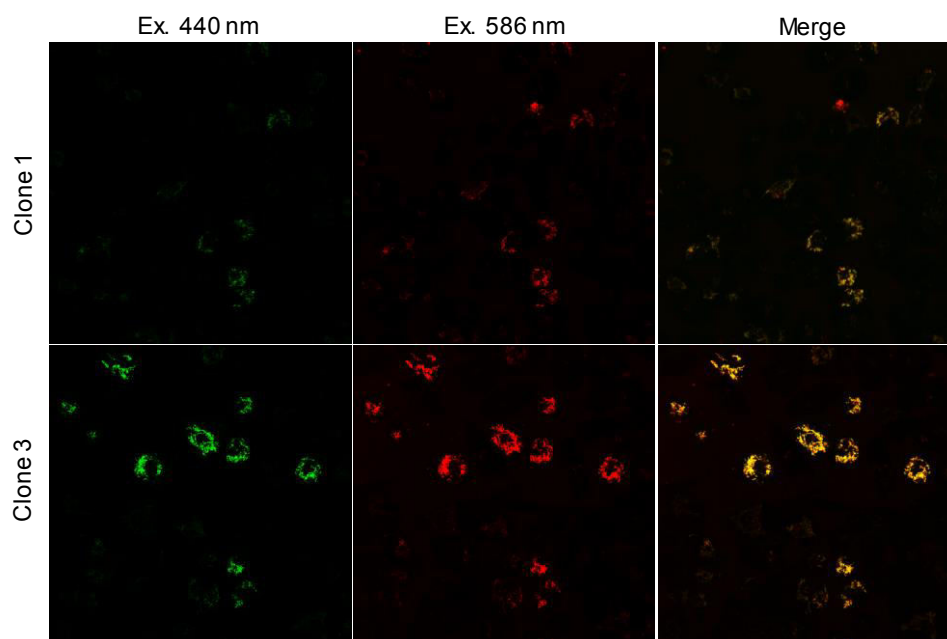
**Figura 63: L'ABTL0812 indueix una davallada dels nivells d'ATP i del *pool* mitocondrial en cèl·lules tumorals.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser tractades 24 h amb vehicle (columnes blanques) o ABTL0812 100  $\mu$ M (columnes negres). **A**, Determinació dels nivells d'ATP cel·lular (dades expressades en nmol d'ATP per 10<sup>6</sup> cèl·lules) aplicant la tècnica descrita a l'apartat de Material i Mètodes. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle. **B**, Quantificació de les unitats de citrat sintasa (UCS, dades expressades en unitats d'enzim per 10<sup>6</sup> cèl·lules) aplicant la tècnica descrita a l'apartat de Material i Mètodes. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*,  $P < 0.05$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

La mitofàgia és un procés dinàmic i la seva avaluació a nivell bioquímic presenta limitacions a l'hora de demostrar la inclusió dels mitocondris a autofagosomes i de definir els temps de cada esdeveniment. Per superar aquestes limitacions, es va començar la posada a punt d'una metodologia que permet fer el seguiment *in vivo* de la mitofàgia cel·lular. Aquest mètode es basa en la proteïna mKeima-Red, que conté una seqüència de localització mitocondrial situada a l'extrem N-terminal. La proteïna Keima presenta un espectre d'excitació depenent del pH, de manera que en ambients neutres predomina una longitud d'ona d'excitació de 440 nm (color verd), mentre que en ambients àcids (típics dels lisosomes i autolisosomes) predomina una longitud d'ona d'excitació de 586 nm (color vermell; emissió a 620 nm en ambdós casos). D'aquesta manera, es poden monitoritzar processos de mitofàgia *in vivo*.

Cèl·lules MiaPaca2 van ser transfectades amb el plasmidi que codifica per la proteïna mKeima-Red i que expressa resistència a l'antibiòtic G418 (geneticina). Les cèl·lules van ser sotmeses a un procés de selecció



amb l'antibiòtic que va permetre l'obtenció de dos clons que expressen la proteïna Keima de forma estable (clons 1 i 3, **Figura 64**). L'excitació a les longituds d'ona de 440 nm (verd; predominant a pH neutre) i 586 nm (vermell; predominant a pH àcid) permeten visualitzar la proteïna mKeima expressada pels clons. La posada a punt d'aquesta metodologia permetrà estudiar processos de mitofàgia *in vivo*, per observar de forma dinàmica si el tractament amb ABTL0812 indueix la inclusió de mitocondris a autolisosomes.



**Figura 64: Generació de clons estables que expressen la proteïna mKeima-Red.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser transfectades amb el constructe mKeima-Red-Mito-7 i seleccionades amb l'antibiòtic G418 per obtenir clons amb expressió estable del plasmidi (descriu a l'apartat de Material i Mètodes). Es mostren el clon 1 i 3, que van ser analitzats *in vivo* per microscòpia confocal per validar la correcta expressió de la proteïna fluorescent mKeima-Red. S'ensenya el senyal de fluorescència emès a 620 nm a l'excitar a 440 nm (verd), o a 586 nm (vermell), les longituds d'ona d'excitació predominants en ambients neutres o àcids, respectivament. Els panells de la dreta mostren la superposició de les dues imatges que la precedeixen.

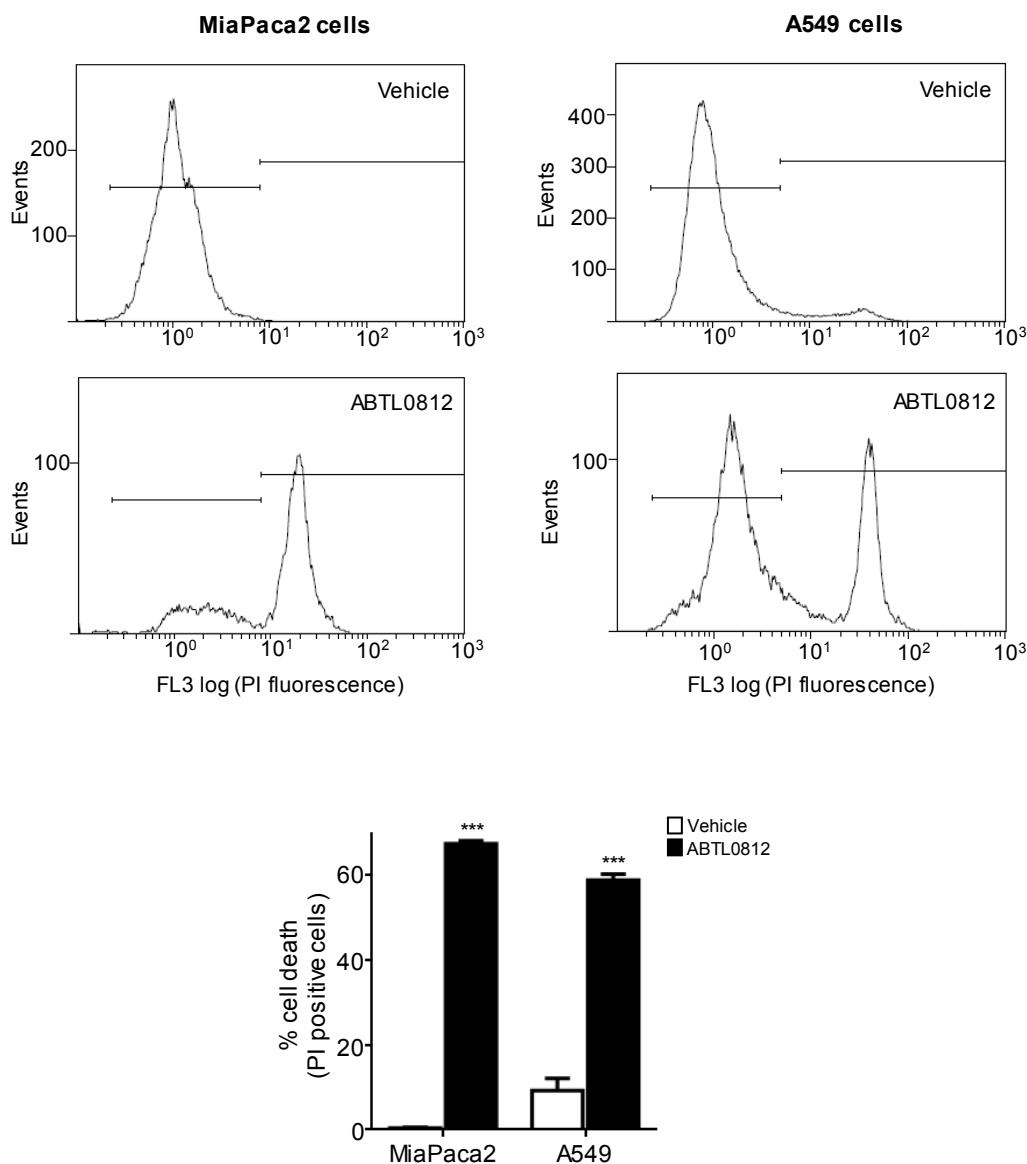
### 4.2- ABTL0812 i permeabilització de la membrana lisosomal (LMP)

Els lisosomes són vesícules de bicapa lipídica única que reben molècules procedents de les vies secretora, endocítica, fagocítica i autofàgica. L'alt contingut d'enzims hidrolítics als lisosomes els fa potencialment lesius per a la cèl·lula, essent les catepsines les hidrolases lisosomals més ben caracteritzades. Alteracions a la membrana lisosomal possibiliten la sortida del seu contingut al citosol, on les catepsines són mediadores de mort cel·lular. El procés d'alliberament de catepsines lisosomals al citosol és conegut amb el nom de permeabilització de la membrana lisosomal (LMP, *lysosomal membrane permeabilization*). En funció de si

l'alteració de la membrana lisosomal és lleu, o bé si la seva ruptura és massiva, s'indueix mort per apoptosi o necrosi, respectivament (Boya and Kroemer, 2008; Turk and Turk, 2009).

Factors com la radiació UV, proteïnes víriques i bacterianes, o espècies reactives d'oxigen indueixen LMP parcial per dany directe a la membrana (Guicciardi et al, 2000; Yuan et al., 2002; Terman et al, 2006). En d'altres casos, la LMP parcial pot ser deguda a l'alteració dels components lipídics de la membrana lisosomal, que la desestabilitza i la fa més permeable. Hernández-Tiedra i col·laboradors han descrit que el THC ( $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol) indueix un augment de la ràtio dihidroceramida:ceramida a la membrana de reticle endoplasmàtic, que té com a conseqüència el canvi de composició lipídica de la membrana lisosomal que esdevé més rígida i es produeix l'alliberació de catepsines al citosol, i la conseqüent activació de mort cel·lular (Hernández-Tiedra et al., 2016). En aquests casos, l'alliberació moderada de catepsines B, L, i D, activa efectors apoptòtics com ara els mitocondris i/o les caspases (Tardy et al., 2006; Terman et al., 2006). Alternativament, es pot activar mort cel·lular independent de caspases (Broker et al., 2004; Modjtahedi et al., 2006).

Donat que l'ABTL0812 indueix un canvi en el rati dihidroceramida:ceramida i que les cèl·lules tumorals tractades amb aquest compost moren de forma abrupta i sense activació aparent d'apoptosi, a continuació ens vam plantejar si l'ABTL0812 induïa LMP i mort per necrosi. Per validar aquesta hipòtesi, en primer lloc es va determinar per assaig d'incorporació de iodur de propidi i citometria de flux si el tractament amb ABTL0812 de les cèl·lules MiaPaca2 i A549 induïa la disrupció de la membrana plasmàtica, característica pròpia de la mort per necrosi. El iodur de propidi és un agent fluorescent intercalant del DNA. En cèl·lules vives o apoptòtiques, que presenten una membrana plasmàtica íntegra, el iodur de propidi no hi entra i no marca el seu DNA. En canvi, si que pot penetrar aquelles membranes que estan deteriorades i presenten forats, com és el cas de les cèl·lules necròtiques. La **Figura 65AB** mostra que el tractament amb ABTL0812 indueix l'entrada de iodur de propidi tant a les cèl·lules MiaPaca2 (70% de cèl·lules positives) com a les A549 (60% de cèl·lules positives), fet que indica que un alt percentatge de cèl·lules tractades amb ABTL0812 moren per necrosi.

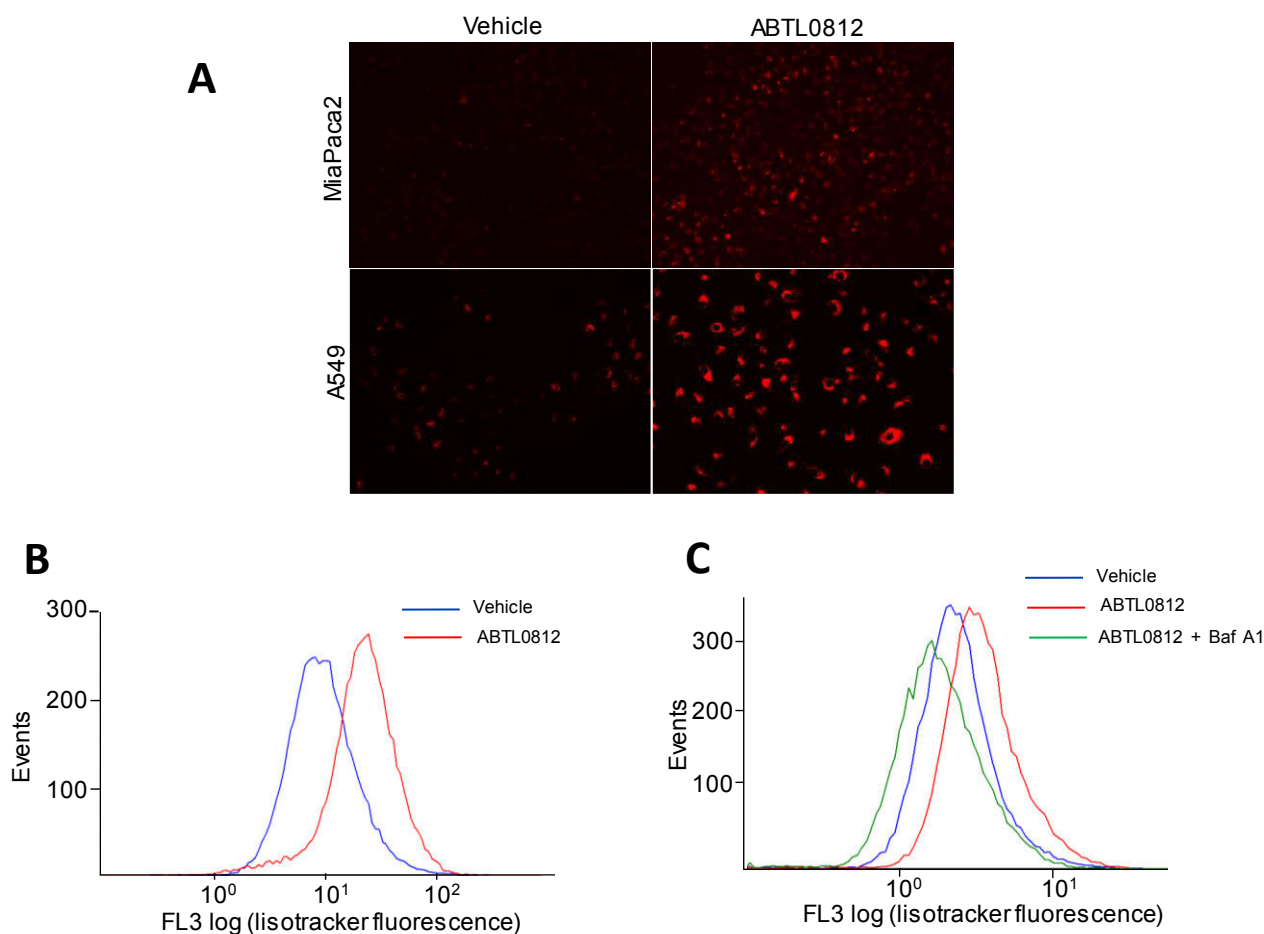


**Figura 65: L'ABTL0812 indueix necrosi a les cèl·lules tumorals.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 tractades 24 h amb vehicle (etanol) o ABTL0812 200  $\mu$ M, van ser incubades amb iodur de propidi (IP) i analitzades per citometria de flux. Els gràfics mostren les poblacions de cèl·lules en funció del grau de fluorescència de iodur de propidi (FL3 log) que presenten. L'histograma representa les dades obtingudes per citometria i mostra el percentatge de cèl·lules positives per iodur de propidi (cèl·lules mortes) al ser tractades amb vehicle (columnes blanques) o ABTL0812 (columnes negres). Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 experiments diferents. \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

Es va plantejar la possibilitat que la necrosi induïda per l'ABTL0812 fos conseqüència de l'acumulació i permeabilització de lisosomes i autolisosomes altament actius. Per corroborar aquesta hipòtesi, en primer lloc es va realitzar un marcatge *in vivo* d'òrgànuls àcids emprant lisotracker, un fluoròfor associat a una base dèbil que s'acumula de forma específica als òrgànuls àcids (Chazotte, 2011). La **Figura 66A** mostra que el tractament amb ABTL0812 incrementa el senyal del marcatge amb lisotracker, indicatiu que hi ha més òrgànuls àcids i que aquests presenten una major acidificació al seu lumen. Malgrat que en ambdues línies les cèl·lules tractades amb ABTL0812 mostren més intensitat de marcatge, el senyal observat a les cèl·lules A549 és molt més intens que el de les MiaPaca2. Tenint en compte això, vam decidir prosseguir únicament amb les cèl·lules A549 als experiments de tinció amb lisotracker. La **Figura 66B** presenta la quantificació per citometria de flux del senyal de lisotracker emès per cèl·lules A549 tractades amb vehicle (blau) o ABTL0812 (vermell), on s'aprecia com el tractament de les cèl·lules amb ABTL0812 induïx un desplaçament evident de la corba d'intensitat de fluorescència poblacional.

El lisotracker no s'acumula de forma exclusiva als lisosomes i autolisosomes, de manera que la fluorescència detectada podia ser deguda a altres òrgànuls àcids. Per això, es va valorar si l'increment de senyal observat en resposta a l'ABTL0812 estava majoritàriament associat a canvis en lisosomes i autolisosomes. L'acció catabòlica de les hidrolases residents als lisosomes depèn del seu ambient altament àcidic (pH 4.5-5.0). Aquest pH àcid al lumen dels lisosomes es genera i es manté gràcies a l'acció del complex proteic multimèric transmembrana H<sup>+</sup>-ATPasa, que actua com a bomba de protons transferint-los en contra del gradient electroquímic des del citosol al lumen lisosomal (Boya and Kroemer, 2008).

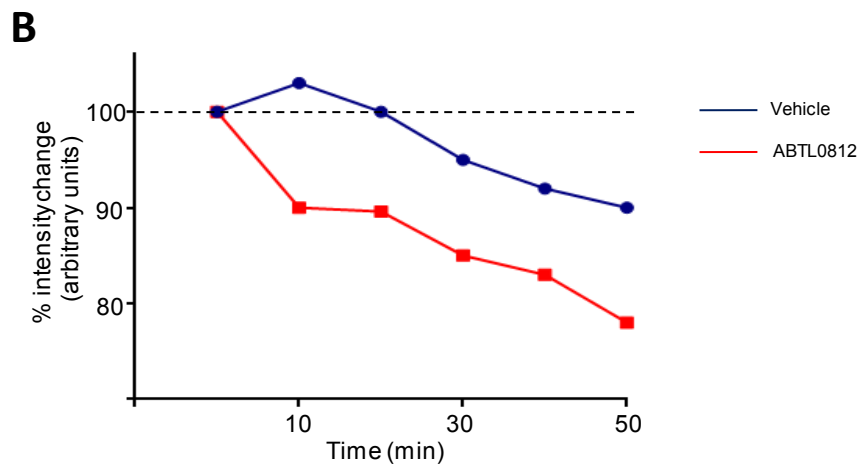
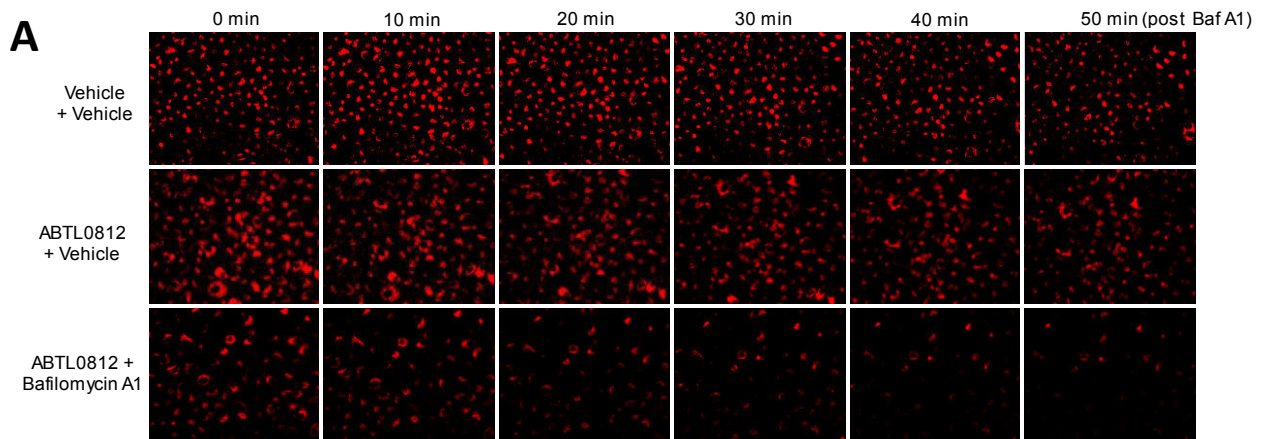
A continuació, cèl·lules A549 es van tractar amb ABTL0812, es van marcar amb lisotracker i es van incubar amb Bafilomicina A1, un inhibidor específic de les bombes de protons vacuolars ATPases de tipus V (Boya et al., 2003). Si el marcatge detectat era degut majoritàriament a l'acumulació de lisotracker a lisosomes i autolisosomes, la neutralització del pH luminal promouria la desprotonació progressiva del fluoròfor que difondria i disminuiria el senyal emès. A la **Figura 66C** s'observa que la inhibició de les bombes de protons vacuolars amb Bafilomicina A1 (corba verda) reverteix el desplaçament de la corba de fluorescència de lisotracker induït per l'ABTL0812 (corba vermella). El senyal de lisotracker emès per les cèl·lules tractades amb Bafilomicina A1 disminueix a uns nivells anàlegs als de la condició control (corba blava). En conjunt, els resultats obtinguts mostren que l'ABTL0812 induïx una acumulació robusta de lisosomes i autolisosomes i/o la seva acidificació.



**Figura 66: L'ABTL0812 induïx l'acumulació de lisosomes a la cèl·lula tumoral.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser tractades 48 h amb vehicle (etanol) o ABTL0812 100  $\mu$ M i tenyides amb el marcador de lisosomes lisotracker *in vivo*. **A**, Imatges de microscòpia de fluorescència mostrant el senyal de lisotracker emès per cèl·lules MiaPaca2 i A549 tractades amb vehicle o ABTL0812. **B**, Quantificació del senyal de lisotracker mitjançant citometria de flux en cèl·lules A549 tractades amb vehicle (blau) o ABTL0812 (vermell). Les dades representen nombre d'esdeveniments per intensitat de fluorescència (FL3 log). Es van obtenir resultats similars en 3 experiments diferents. **C**, Quantificació del senyal de lisotracker mitjançant citometria de flux en cèl·lules A549 tractades amb vehicle (blau), ABTL0812 (vermell) o amb ABTL0812 i l'inhibidor de la bomba de protons lisosomal Bafilomicina A1 (500 nM, verd). La Bafilomicina A1 es va afegir un cop efectuada la tinció amb lisotracker i s'incubà durant 1 h. Les dades representen nombre d'esdeveniments per intensitat de fluorescència (FL3 log). Es van obtenir resultats similars en 3 experiments diferents.

A continuació, es va estudiar si l'ABTL0812 induïa permeabilització de la membrana lisosomal (LMP). Els resultats obtinguts al tractar les cèl·lules amb Bafilomicina A1 van demostrar que la neutralització del pH lisosomal reverteix parcialment l'acumulació de lisotracker. En base a aquests resultats, es va pensar que com a conseqüència de danys importants a la membrana lisosomal, el manteniment del pH als lisosomes i autolisosomes es veuria compromès. La neutralització progressiva del pH dels lisosomes i autolisosomes comportaria la desprotonació del lisotracker acumulat i la seva sortida per difusió. Així doncs, cèl·lules A549 van ser tractades amb ABTL0812, es van tenyir amb lisotracker i se'n va fer el seguiment *in vivo* per

microscòpia d'epifluorescència. Es van obtenir fotos d'un mateix camp de cada condició cada 10 minuts i fins als 50 minuts post-tinció amb lisotracker (**Figura 67A**). Al quantificar el senyal de lisotracker de les seqüències de fotos corresponents a les condicions tractades amb vehicle i ABTL0812, s'observà que la tinció decau més ràpidament a les cèl·lules tractades amb ABTL0812 (**Figura 67B**). En paral·lel, es van incubar cèl·lules amb ABTL0812 i Bafilomicina A1 (**Figura 67A, imatges inferiors**) i es va corroborar que la incubació amb Bafilomicina A1 resulta en una clara disminució de la tinció de lisotracker, fet que valida l'especificitat de marcatge de lisosomes i autolisosomes.

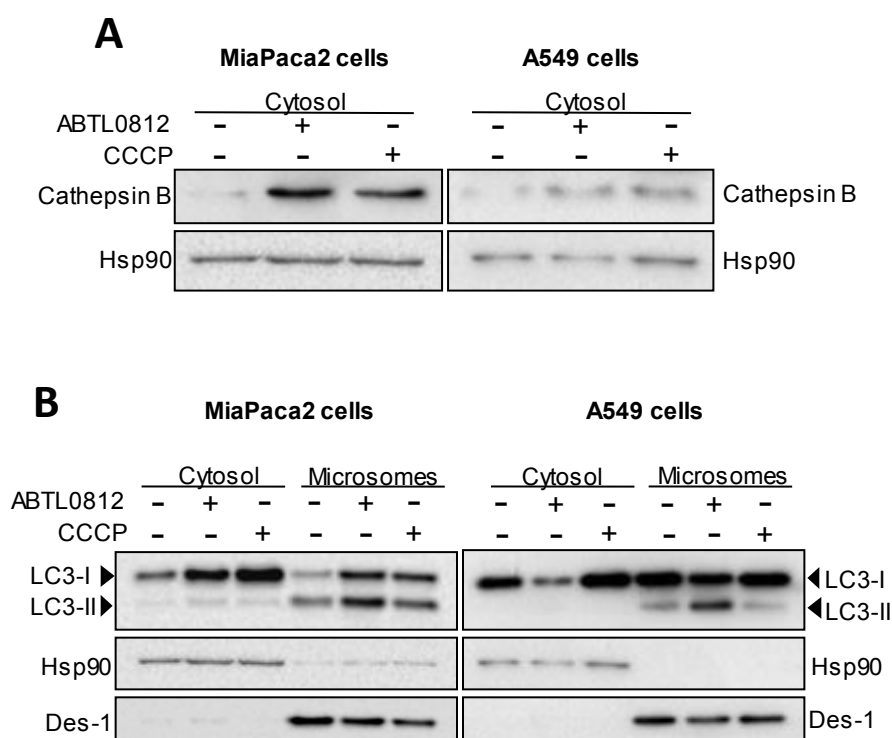


**Figura 67: Els lisosomes de les cèl·lules tractades amb ABTL0812 perden més ràpidament la tinció amb lisotracker.** **A**, Cèl·lules A549 van ser tractades 18 h amb vehicle (etanol) o ABTL0812 100  $\mu$ M i tenyides amb lisotracker *in vivo*. Seguidament es van tractar amb vehicle o Bafilomicina A1 500 nM (inhibidor de la bomba de protons lisosomal) i es van visualitzar al microscopi de fluorescència. Es van captar fotos dels mateixos camps cada 10 min durant 50 min. **B**, Quantificació densitomètrica de l'evolució de la tinció amb lisotracker durant 50 min, en cèl·lules tractades 18h amb vehicle (blau) o ABTL0812 100  $\mu$ M (vermell). Les dades estan representades per cada temps en percentatge d'intensitat de marcatge en relació a les imatges adquirides a temps inicial. S'obtingueren resultats similars en 2 experiments separats.

## RESULTATS – CAPÍTOL 4

Els resultats obtinguts mostraven que els lisosomes i autolisosomes de les cèl·lules tractades amb ABTL0812 retenien pitjor el lisotracker, fet que suggeria que l'ABTL0812 induïa LMP i la subseqüent alliberació de catepsines al citosol.

Com s'ha comentat prèviament, la permeabilització de membrana lisosomal és un procés que es caracteritza per l'alliberament de catepsines lisosomals al citosol, on són promotores de mort cel·lular (Boya and Kroemer, 2008). Les catepsines B, L i D són les que s'han implicat en la promoció de mort cel·lular, ja que són les que romanen més actives a pH neutre (Turk and Turk, 2009). Per obtenir evidències bioquímiques que validessin si l'ABTL0812 induïa LMP, a continuació es va monitoritzar la presència de catepsina B a la fracció citosòlica de cèl·lules MiaPaca2 i A549 tractades amb ABTL0812 (**Figura 68A**). L'ABTL0812 indueix la sortida de catepsina B al citosol a ambdues línies cel·lulars, en nivells anàlegs als observats pel CCCP (control positiu de LMP). El CCCP despolaritza els mitocondris i indueix la producció d'espècies reactives d'oxigen, agents que lesionen la membrana lisosomal i promouen LMP (Terman et al., 2006).



**Figura 68: El tractament amb ABTL0812 indueix la sortida de catepsina B dels lisosomes al citosol en cèl·lules tumorals.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser tractades amb vehicle, CCCP 50  $\mu$ M o ABTL0812 100  $\mu$ M durant 24 h. La figura mostra l'anàlisi per immunoblot de la fracció microsomal i citosòlica. **A**, Els nivells de Catepsina B foren visualitzats a les fraccions citosòliques per immunoblot. Hsp90 i la pseudoquinasa TRIB3 es van utilitzar com a controls de càrrega i de tractament, respectivament. Es van obtenir resultats anàlegs en 3 determinacions diferents. **B**, Monitorització de la lipidació de LC3 (LC3-II), i dels marcadors de fracció Hsp90 (citosol) i desaturasa-1 (Des-1, microsomes). Es van obtenir resultats similars en 3 determinacions diferents.

En paral·lel, es va validar que la fracció citosòlica obtinguda fos pura. La fracció microsomal (composta d'estructures endomembranoses, lisosomes, autofagosomes i altres vesícules) és l'última que s'obté en el protocol de fraccionament subcel·lular i és la que contamina amb més facilitat la fracció citosòlica. La **Figura 68B** mostra la detecció dels marcadors citosòlic Hsp90 i microsomal Des-1 (proteïna integral de membrana del reticle endoplasmàtic), i s'observa que les fraccions citosòliques estan lliures de marcadors microsomals. La monitorització dels nivells del marcador d'autofagosomes LC3-II demostra la correcta aplicació del tractament d'ABTL0812, que indueix l'acumulació d'autofagosomes a la fracció microsomal de les cèl·lules MiaPaca2 i A549.

Els resultats obtinguts en aquest darrer experiment de fraccionament subcel·lular demostren bioquímicament que el tractament amb ABTL0812 indueix l'alliberament de contingut lisosomal al citosol. En el futur, caldrà estudiar si la permeabilització de membrana lisosomal observada està directament relacionada amb la mort induïda per l'ABTL0812.





# DISCUSSIÓ



L'ABTL0812 és un derivat d'àcid gras poliinsaturat (àcid linoleic) que forma part d'una nova classe de fàrmacs englobats sota el nom de Fàrmacs Anàlegs de Lípids. L'ABTL0812 és la forma sòdica de l'àcid 2-hidroxi-linoleic. S'ha descrit que la hidroxilació d'àcids grassos dificulta la seva utilització per part de la cèl·lula, incrementant-ne el temps d'acció a l'interior cel·lular (Barceló et al., 2004). Aquest derivat lipídic representa el primer de la seva classe (*first-in-class*) i ha demostrat induir citotoxicitat en un ampli espectre de cèl·lules tumorals humanes *in vitro* i reduir el creixement tumoral en models xenograft de línies cel·lulars tumorals humanes, presentant baixa toxicitat (Erazo et al. 2016). A l'actualitat, l'ABTL0812 es troba en fase clínica 2 de desenvolupament clínic com a tractament de primera línia (en combinació amb quimioteràpia) en pacients de càncer d'endometri avançat i càncer escamós de pulmó de tipus NSCL (identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT03366480). El nostre laboratori s'ha dedicat els darrers anys a la caracterització del mecanisme d'acció implicat en l'activitat antitumoral mostrada per l'ABTL0812.

El mecanisme descrit inicialment pel nostre laboratori consistia que l'ABTL0812 actua com a agonista dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$ . L'activació dels PPARs resulta en un augment de la transcripció i expressió de la pseudoquinasa TRIB3, que uneix Akt i impedeix la seva fosforilació als residus crítics per a la seva activació Ser473 (fosforilat per mTORC2) i Thr308 (fosforilat per PDK1). La inhibició d'Akt resulta en la inactivació del complex mTORC1 i en inducció d'autofàgia robusta que media en la mort de les cèl·lules tumorals (Erazo et al., 2016). Els resultats obtinguts en aquesta Tesi Doctoral mostren que l'ABTL0812, a més d'activar els receptors PPAR $\alpha/\gamma$ , també inhibeix la proteïna desaturasa-1 (Des-1; enzim que catalitza la síntesi de ceramida a partir de dihidroceramida), fet que resultaria en l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga, inducció d'estrès reticular i activació d'autofàgia. En el nostre model, la inhibició de l'eix Akt/mTORC1 i l'activació d'estrès reticular sinergitzen en induir autofàgia robusta i citotoxicitat a les cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549.

### **ABTL0812 i estrès reticular**

Els resultats mostrats en aquest treball i d'altres obtinguts prèviament al laboratori recolzen el fet que la inducció d'autofàgia per l'ABTL0812 és un esdeveniment clau a través del qual el compost indueix la mort de les cèl·lules tumorals. El complex mTORC1 és un regulador màster de l'autofàgia. Tanmateix, la seva inhibició per inhibidors específics no és suficient per induir autofàgia en algunes línies cel·lulars (Kim and Guan, 2015). En experiments realitzat en un panell de cèl·lules de glioma, la rapamicina va demostrar activar autofàgia a les línies U-87 MG i T98G, però en canvi, no va ser suficient per induir-la a les cèl·lules U373-MG, resultats que suggereixen que la rapamicina indueix autofàgia en funció del tipus cel·lular. En molts casos la inhibició del complex mTORC1 és compensada per mecanismes de *feedback* o per mutacions que resulten en la hiperactivació d'efectors apicals de la via PI3K-Akt-mTORC1 (Kim and Guan, 2015). A més

a més, diversos autors han descrit que, en alguns models, l'activació d'autofàgia en resposta a inhibidors específics de mTORC1 està associada a mecanismes de resistència i no a un mecanisme subjacent a l'acció antitumoral del fàrmac (Nam et al., 2013; Ogretmen, 2018).

En aquest treball es mostra que el tractament de les cèl·lules model MiaPaca2 i A549 amb l'inhibidor al·lostèric específic de mTORC1 Everolimus no indueix autofàgia robusta en aquestes cèl·lules. Així mateix, el tractament de cèl·lules A549 amb diversos inhibidors específics de la via PI3K-Akt-mTORC1 (que estan en desenvolupament clínic) no indueixen autofàgia en nivells anàlegs a l'ABTL0812 (**Figura 33C**). Aquests resultats suggereixen que la inhibició de la via PI3K-Akt-mTORC a les línies cel·lulars MiaPaca2 i A549 és insuficient per induir autofàgia robusta. Aquestes observacions, conjuntament amb el fet que els agonistes dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$  (WY14643 i rosiglitazona, respectivament) han demostrat ser incapaços d'activar autofàgia robusta malgrat inhibir de forma eficient l'eix Akt/mTORC1 (**Figura 33A**), suggereixen que el mecanisme d'acció antitumoral de l'ABTL0812 no s'explica exclusivament per la inhibició de l'eix Akt/mTORC1.

Treballs previs del nostre laboratori i resultats inclosos en aquest treball mostren que l'ABTL0812 indueix un increment robust dels nivells de la pseudoquinasa TRIB3, fet cabdal per mediar la inhibició de l'eix Akt/mTORC1 induïda per l'ABTL0812 (**Figura 26**). Alguns autors han mostrat que TRIB3 interacciona amb Akt, prevenint la seva fosforilació per quinases apicals i comportant la supressió de la via de la insulina (Du et al., 2003; Liu et al., 2012). Al laboratori hem observat que el TRIB3 sobre-expressat en resposta a l'ABTL0812 uneix Akt i la inhibeix (**Figura 24**; Erazo et al., 2016). A més a més, mitjançant experiments d'immunoprecipitació es va determinar que el tractament amb ABTL0812 incrementa la interacció entre TRIB3 i Akt (Erazo et al., 2016), resultats que van en la línia dels observats per Velasco i col·laboradors en cèl·lules de glioma tractades amb THC, on aquest compost indueix una inhibició d'Akt mediada per la sobreexpressió de TRIB3. (Salazar et al., 2009b).

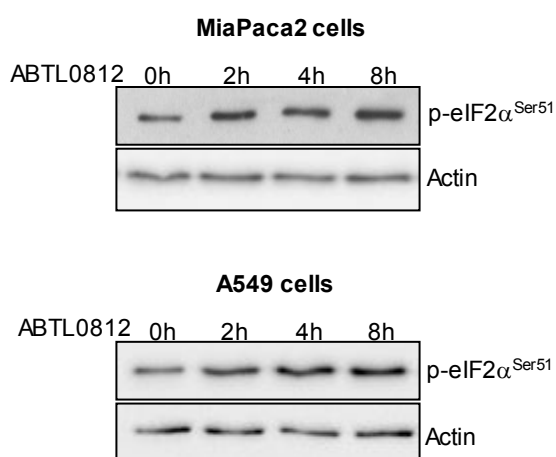
TRIB3, entre d'altres funcions reguladores, també actua com a proteïna efectora de la resposta UPR (*unfolded protein response*) a l'estrès reticular (Örd, 2008). L'estrès reticular desenvolupa un rol eminentment adaptatiu a la cèl·lula. De fet, l'estrès reticular i l'autofàgia són processos que s'han relacionat amb la promoció tumoral en etapes primerenques de desenvolupament del tumor i amb mecanismes de resistència a teràpies antitumorals (Introducció d'aquest treball) (Avril et al., 2017; Levy et al., 2017). Tanmateix, en funció de la intensitat de l'estrès reticular i del context cel·lular, el resultat final de l'activació de la resposta UPR o de l'autofàgia pot ser citotòxic (Gozuacik et al., 2008; Avril et al., 2017).

En aquesta Tesi s'ha determinat que l'ABTL0812 indueix estrès reticular robust a les cèl·lules tumorals de pàncrees (MiaPaca2) i de pulmó (A549). En col·laboració amb altres laboratoris, hem observat que l'ABTL0812 també indueix estrès reticular a diferents línies tumorals de càncer d'endometri, de mama i en

neuroblastoma (resultats no mostrats), cosa que suggereix que aquest tipus d'estrès podria ser un esdeveniment universal de la resposta cel·lular al tractament amb ABTL0812.

Per un costat, s'ha observat la dilatació del reticle endoplasmàtic, una de les principals característiques a nivell morfològic que identifiquen l'existència d'estrès reticular (Smith and Wilkinson, 2017) (**Figura 35**). Així mateix, en aquest treball s'ha establert que el tractament amb ABTL0812 indueix un augment dels nivells de la xaperona BiP i dels factors de transcripció ATF4 i CHOP, totes elles proteïnes mediadores de la resposta UPR. Aquest increment dels nivells dels marcadors d'estrès reticular BiP, ATF4 i CHOP es produeix amb anterioritat (6 hores) a l'acumulació del marcador d'autofagosomes LC3-II (24 hores) (**Figura 36**). Aquests resultats suggereixen que la inducció d'estrès reticular és un esdeveniment primerenc del tractament amb ABTL0812, previ a l'activació d'autofàgia, i anirien en consonància amb el reportat per diferents autors que han identificat compostos amb activitat antitumoral, com ara els cannabinoides o la salinomicina, que exerceixen el seu efecte via inducció d'estrès reticular i activació de la resposta UPR, que resulta en la sobreexpressió de TRIB3, inhibició de l'eix Akt/mTORC1 i mort cel·lular mediada per autofàgia (Salazar et al., 2009b; Verfaillie et al., 2010; Salazar et al., 2013; Li et al., 2013).

Resultats obtinguts recentment al laboratori mostren que l'ABTL0812 també promou la inhibició del factor eIF2 $\alpha$  (fosforilació del residu Ser51) a les 2 hores de tractament, fet que reforça la hipòtesi que la inducció d'estrès reticular és un dels primers efectes cel·lulars associats a l'ABTL0812 (**Figura 69**). La inhibició d'eIF2 $\alpha$  comporta la inhibició de la síntesi general proteica, mentre que es fomenta la traducció específica de proteïnes associades a la resposta UPR, com ara BiP, ATF4 i CHOP. eIF2 $\alpha$  pot ser fosforilat per diverses quinases, com ara PERK, PKR, HRI o GCN2 (Chevet et al., 2015; McQuiston and Diehl, 2017), però no hem identificat quina d'elles està implicada en la fosforilació d'eIF2 $\alpha$  en resposta a l'ABTL0812.



**Figura 69: L'ABTL0812 indueix la fosforilació d'eIF2 $\alpha$  a les cèl·lules tumorals.** Cèl·lules MiaPaca2 i A549 van ser tractades amb ABTL0812 100  $\mu$ M els temps indicats. Els nivells de fosforilació d'eIF2 $\alpha$  (Ser51) i d'actina van ser monitoritzats per immunoblot.

Mitjançant la inhibició farmacològica de la resposta UPR emprant l'àcid biliar secundari tauroursodeoxicolat sòdic (TUDC), s'ha mostrat de forma preliminar que la inducció d'estrès reticular per part de l'ABTL0812 està relacionada amb la citotoxicitat exercida pel fàrmac (**Figura 39**). El TUDC actua com a xaperona química i entre les seves múltiples accions a la cèl·lula hi ha la d'afavorir l'activitat del factor ATF6 (resposta UPR) i atenuar la senyalització mediada per l'eix PERK/eIF2 $\alpha$  (Vang et al., 2014; Uppala et al., 2017). Una activació persistent de l'eix PERK/eIF2 $\alpha$  s'associa a una fallida de la resposta UPR i comporta l'activació de programes de mort cel·lular (Verfaillie et al., 2010). El TUDC, inhibint la fosforilació d'eIF2 $\alpha$ , limita el potencial efecte citotòxic d'un estrès reticular crònic. L'observació que el pre-tractament de les cèl·lules tumorals MiaPaca2 i A549 amb TUDC reverteix parcialment la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 suggereix, en la línia dels resultats exposats, que l'eix PERK/eIF2 $\alpha$  desenvolupa un paper central en la mediació de la resposta UPR activada per l'ABTL0812. Malgrat tot, el TUDC també s'ha relacionat amb efectes antioxidants i anti-apoptòtics (Vang et al., 2014; Uppala et al., 2017), de manera que s'ha de ser curós a l'hora d'interpretar els resultats obtinguts utilitzant aquest compost. Per corroborar la rellevància de l'estrès reticular en la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 serà necessari validar genèticament la implicació de cadascuna de les vies que integren la resposta UPR. Considerant que l'eix ATF4-CHOP-TRIB3 s'activa de forma robusta en resposta a l'ABTL0812 serà important estudiar si el silenciament o deleció d'ATF4, factor de transcripció que controla l'expressió de CHOP i TRIB3, té com a conseqüència la reversió de la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812.

ATF4 i CHOP són dos membres de la família de factors de transcripció bZIP (*basic leucine zipper*) i regulen l'expressió de la pseudoquinasa TRIB3, mitjançant la interacció amb la regió C/EBP-ATF del promotor del gen de TRIB3 (Kilberg et al., 2009). La mateixa TRIB3 forma part d'un circuit de *feedback* negatiu. TRIB3 s'uneix als dominis de transactivació d'ATF4 i CHOP i les inhibeix, i fa el mateix així amb la seva pròpia expressió. Si els nivells d'estrès reticular són moderats, TRIB3 es manté en nivells baixos al regular negativament l'eix de senyalització ATF4-CHOP-TRIB3. Si, per contra, l'estrès reticular és intens i sostingut, la sobre-expressió continuada de TRIB3 indueix autofàgia i apoptosi (Jousse et al., 2007). En aquest treball es mostra que l'ABTL0812 indueix una robusta sobre-expressió de TRIB3 (**Figura 21**), fet que estaria lligat a la inducció d'estrès reticular intens i amb potencial citotòxic.

L'anàlisi de tumors xenograft de cèl·lules MiaPaca2 i A549 de ratolins tractats amb ABTL0812 ha permès constatar la inducció d'estrès reticular en model animal (**Figures 40 i 41**). Aquests resultats sustenten que la inducció d'estrès reticular per ABTL0812 també succeeix *in vivo* i reforça la rellevància d'aquest procés en el mecanisme d'acció de l'ABTL0812.

D'interès, el tractament de les cèl·lules A549 amb inhibidors de la via PI3K-Akt-mTORC1 (en desenvolupament clínic) no indueix estrès reticular. Aquests resultats suggereixen que en el nostre model

cel·lular l'activació de la resposta UPR per part de l'ABTL812 és un esdeveniment diferencial respecte d'altres compostos antitumorals dirigits específicament a la via PI3K-Akt-mTORC1, i que podria constituir un avantatge envers aquests composts competidors (**Figura 36**).

### **TRIB3 i CHOP com a biomarcadors farmacodinàmics**

La caracterització del mecanisme d'acció de l'ABTL0812 ha permès posar a punt biomarcadors farmacodinàmics que estan sent utilitzats en l'actualitat en el desenvolupament clínic del fàrmac. La quantificació dels mRNA de TRIB3 i CHOP, dues proteïnes sobreexpressades de forma robusta en resposta al tractament amb ABTL0812, s'ha establert com a biomarcadors farmacodinàmics de referència per fer el seguiment dels pacients enrolats en la Fase Clínica 2 amb càncer escamós de pulmó de tipus NSCL i d'endometri avançat (identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT03366480).

En aquest treball s'ha posat a punt un protocol de quantificació de mRNA de mostra sanguínia de pacients i s'ha demostrat la idoneïtat del mètode per extreure RNA total de qualitat i quantitat suficient per procedir a la quantificació dels mRNA de TRIB3 i CHOP mitjançant RT-qPCR. Aquest protocol d'anàlisi podria ser utilitzat en un futur per avaluar canvis als nivells sanguinis de mRNAs d'altres biomarcadors. Així mateix, l'anàlisi de les mostres de pacients humans obtingudes fins al moment ha permès monitoritzar l'increment progressiu dels nivells dels mRNA de TRIB3 i CHOP en resposta al tractament amb ABTL0812 (**Figures 42 i 58**), resultats que reforcen el mecanisme d'acció descrit per l'ABTL0812 i ratifiquen que la robusta inducció d'estrès reticular n'és un esdeveniment rellevant.

Considerant tota la bibliografia revisada, el treball realitzat en aquesta Tesi permet establir per primera vegada els mRNA de dues proteïnes implicades en la resposta UPR com a biomarcadors farmacodinàmics per al desenvolupament clínic d'un fàrmac. Tanmateix, si bé és cert que la quantificació dels mRNA de TRIB3 i CHOP ha demostrat ser idònia per fer el seguiment dels pacients tractats amb ABTL0812, el seu ús com a biomarcador es preveu limitat a un nombre específic de casos en què la inducció d'estrès reticular s'associï a l'efecte antitumoral del compost.

### **L'ABTL0812 indueix canvis en l'esfingolipidoma cel·lular**

#### **Acumulació de dihidroceramides de cadena llarga**

Els resultats obtinguts en aquesta Tesi suggereixen que l'activació de la resposta UPR és un esdeveniment inicial de l'acció de l'ABTL0812 i que és mediador de l'activitat antitumoral del fàrmac. Diversos autors han caracteritzat el mecanisme d'acció de compostos amb activitat antitumoral que indueixen citotoxicitat a través de l'activació d'estrès reticular via alteració del metabolisme d'esfingolípid (Fabriàs et al., 2012). Els



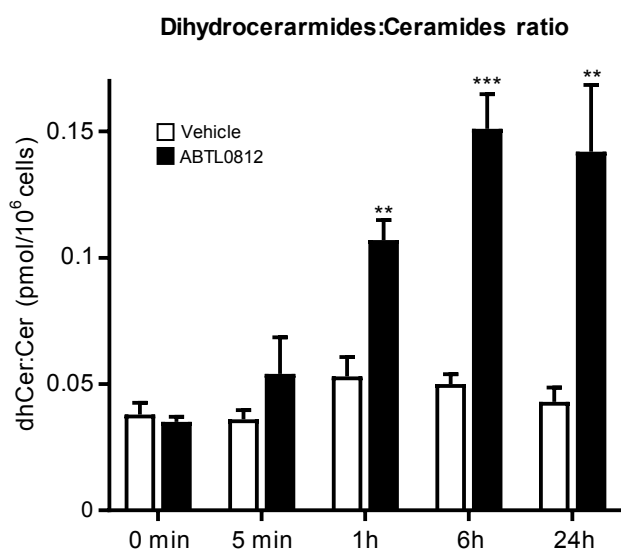
esfingolípidis són una família àmplia de lípids de membrana que juguen un important paper bioactiu regulant funcions diverses com ara la divisió cel·lular, la diferenciació, l'estrès reticular, l'autofàgia i l'apoptosi (Rao et al., 2013). Malgrat que els esfingolípidis contribueixen en baixa proporció al *pool* de lípids cel·lulars, variacions en els seus nivells tenen gran rellevància en la funcionalitat cel·lular i estan relacionats amb l'etiologia de diverses malalties, com ara diabetis, malalties neurodegeneratives o càncer (Lahiri and Futerman, 2007).

L'estudi per espectrometria de masses de l'esfingolipidoma de cèl·lules MiaPaca2 ha demostrat que a les 6 hores de tractament amb ABTL0812 s'indueix l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga sense afectar els nivells de ceramides (**Figura 44**), temps de tractament en què s'observa l'increment dels nivells dels marcadors d'estrès reticular BiP, ATF4 i CHOP (**Figures 36**). Aquest fet suggereix que ambdós esdeveniments estan relacionats i que precedeixen la inducció d'autofàgia. En el futur serà interessant validar *in vivo*, en models de tumors xenograft, si el tractament amb ABTL0812 induïx l'acumulació de dihidroceramides als tumors del ratolins tractats.

Els resultats obtinguts amb l'ABTL0812 van en la línia del reportat pel compost antitumoral THC, que primàriament induïx l'acumulació de ceramides a la cèl·lula tumoral, fet que resulta en la inducció d'estrès reticular, activació d'autofàgia i mort cel·lular per apoptosi (Salazar et al., 2009a; Salazar et al., 2009b; Salazar et al., 2013). Així mateix, s'ha descrit que el tractament amb tamoxifè també induïx l'acumulació de ceramides que medien el seu efecte citotòxic (Scarlatti et al., 2004), o que el resveratrol activa autofàgia via acumulació de dihidroceramides (Signorelli et al., 2009). Noack i col·laboradors, mostren que la combinació de la temozolamida amb un inhibidor de l'enzim esfingosina quinasa promou l'acumulació de dihidroesfingosina i dihidroceramida, que induïxen estrès reticular i estrès oxidatiu, que resulten en activació d'autofàgia i mort cel·lular per apoptosi (Noack et al., 2014).

El doble enllaç que distingeix les dihidroceramides de les ceramides altera de forma marcada les seves propietats biofísiques, tals com la seva elasticitat o assemblatge. Les dihidroceramides són molt menys abundants que les ceramides, són precursoras d'esfingolípidis complexos (dihidroesfingomielina, dihidroglucosilceramides, etc.) i han sigut considerades biomolècules inertes durant anys (Siddique et al., 2015). Els treballs realitzats amb dihidroceramides de cadena curta (entre 2 i 6 carbonis) van mostrar que eren incapaces de reproduir l'efecte anti-proliferatiu demostrat per les ceramides (Fabriàs et al., 2012). Ara bé, quan es van estudiar les dihidroceramides de cadena llarga el paradigma va canviar. En un primer treball es va atorgar a les dihidroceramides de cadena llarga la capacitat d'inhibir la formació de canals als mitocondris per part de la ceramida, inhibint d'aquesta manera la mort cel·lular per apoptosi (Stiban et al., 2006). Des d'aquell moment, s'han succeït els estudis que han ratificat el paper bioactiu de les dihidroceramides.

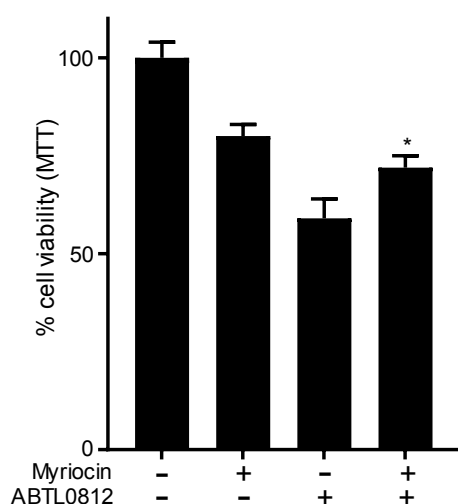
Velasco i col·laboradors han descrit recentment que el THC, a més d'induir l'acumulació de ceramides, indueix un augment robust en els nivells de dihidroceramides (Hernández-Tiedra et al., 2016). Aquesta acumulació de dihidroceramides resulta en un canvi en la composició de membrana del RE que té com a conseqüència la inducció d'estrès reticular. Els autors van establir l'increment de la ràtio dihidroceramides:ceramides com a paràmetre determinant en l'activació d'estrès reticular i mediació de l'activitat antitumoral del THC (Hernández-Tiedra et al., 2016). En el nostre cas, l'ABTL0812 indueix un augment progressiu de la relació dihidroceramides:ceramides a partir d'1 hora de tractament, mentre que a les cèl·lules control es manté constant (**Figura 70**). Aquest fet suggereix que en condicions basals la ràtio dihidroceramides:ceramides és una relació estable a les cèl·lules tumorals i que el desequilibri en la relació dels nivells de dihidroceramides i ceramides derivat del tractament amb ABTL0812, i no els canvis en cada espècie d'esfingolípids per separat, seria el determinant per mediar el seu efecte citotòxic.



**Figura 70: L'ABTL0812 indueix l'increment de la ràtio dihidroceramides:ceramides a les cèl·lules tumorals.** Càlcul de les ràtios dihidroceramides:ceramides pels temps indicats de tractament amb ABTL0812 100  $\mu$ M en cèl·lules MiaPaca2. S'utilitzaren els valors de dihidroceramides i ceramides totals determinats per espectrometria de masses i mostrats a la figura 43 del Capítol 3 de resultats. Les dades estan expressades en pmol d'esfingolípids per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada valor és la mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions diferents. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  respecte de les cèl·lules tractades amb vehicle.

D'interès, el tractament de les cèl·lules tumorals amb el derivat deuterat de dihidroceramida d2c8DhCer corrobora que l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga resulta en la inducció d'estrès reticular, activació d'autofàgia i mort cel·lular (**Figures 48 i 49**). Tanmateix es desconeix si les espècies de dihidroceramides que s'acumulen a la cèl·lula com a resultat del tractament amb d2c8DhCer són les mateixes que per l'ABTL0812, de manera que serà necessari validar-ho per espectrometria de masses. Així mateix, s'han començat a realitzar experiments de bloqueig farmacològic de l'enzim SPT (serina palmitoiltransferasa; enzim iniciador de la via de síntesi *de novo* de ceramida) per determinar si la inhibició

de l'acumulació de dihidroceramides reverteix la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812. La **Figura 71** mostra de forma preliminar que la inhibició de la SPT amb l'inhibidor específic miriocina reverteix parcialment la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 i suggereix la implicació de les dihidroceramides en la mort de les cèl·lules tumorals.



**Figura 71: La inhibició de l'enzim serina palmitoiltransferasa reverteix parcialment la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812.** Cèl·lules MiaPaca2 van ser pre-incubades amb vehicle (etanol) o miriocina (inhibidor de la SPT; 5  $\mu$ M) durant 5 hores. A continuació, les cèl·lules van ser tractades amb ABTL0812 35  $\mu$ M durant 48 h. La viabilitat cel·lular fou determinada per assaig de MTT. Cada valor representa la mitjana  $\pm$  SD de 3 experiments diferents. \*,  $P < 0.05$  respecte de les cèl·lules tractades amb ABTL0812.

### L'ABTL0812 indueix la inactivació de la desaturasa-1

La majoria de resultats que apunten a un rol bioactiu de les dihidroceramides s'han obtingut a través de l'estudi del mecanisme d'acció de compostos inhibidors de l'enzim desaturasa-1 (Des-1) (Fabriàs et al., 2012). Les nostres investigacions mostren que l'ABTL0812 indueix l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga a través de la inhibició de la Des-1. Aquest enzim forma part de la via de síntesi *de novo* de ceramida i catalitza la introducció d'un doble enllaç 4,5-trans a la dihidroceramida per generar ceramida (Michel et al., 1997). Com s'ha comentat a la Introducció, els mamífers expressen dues dihidroceramides desaturases, Des-1 i Des-2, essent la Des-1 la ubiqua (Causeret et al., 2005). Des-1 es troba a la cara citosòlica de la membrana del RE, regió on té lloc la reacció. Aquesta reacció és dependent del sistema de transport d'electrons del citocrom b5, que co-localitza a la cara citosòlica de la membrana del RE (Michel et al., 1997; Rodríguez-Cuenca et al., 2015). Tot això impossibilita la realització d'assajos d'activitat *in vitro* amb Des-1 pura i és per aquest motiu que l'avaluació de l'activitat de Des-1 en resposta al tractament amb ABTL0812 s'ha dut a terme utilitzant lisats cel·lulars o directament en cèl·lules en cultiu. En conseqüència, no es pot afirmar si l'ABTL0812 inhibeix directament Des-1, o bé si la seva inhibició és conseqüència d'altres factors, com ara de la inducció d'estrès reticular. Els resultats exposats en aquesta Tesi no permeten establir si la inducció d'estrès reticular és prèvia o posterior a l'acumulació de dihidroceramides.

La sobreexpressió de TRIB3 (**Figura 21**) i la inhibició per fosforilació d'eIF2 $\alpha$  (**Figura 69**) a les dues hores de tractament amb ABTL0812 suggereixen que l'activació de la resposta UPR es produeix amb anterioritat a l'acumulació de dihidroceramides (6 hores de tractament). Tanmateix, els assajos per espectrometria de masses mostren una tendència d'acumulació de dihidroceramides a l'hora de tractament que malgrat no ser significativa es podria explicar per la variabilitat intrínseca a aquesta metodologia experimental (**Figura 44**). D'interès, la ràtio dihidroceramides:ceramides sí que experimenta un increment clar a l'hora de tractament amb ABTL0812 (**Figura 70**). A més, l'assaig d'activitat de Des-1 en cultiu cel·lular mostra una inhibició significativa en resposta a l'ABTL0812 a les 6 hores de tractament, fet que suggereix que la inhibició s'inicia a temps més curts (**Figura 50**). Serà de gran importància dur a terme experiments a temps curts de tractament amb ABTL0812 per avaluar la inducció d'estrès reticular i la inhibició de Des-1, per tal de poder definir de forma acurada els tempos de cada esdeveniment.

Diversos autors han reportat que la inhibició de Des-1 està associada a l'activitat antitumoral d'alguns composts (Fabriàs et al., 2012). El resveratrol, un polifenol amb activitat antioxidant i antitumoral, induïx autofàgia a les cèl·lules d'adenocarcinoma gàstric humà HGC-27 via inhibició de Des-1 i acumulació de dihidroceramides (Signorelli et al., 2009). Per un altre costat, s'ha descrit que la curcumina (compost natural amb propietats quimioterapèutiques que induïx arrest del cicle cel·lular en G<sub>2</sub>/M) presenta activitat inhibidora de la Des-1 (Fabriàs et al., 2012). Altrament, la transfecció de cèl·lules de neuroblastoma humà SMS-KCNR amb un siRNA dirigit al transcrit de DES1 promou l'acumulació de dihidroceramides endògenes, inhibició del creixement cel·lular i arrest del cicle cel·lular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Siddique et al., 2015). Per últim, s'ha descrit que el THC també inhibeix la Des-1 *in vitro*, amb una IC<sub>50</sub> de 23  $\mu$ M (Fabriàs et al., 2012). Tanmateix, encara no s'ha determinat el rol que desenvolupen les dihidroceramides acumulades en l'acció antitumoral de la majoria d'aquests compostos.

La inhibició de Des-1 resulta en l'acumulació d'altres dihidroesfingolípidis que, com la dihidroceramida, presenten activitat biològica (Fabriàs et al., 2012). D'especial interès són la dihidroesfingomielina i la dihidroesfingosina, ambdues generades a partir de la dihidroceramida. Diversos autors han descrit que l'augment de dihidroesfingomielines en la composició de membranes comporta la formació de dominis més rígids que modulen la senyalització cel·lular (Siddique et al., 2015) i que l'acumulació de dihidroesfingosina induïx citotoxicitat a cèl·lules tumorals (Wang et al., 2008). D'interès, s'ha reportat que la combinació d'inhibidors de Des-1 amb la sobre-expressió de la ceramidasa alcalina Asah3L (enzim que catalitza la hidròlisi de la dihidroceramida per generar dihidroesfingosina) sinergitzen en la inducció de citotoxicitat a cèl·lules tumorals (Mao et al., 2010). Aquest fet, atorga a les dihidroesfingosines un rol pro-citotòxic superior al de les dihidroceramides.

L'acumulació de dihidroceramides a la cèl·lula resulta en l'activació de mecanismes orientats a disminuir l'excés de dihidroceramides. De forma preferencial, s'indueix la formació de dihidroesfingomielines que provocarà canvis en la fluïdesa de membrana, fet que té com a conseqüència canvis en la senyalització transmembrana. Per altre costat, la dihidroceramida pot ser hidrolitzada a dihidroesfingosina que indueix mort cel·lular. Alternativament, la dihidroceramida pot ser convertida a dihidroesfingosina-1-fosfat, espècie a la que s'atorga un paper citoprotector (Fabriàs et al., 2012). El balanç en la generació de les diferents espècies pro-mort o pro-supervivència dependrà del tipus cel·lular i de la intensitat del tractament inhibidor de les Des-1. Els nostres resultats mostren que l'ABTL0812 indueix l'acumulació de dihidroesfingomielines (augment de més del 100%) sense afectar els nivells d'esfingomielines (**Figura 46**). Aquestes observacions reforcen els resultats obtinguts en què es mostra que l'ABTL0812 inhibeix Des-1 i indueix l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga. Serà rellevant determinar si l'ABTL0812 també indueix un augment dels nivells de l'espècie citotòxica dihidroesfingosina (generada per la hidròlisi de dihidroceramides). D'interès, a l'assaig d'activitat quinasa *in vitro* que es va realitzar en un panell de 17 quinases lipídiques s'hi van incloure les quinases Sphk1 i Sphk2 (esfingosina quinasa 1 i 2) (**Figura 20**), enzims implicats en la generació dels esfingolípid pro-supervivència dihidroesfingosina-1-fosfat i esfingosina-1-fosfat. L'ABTL0812 no indueix canvis significatius en l'activitat quinasa d'aquests enzims, suggerint que el tractament resulta en l'acumulació d'espècies inductores de mort cel·lular però no fomenta la generació d'espècies pro-supervivència. Caldrà validar per anàlisi d'espectrometria de masses si l'ABTL0812 indueix canvis en els nivells d'esfingosina-1-fosfat i dihidroesfingosina-1-fosfat.

Els resultats d'esfingolipidòmica mostren que el tractament amb ABTL0812 resulta en una tendència a la reducció dels nivells de glucosil i lactosilceramides, esfingolípid derivats de les ceramides i sintetitzats generalment per tamponar l'excés citotòxic de ceramides (**Figura 47**). Aquests resultats suggereixen que, en resposta a la inhibició de Des-1, part de les glucosil i lactosilceramides podrien ser convertides a ceramides per mantenir-ne els nivells cel·lulars.

L'estudi dels efectes cel·lulars derivats de la inhibició de Des-1 als nostres models cel·lulars s'ha dut a terme utilitzant l'inhibidor específic de la Des-1 GT11, el primer inhibidor sintètic de Des-1 que es va reportar (Triola et al., 2003). El GT11 és un derivat de la ceramida que conté un ciclopropè que inhibeix competitivament la Des-1 amb una  $K_i$  de 6  $\mu\text{M}$  (Triola et al., 2001). El GT11 ha demostrat ser específic per a la Des-1 fins a concentracions de 5  $\mu\text{M}$ , concentració que s'ha tingut en compte a l'hora de dissenyar els experiments que formen part d'aquesta Tesi. La inhibició específica de la Des-1 ha permès constatar que resulta en uns efectes cel·lulars anàlegs als observats pel tractament amb ABTL0812. El tractament amb GT11 (6 hores) indueix l'acumulació específica de dihidroceramides de cadena llarga sense afectar els nivells de ceramides, tal com fa l'ABTL0812 (**Figures 51 i 52**). Així mateix, els nostres resultats mostren que el GT11 indueix estrès reticular, activa autofàgia dinàmica, i indueix mort cel·lular mediada per autofàgia

(demostrat en cèl·lules MEF ATG5<sup>-/-</sup>) (**Figura 54**). D'interès, la inhibició de Des-1 per GT11 és menys citotòxica per a les cèl·lules normals (astròcits primaris de rata), suggerint que les cèl·lules tumorals són més sensibles a l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga, inducció d'estrès reticular i activació d'autofàgia (**Figura 55**). Aquests resultats reforcen els obtinguts prèviament que mostren que l'ABTL0812 és selectiu per a les cèl·lules tumorals, i suggereixen que la inhibició de Des-1 i activació d'estrès reticular podrien ser mecanismes subjacents a la citotoxicitat selectiva del compost. En aquest sentit, l'estudi de l'activitat de Des-1 i de l'esfingolipidoma de cèl·lules no tumorals tractades amb ABTL0812 podria ajudar a determinar si el compost induïx canvis diferents a l'esfingolipidoma respecte de les cèl·lules tumorals.

### **Sinergisme de l'estrès reticular i la inhibició del complex mTORC1**

Amb anterioritat, el nostre grup va descriure que l'ABTL0812 activa els receptors PPAR $\alpha/\gamma$ , que induïxen la sobreexpressió de la pseudoquinasa TRIB3. TRIB3 uneix i inhibeix Akt i, com a conseqüència, es produeix la inhibició del complex mTORC1 i l'activació d'autofàgia (Erazo et al., 2016). En aquest treball, es mostra que l'ABTL0812 també actua inhibint Des-1, fet que provoca l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga que induïrien l'activació d'estrès reticular i autofàgia.

L'activació dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$  i la inducció d'estrès reticular redunden en la sobreexpressió de TRIB3, fet que situa aquesta pseudoquinasa com a node central de l'acció antitumoral de l'ABTL0812. S'ha contemplat la possibilitat que la inducció d'estrès reticular fos conseqüència de l'activació dels PPAR $\alpha/\gamma$  però experiments preliminars duts a terme al laboratori suggereixen que els agonistes específics dels PPAR $\alpha/\gamma$  no promouen l'aparició de marcadors associats a la resposta UPR (resultats no mostrats).

Els experiments realitzats en aquesta Tesi han demostrat que el tractament amb ABTL0812 resulta en la inducció gènica de TRIB3 i el subseqüent augment dels nivells del seu mRNA i de la proteïna (**Figura 21**). El sistema de transcripció i traducció de TRIB3 és versàtil, en condicions d'estrès cel·lular el transcrit i la proteïna de TRIB3 poden ser estabilitzats i el seu temps de vida s'incrementa de forma substancial (Rzymiski et al., 2008; Izrailit et al., 2017). En el futur serà interessant determinar si l'increment en els nivells de mRNA i proteïna de TRIB3 induït per l'ABTL0812 és degut en part a un augment del seu temps de vida mitjà, que podria explicar-se per l'activació d'estrès reticular. En aquesta línia, tenint en compte que TRIB3 és degradada via ubiquitin-proteasoma (Örd and Örd, 2017) serà d'interès estudiar si la combinació d'ABTL0812 amb inhibidors de proteasoma resulta en una major acumulació de TRIB3 i en la potenciació de l'acció citotòxica de l'ABTL0812 sobre les cèl·lules tumorals.

En aquest treball es mostra que la inhibició específica del complex mTORC1 i la inducció d'estrès reticular via inactivació de Des-1 sinergitzen a induir autofàgia i citotoxicitat a les cèl·lules tumorals (**Figures 56 i 57**).

La inactivació de Des-1 resulta en l'acumulació de dihidroceramides, fet que induiria estrès reticular. Conseqüentment s'activa la resposta UPR (*unfolded protein response*) que, com s'ha explicat a l'apartat d'Introducció, està coordinada per tres eixos de senyalització regulats per les proteïnes ATF6, IRE1 i PERK (Avril et al., 2017). Malgrat que la resposta UPR té una clara funció protectora, si l'estrès reticular és intens i persistent s'activen programes de mort cel·lular (Gozuacik et al., 2008). Les cèl·lules tumorals són molt dependents de la modulació de la resposta UPR i de l'autofàgia per mantenir la seva elevada ràtio metabòlica, fet que ha portat diversos autors a proposar que la desregulació d'ambdós processos podria ser una estratègia terapèutica eficient per al tractament del càncer (Schonthal, 2012; Yadav et al., 2014). El factor de transcripció CHOP (regulador de l'expressió de TRIB3) és un dels principals efectors de la via pro-mort de la resposta UPR. Les cèl·lules tumorals presenten alteracions que potencien la senyalització pro-supervivència de la resposta UPR, entre les quals hi ha la sobreexpressió de la xaperona BiP. Un augment de la població de BiP permet que n'hi hagi de disponible per inhibir les proteïnes sensor ATF6, IRE1 i PERK, fet que resulta, entre d'altres, en la disminució dels nivells de CHOP (Schonthal, 2012). En aquest sentit, la sobreexpressió de CHOP en mostres de tumors de pacients amb càncer de mama sotmeses a quimioteràpia correlaciona amb una major resposta al tractament i un temps superior lliure de malaltia. Per contra, la sobreexpressió de BiP correlaciona amb els casos de resistència i recidiva (Zheng et al., 2014).

La robusta sobreexpressió de TRIB3 induïda per l'ABTL0812 podria explicar la promoció de la vessant pro-mort de la resposta UPR. En consonància amb aquesta hipòtesi, l'ABTL0812 induïx una robusta sobreexpressió del factor de transcripció CHOP (associat a vies pro-mort de la resposta UPR) superior a la visualitzada per la xaperona BiP (associada majoritàriament a mecanismes de resistència) (Schonthal, 2012; Zheng et al., 2014) (**Figura 36**). Aquest fet suggereix que l'estrès reticular induït és intens i que s'ha activat la via pro-mort de la resposta UPR.

La promoció per part de l'ABTL0812 de les vies pro-mort de la resposta UPR s'erigeix com una propietat molt rellevant a l'hora d'estudiar possibles combinacions del compost amb teràpies estàndard. La resposta UPR als tumors constitueix un mecanisme de resistència important a les estratègies terapèutiques aplicades. El tractament combinat amb ABTL0812 podria resultar en la supressió de les vies pro-supervivència de la resposta UPR i en la subseqüent sensibilització del tumor als fàrmacs. Aquesta estratègia ha sigut reportada per diversos autors que han testat en models cel·lulars i animals la combinació d'inductors d'estrès reticular com la taspigargina, tunicamicina o inhibidors proteasomals, amb el quimioterapèutic cisplatí o l'inhibidor del receptor EGFR erlotinib, entre d'altres (Schonthal, 2012; Johnson et al., 2015).

Malgrat tot, la inhibició del complex mTORC1 per si sola no explica la robusta activació d'autofàgia induïda per l'ABTL0812. Com s'ha comentat prèviament, la inhibició de mTORC1 per inhibidors específics no és

suficient per induir autofàgia robusta en algunes línies cel·lulars, com les utilitzades en aquesta Tesi (Kim and Guan, 2015). Considerant tot això, les dihidroceramides de cadena llarga acumulades, a més d'activar estrès reticular, podrien estar implicades directament en la promoció d'autofàgia. Aquest fet afegiria un factor més de sinèrgia amb la inhibició del complex mTORC1 i la inducció d'estrès reticular.

L'autofàgia és una de les primeres respostes biològiques que van ser assignades a les dihidroceramides, encara que els mecanismes moleculars que relacionen les dihidroceramides i l'autofàgia no es coneixen (Siddique et al., 2015). Siddique i col·laboradors han reportat que la deleció de DES1 a cèl·lules MEF resulta en l'alteració de la cadena de transport electrònic i ho atribueixen a l'habilitat d'un o diversos dihidroesfingolípid d'intercedir en l'activitat de components de la cadena. Conseqüentment es produeix una disminució dels nivells d'ATP cel·lular i activació robusta d'autofàgia dependent d'AMPK (Siddique et al., 2013). El tractament amb miriocina (inhibidor de SPT, primer enzim de la via de síntesi *de novo* de ceramides) reverteix l'acumulació de dihidroesfingolípid i restaura els nivells d'ATP de les cèl·lules MEF deficientes en DES1. D'interès, la robusta autofàgia induïda en aquestes cèl·lules MEF DES1 KO es produeix malgrat donar-se com a resposta cel·lular una forta sobreactivació de l'eix Akt/mTORC1 (Siddique et al., 2013). En aquest treball hem reportat que el tractament amb ABTL0812 resulta en l'activació de la quinasa AMPK a les cèl·lules tumorals (**Figura 36**), fet que podria estar relacionat amb l'alteració de la xarxa mitocondrial observada en resposta al tractament amb ABTL0812 (**Figura 59**).

En el futur, serà interessant determinar si la combinació del derivat deuterat de dihidroceramida d2c8DhCer amb inhibidors específics de mTORC1 mostra efecte sinèrgic en activar autofàgia i induir citotoxicitat. Així mateix, serà rellevant estudiar si la inhibició de l'enzim SPT amb miriocina, a més de revertir parcialment la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 (**Figura 71**), també disminueix l'autofàgia induïda.

### **Mort cel·lular induïda per l'ABTL0812**

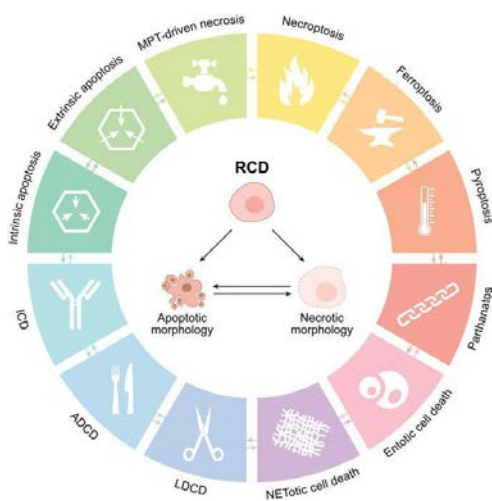
L'estudi dels mecanismes moleculars que regeixen la mort cel·lular programada ha permès caracteritzar diversos programes de regulació codificats genèticament que permeten l'eliminació selectiva de cèl·lules supèrflues, lesionades i/o potencialment lesives (Galluzzi et al., 2017). La mort cel·lular es manifesta amb alteracions morfològiques macroscòpiques i aquestes han estat utilitzades històricament per establir 3 formes diferents de mort cel·lular: (1) mort cel·lular de tipus I o apoptosi, caracteritzada per presentar condensació de la cromatina, contracció citoplasmàtica, fragmentació nuclear i *blebbing* de la membrana plasmàtica, i finalitza amb la formació de petites vesícules aparentment intactes (cossos apoptòtics); (2) mort cel·lular de tipus II o autofàgia, caracteritzada per mostrar una vacuolització citoplasmàtica extensiva que culmina amb absorció fagocítica i la conseqüent degradació lisosomal; i (3) mort cel·lular de tipus III o



## DISCUSSIÓ

necrosi, que no presenta característiques de les morts de tipus I i II i finalitza amb l'alliberació de detritus cel·lulars sense implicació fagocítica ni lisosomal (Galluzzi et al., 2017).

La recerca duta a terme els últims anys ha permès la caracterització de noves vies de senyalització que regulen la mort cel·lular, cosa que ha permès una reclassificació més precisa de les modalitats de mort cel·lular programada en base a criteris genètics, bioquímics i funcionals, en lloc de considerar únicament les alteracions morfològiques (**Figura 72**). Aquestes modalitats de mort cel·lular programada són iniciades per mecanismes moleculars que exhibeixen un elevat grau d'interconnexió i que es poden manifestar amb un ampli espectre de característiques morfològiques (des de plenament necròtiques a plenament apoptòtiques) i amb un perfil anti-inflamatori i tolerogènic o bé pro-inflamatori i immunogènic (Galluzzi et al., 2017).



**Figura 72: Subtipus de mort cel·lular programada.** Gràfic representatiu de les diferents modalitats de mort cel·lular programada. ACDC: *autophagy-dependent cell death*; ICD: *immunogenic cell death*; LDCD: *lysosome-dependent cell-death*; MPT: *mitochondrial permeability transition*. Figura extreta de Galluzzi i col·laboradors. *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death & Differentiation 2017.*

Les primeres observacions que recolzaven la hipòtesi d'un programa de mort cel·lular dependent d'autofàgia van ser obtingudes en cèl·lules MEF  $Bax^{-/-} Bak^{-/-}$ , incompetents per a l'apoptosi. Aquestes cèl·lules MEF seguien morint al ser sotmeses a tractaments típicament inductors de mort per apoptosi com l'estaurosporina o l'etopósida, i aquesta mort era dependent de les proteïnes reguladores de l'autofàgia Atg5 i Beclina 1. La deleció d'ATG5 i BECN1 conferia resistència a aquestes cèl·lules (Kroemer, 2009). En la mateixa línia, s'ha descrit que el bloqueig farmacològic de l'apoptosi en cèl·lules apoptosi-competents no revertia la mort cel·lular induïda per tractaments inductors de mort apoptòtica, indicant que una via alternativa en regulava la mort (Eberhart et al., 2014).

L'ABTL0812 induïx mort cel·lular sense aparició de fenotip apoptòtic a les línies tumorals testades (MiaPaca2 i A549), i compleix els criteris establerts que defineixen la mort cel·lular dependent d'autofàgia.

Per un costat l'ABTL0812 indueix autofàgia dinàmica a les cèl·lules tumorals, i per l'altre, el bloqueig farmacològic (inhibidors de proteases lisosomals) i genètic (cèl·lules MEF ATG5<sup>-/-</sup>) de l'autofàgia reverteixen la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 (**Figura 18**) (Erazo et al., 2016).

Les cèl·lules tumorals tractades amb ABTL0812 moren de forma abrupta i en un marge de temps curt passen de mostrar un fenotip aparentment normal a presentar una morfologia molt deteriorada, observant-se un alt percentatge de cèl·lules mortes i una abundant presència de detritus cel·lulars. Aquest fet suggereix que el tractament amb l'ABTL0812 promou diversos esdeveniments cel·lulars que assoleixen un punt crític que resulta en la mort sobtada de la cèl·lula tumoral. Els resultats exposats mostren que les cèl·lules tumorals tractades amb ABTL0812 presenten disruptcions de la membrana plasmàtica, suggerint la seva mort per necrosi (**Figura 65**).

En aquest treball s'ha contemplat la possibilitat que l'ABTL0812 podria induir mort cel·lular a través de mitofàgia letal o permeabilització de la membrana lisosomal (LMP), dos processos que poden induir mort per necrosi i que s'han relacionat amb l'alteració d'esfingolípid, activació d'estrès reticular i mort cel·lular dependent d'autofàgia, esdeveniments propis del tractament amb ABTL0812 (Boya and Kroemer, 2008; Mizumura et al., 2014; Siddique et al., 2015).

### **ABTL0812 i mitofàgia**

Els resultats presentats en aquest treball mostren de forma preliminar que el tractament amb ABTL0812 resulta en l'activació de la via canònica de mitofàgia regulada per PINK1 i parkina. La co-localització de marcadors mitocondrials amb autofagosomes i lisosomes, així com les evidències bioquímiques obtingudes, recolzen que l'ABTL0812 indueix el reclutament de parkina a la fracció mitocondrial de les cèl·lules tumorals, la ubiquitinació de proteïnes mitocondrials i l'associació de LC3-II amb mitocondris (**Figures 61 i 62**). Tanmateix, l'estudi del *pool* mitocondrial indica que l'ABTL0812 no el redueix de forma accentuada tot i que sí que altera de forma dramàtica els nivells d'ATP cel·lular, que disminueixen per sota del 40% respecte dels nivells basals (**Figura 63**). Aquests resultats suggereixen que l'ABTL0812 inhibeix la funció mitocondrial. En aquest sentit serà interessant determinar si el tractament amb ABTL0812 indueix despolarització mitocondrial.

La inhibició de Des-1 per part de l'ABTL0812 podria estar relacionada amb l'afectació de la funció mitocondrial. Com s'ha comentat anteriorment, diverses espècies d'esfingolípid poden intercedir en l'activitat de components de la cadena de transport electrònic mitocondrial (Siddique et al., 2013). Tenint en compte això, l'acumulació de dihidroesfingolípid deguda a la inhibició de Des-1 podria resultar en la inhibició de la síntesi d'ATP. Conseqüentment s'activaria la quinasa AMPK, la fosforilació de la qual

augmenta en resposta al tractament amb ABTL0812 (a les 6 hores, temps de tractament en el que Des-1 està inhibida i en què s'ha visualitzat l'activació de la via PINK1/parkina de mitofàgia) (**Figura 36**).

Sentelle i col·laboradors han descrit que l'acumulació de ceramides de 18 carbonis a la membrana mitocondrial induïx mitofàgia per interacció de la ceramida amb LC3-II (Sentelle et al., 2012). Els autors reporten que la lipidació de la proteïna LC3 és essencial per permetre la interacció amb la ceramida i que la mitofàgia promoguda induïx mort en cèl·lules tumorals i inhibeix el creixement tumoral de tumors xenograft en models murins (Sentelle et al., 2012). L'ABTL0812 induïx un increment robust de la ràtio dihidroceramides:ceramides, fet que podria resultar en l'acumulació de dihidroceramides a la membrana mitocondrial. Per corroborar aquesta hipòtesi s'haurà d'analitzar la composició de membrana de la fracció mitocondrial de cèl·lules tumorals tractades amb ABTL0812. Així mateix, s'haurà d'estudiar si les dihidroceramides també poden interaccionar amb la forma lipídada de LC3 i actuar com a receptor per promoure la interacció dels mitocondris amb autofagosomes i induir mitofàgia, tal com s'ha descrit per a la ceramida.

En tot cas, la mitofàgia és un subtipus d'autofàgia selectiva i podria co-existir amb d'altres tipus d'autofàgia selectiva o no-selectiva que s'indueixen com a resultat del tractament amb ABTL0812. En aquesta línia, la mitofàgia representaria un dels mecanismes que medien en la mort induïda per l'ABTL0812 però no l'esdeveniment executor de la mort cel·lular. Per determinar la rellevància de l'alteració de la funció mitocondrial en la mediació de la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812 serà d'ajuda realitzar experiments d'addició d'ATP i avaluar si la recuperació dels seus nivells cel·lulars resulta en la reversió de la citotoxicitat. Així mateix, aquests experiments permetrien aproximar en quin percentatge contribueix la mitofàgia en l'autofàgia total induïda per l'ABTL0812.

### **ABTL0812 i permeabilització de membrana lisosomal (LMP)**

Els lisosomes són el principal orgànul de degradació de la cèl·lula i desenvolupen una funció catabòlica essencial per al manteniment de l'homeòstasi cel·lular. La degradació als lisosomes està dirigida per les aproximadament 60 hidrolases (proteases, peptidases, fosfatases, nucleases, glicosidases, sulfatases, i lipases) que contenen, i que actuen de forma col·lectiva per degradar qualsevol tipus de macromolècula. Les hidrolases lisosomals més ben caracteritzades són les catepsines, proteases que s'organitzen en tres grups en funció de l'aminoàcid que hi ha al centre actiu: serina-catepsines (A i G), cisteïna-catepsines (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, i X) i aspàrtic-catepsines (D i E). Les catepsines més abundants a la cèl·lula són la D, B, L, C, i H (Boya and Kroemer, 2008).

L'alt contingut d'enzims hidrolítics als lisosomes els fa potencialment lesius per a la cèl·lula. Per assegurar el confinament de les hidrolases als lisosomes, la cara luminal de la membrana lisosomal presenta alts

nivells de glicosilació de proteïnes de membrana (essencialment Lamp-1 i Lamp-2) que conformen una xarxa de cadenes de carbohidrats protectora envers l'acció de les hidrolases. L'estabilitat i integritat de la membrana del lisosoma és essencial per garantir que totes les hidrolases hi romanen confinades, ja que el seu alliberament seria fatal per a la cèl·lula (Boya and Kroemer, 2008). Alteracions a la membrana lisosomal poden possibilitar la sortida del seu contingut al citosol, on les catepsines són mediadores de mort cel·lular. El procés d'alliberament de catepsines lisosomals al citosol és conegut amb el nom de permeabilització de la membrana lisosomal (LMP, *lysosomal membrane permeabilization*). Com s'ha comentat amb anterioritat, un important mecanisme regulador de l'activitat de les catepsines és el pH ambiental. Les catepsines són molt actives a pH àcid però s'inactiven a pH neutre degut a desnaturalització irreversible (cisteïna-catepsines) o desprotonació reversible dels residus aspàrtic del centre actiu (catepsina D), de manera que tot i sortir dels lisosomes la seva activitat hauria de ser residual al pH neutre del citosol (Turk et al., 1995; Lee et al., 1998). Tanmateix, les catepsines poden ser estabilitzades per la unió a substrats i algunes d'elles mantenen la seva activitat proteolítica a pH neutre, permetent la seva acció al citosol durant algunes hores. Una altra alternativa que explicaria el manteniment de l'activitat de les catepsines un cop fora del lisosoma és l'acidificació del citosol, que s'ha descrit en diversos models experimentals (Matsuyama et al., 2000; Nilsson et al., 2006). Les cisteïna-catepsines B i L, i l'aspàrtic-catepsina D, són les que s'han implicat en la promoció de mort cel·lular, ja que són les que romanen més actives a pH neutre.

Els mecanismes subjacents a la LMP apunten a un alliberament inespecífic del contingut lisosomal a través de la formació selectiva de porus o per la generació aleatòria de forats a la membrana com a conseqüència d'agressions externes. En funció de si l'alteració de la membrana lisosomal és lleu, o bé si la seva ruptura és massiva, s'indueix mort per apoptosi o necrosi, respectivament (Boya and Kroemer, 2008; Turk and Turk, 2009).

En aquesta Tesi s'han obtingut evidències que l'ABTL0812 indueix l'acumulació i/o acidificació lisosomal dependent de bombes de protons ATPases de tipus V (**Figura 66**). Així mateix, mitjançant assajos de fraccionament subcel·lular, s'ha observat de forma preliminar que l'ABTL0812 indueix alliberació de catepsina B al citosol, fet que suggereix la inducció de LMP (**Figura 68**). La LMP podria ser conseqüència d'un excés d'acidificació lisosomal o de canvis en la composició de membrana dels autolisosomes derivats de l'augment de la ràtio dihidroceramides:ceramides, de forma anàloga al descrit per al compost antitumoral THC (Hernández-Tiedra et al., 2016). El THC interacciona amb els receptors de membrana plasmàtica CB1 i CB2, fet que resulta en l'estimulació de la síntesi *de novo* de ceramida i en la inhibició del transport de ceramides del RE al complex de Golgi, induint un canvi de composició de la membrana del RE. Per un costat, aquest esdeveniment resulta en la inducció d'estrès reticular que comporta la inhibició TRIB3-dependent de l'eix Akt-mTORC1 i la subseqüent inducció d'autofàgia (Salazar et al., 2013). Per l'altre costat, es produeix un augment de la ràtio dihidroceramides:ceramides al RE que es transmet a les

membranes dels autofagosomes i autolisosomes, incrementant-ne la rigidesa i augmentant-ne la permeabilitat, fet que facilita la LMP, l'alliberació de catepsines al citosol i la subseqüent activació de mort cel·lular per apoptosi (Hernández-Tiedra et al., 2016). L'obtenció de preparacions enriquides en lisosomes i autolisosomes de cèl·lules tumorals tractades amb ABTL0812 permetria l'estudi de la seva integritat i la composició de la seva membrana. En aquest sentit, serà d'interès determinar si l'ABTL0812 indueix l'aparició de subdominis de membrana inestables amb alta presència de dihidroceramides.

En comparació amb el THC, l'ABTL0812 comparteix la inducció d'estrès reticular, l'increment de la ràtio dihidroceramides:ceramides, la inhibició de l'eix Akt-mTORC1 mediada per TRIB3, la inducció de LMP i la mort cel·lular dependent d'autofàgia. En canvi, l'ABTL0812 no indueix fenotip apoptòtic, com a mínim a les cèl·lules utilitzades en aquest treball (MiaPaca2 i A549). Aquesta diferència podria ser deguda a que la LMP induïda per l'ABTL0812 sigui més intensa i promogui l'acidificació del citosol i l'alliberament massiu de catepsines lisosomals al citosol, fet que explicaria la necrosi observada. L'alteració de la funció mitocondrial que resulta del tractament amb ABTL0812 podria estar implicada en la inducció de LMP via generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (Terman et al., 2006). L'alteració de les propietats físico-químiques de la membrana dels autolisosomes i la producció de ROS col·laborarien a induir una LMP massiva que explicaria la mort cel·lular per necrosi. L'acidificació del citosol derivada d'una LMP intensa també es podria avaluar en cèl·lules tractades amb ABTL0812.

Els resultats obtinguts en aquesta Tesi Doctoral han permès caracteritzar part del mecanisme d'acció antitumoral de l'ABTL0812, compost que en l'actualitat es troba en desenvolupament clínic. La recerca duta a terme recolza el potencial de la manipulació de l'estrès reticular i l'autofàgia (dos processos dels quals són altament dependents les cèl·lules tumorals) per al tractament del càncer. Així mateix, el treball realitzat contribueix a destacar el caràcter bioactiu dels esfingolípid i el potencial que té la modificació del seu metabolisme com a estratègia terapèutica per al càncer. Malgrat que encara són moltes les incògnites que cal resoldre per comprendre plenament el mecanisme d'acció de l'ABTL0812, tota la informació obtinguda serà de gran rellevància per a la identificació de noves dianes i per al disseny d'estratègies efectives per induir la mort de la cèl·lula tumoral, sobretot si l'ABTL0812 demostra eficàcia en pacients oncològics.

# **CONCLUSIONS**



1. L'ABTL0812, actuant com a agonista dels receptors PPAR $\alpha/\gamma$ , indueix l'activació transcripcional de la pseudoquinasa TRIB3. Una vegada sobreexpressada, TRIB3 uneix Akt i impedeix la seva activació per part de les quinases activadores PDK1 i mTORC2, cosa que resulta en la inhibició final del complex mTORC1.
2. A les cèl·lules tumorals humanes utilitzades, MiaPaca2 i A549, la inhibició de la via PI3K-Akt-mTORC1 no indueix autofàgia robusta, com sí que fa l'ABTL0812.
3. L'ABTL0812 indueix estrès de reticle endoplasmàtic, tant en línies cel·lulars tumorals com en tumors xenografts de ratolins tractats. Mitjançant eines farmacològiques (inhibidors) s'ha validat que l'estrès reticular media en la citotoxicitat induïda per l'ABTL0812. En un futur es validarà genèticament (siRNAs) la rellevància de l'estrès reticular en aquesta citotoxicitat.
4. El tractament amb ABTL0812 resulta en la inhibició de la desaturasa-1 (Des-1), enzim que catalitza el pas de les dihidroceramides a ceramides. La inhibició de Des-1 per l'ABTL0812 resulta en l'acumulació de dihidroceramides de cadena llarga, de manera anàloga a l'observat per l'inhibidor específic de Des-1 GT11. Aquest augment en el nivells cel·lulars de dihidroceramides resulta en inducció d'estrès reticular, autofàgia i mort cel·lular.
5. Les cèl·lules tumorals són més sensibles a la inhibició de Des-1 que les cèl·lules no tumorals, fet que podria explicar l'acció selectiva de l'ABTL0812 envers les cèl·lules tumorals i l'escassa toxicitat mostrada per l'ABTL0812 als assajos clínics en humans.
6. La inhibició de Des-1 (GT11) i del complex mTORC1 (Everolimus) sinergitzen en la inducció d'autofàgia i citotoxicitat a les cèl·lules tumorals. Aquest resultat presenta una nova estratègia terapèutica per augmentar l'eficàcia antitumoral dels inhibidors de mTORC1 que es troben actualment en la clínica.
7. S'ha posat a punt la quantificació dels nivells de mRNA plasmàtics del marcador d'estrès reticular CHOP i de TRIB3, tant en mostres de sang total com en PBMCs purificades. Això ha permès establir per primera vegada que TRIB3 i CHOP són bons biomarcadors farmacodinàmics i, en l'actualitat, s'estan utilitzant a la Fase Clínica 2 en pacients amb càncer de pulmó escamós tipus NSCLC i d'endometri avançat.
8. L'ABTL0812 altera la funció mitocondrial (depleció del nivells d'ATP cel·lular) de les cèl·lules tumorals. Mitjançant assajos d'immunofluorescència, fraccionament subcel·lular i bioquímics, s'ha demostrat que l'ABTL0812 activa mitofàgia per la via canònica de PINK1/parkina/ubiquitina. La contribució d'aquesta mitofàgia a la mort induïda per l'ABTL0812 i la seva relació amb l'augment de les dihidroceramides seran analitzades en un futur proper.
9. S'ha mostrat preliminarment que el tractament amb ABTL0812 resulta en l'alliberació citosòlica de la proteasa lisosomal catepsina B. Aquest fet suggereix que l'ABTL0812 indueix permeabilització de membrana lisosomal (LMP), que explicaria la mort per necrosi observada.





# **MATERIAL I MÈTODES**



### 1- Cultius cel·lulars

Les línies cel·lulars utilitzades s'obtingueren de l'ATCC (*American Type Culture Collection*), ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*) i col·laboradors. Per assegurar la disponibilitat de les diferents línies cel·lulars durant tot el projecte es generaren alíquotes a partir del vial inicial, que es conservaren en tancs amb nitrogen líquid (-180°C). Per realitzar el procés de congelació les cèl·lules es tripsinitzaren (Gibco; 0,05% tripsina/0,53 mM EDTA), es resuspengueren en medi de congelació consistent en sèrum fetal boví (FBS; Gibco) amb 10% de DMSO (Sigma-Aldrich) i es transferiren a criotubs que s'inclogueren a un contenidor Cryo Freezing (Nalgene) ple de 2-propanol (Scharlau). El contenidor amb els vials submergits en 2-propanol es conservà 48h a -80°C. Aquest sistema permet congelar les cèl·lules amb un descens de temperatura constant d'entre 1-3 °C/min. Passades 48h, els criotubs foren transferits al tanc de nitrogen líquid. Per a la descongelació de les cèl·lules, el volum inclòs en un vial es diluí en 4 ml de medi de cultiu 10% FBS temperat a 37°C i es centrifugà 5 minuts a 200 g. El pellet es resuspengué en 5 ml de medi de cultiu 10% FBS fresc i s'addicionaren a un flask de 25 cm<sup>2</sup>. Quan les cèl·lules assoliren un 80% de confluència, es desadheriren per tripsinització i es passaren a un nou flask de 75 cm<sup>2</sup> dissoltes en 10 ml de medi de cultiu 10% FBS. Totes les línies cel·lulars foren mantingudes en flasks de 75 cm<sup>2</sup> a una confluència màxima del 80% en incubadors a 37°C 5% CO<sub>2</sub>.

#### 1.1- Línies cel·lulars utilitzades

Amb l'objectiu de testar l'ABTL0812 en un ampli espectre de models tumorals, les línies cel·lulars seleccionades cobreixen un ampli ventall de carcinomes de diferents orígens i amb un perfil de mutacions divers.

**Cèl·lules MiaPaca2:** procedents d'adenocarcinoma ductal pancreàtic humà. Presenten mutacions en KRAS i TP53, entre d'altres. Medi de cultiu: DMEM (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules A549:** procedents d'adenocarcinoma pulmonar humà de tipus NSCLC (*Non-Small Cell Lung Cancer*). Presenta mutacions en KRAS, entre d'altres. Medi de cultiu: DMEM (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules Ishikawa:** procedents d'adenocarcinoma endometrial humà. Línia cel·lular PTEN *null* que presenta mutacions a p53, entre d'altres. Medi de cultiu: EMEM (Sigma-Aldrich), 5% sèrum fetal boví (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules HEC-1-A:** procedents d'adenocarcinoma endometrial humà. Presenten mutacions a PI3KCA, KRAS i TP53, entre d'altres. Medi de cultiu: McCoy 5A (Sigma-Aldrich), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

## MATERIAL I MÈTODES

---

**Cèl·lules LNCaP:** procedents de cèl·lules metastàtiques de ganglis limfàtics d'un carcinoma de pròstata androgen-dependent. Presenten mutacions en PTEN i TP53, entre d'altres. Medi de cultiu: RPMI (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 10 mM Hepes (Gibco), 1 mM piruvat sòdic (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules C4-2:** línia cel·lular derivada de les cèl·lules LnCaP que han estat cultivades en absència d'andrògens i han esdevingut hormona-independents. Presenten mutacions a PTEN, entre d'altres. Medi de cultiu: RPMI (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 10 mM Hepes (Gibco), 1 mM piruvat sòdic (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules PC-3:** línia derivada de cèl·lules metastàtiques lumbar procedents d'un adenocarcinoma de pròstata androgen-independent. Presenten mutacions en PTEN i TP53, entre d'altres. Medi de cultiu: DMEM-F12 (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules SK-BR-3:** línia derivada de cèl·lules metastàtiques pleurals d'un adenocarcinoma de mama humà. Sobre-expressen el receptor d'estrògens HER2 i expressen el receptor de progesterona. Presenten mutacions en TP53, entre d'altres. Medi de cultiu: McCoy 5A (Sigma-Aldrich), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules MDA-MB-231:** línia derivada de cèl·lules metastàtiques pleurals d'un adenocarcinoma de mama humà. No expressen receptor d'estrògens, ni progesterona, ni HER2 (TNBC, *Triple-Negative Breast Cancer*). Presenten mutacions en KRAS, BRAF i TP53, entre d'altres. Medi de cultiu: DMEM (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules MDA-MB-468:** línia derivada de cèl·lules metastàtiques pleurals d'un adenocarcinoma de mama humà. No expressen receptor d'estrògens, ni progesterona, ni HER2 (TNBC, *Triple-Negative Breast Cancer*). Presenten mutacions en PTEN i TP53, entre d'altres. Medi de cultiu: DMEM (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules LN-18:** cèl·lules procedents d'un glioma de grau IV humà. Presenten mutacions en TP53, entre d'altres. Medi de cultiu: DMEM (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules MEF:** fibroblasts embrionaris de ratolí immortalitzats. En aquest projecte s'empraren línies de cèl·lules MEF immortalitzades amb T-SV40 procedents de ratolins transgènics salvatges i de ratolins deficients en ATG5 (ATG5<sup>-/-</sup>). Les línies cel·lulars foren cedides pel Dr. Guillermo Velasco (Universitat Complutense, Madrid, Espanya) (Salazar et al., 2009b). Medi de cultiu: DMEM (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

**Cèl·lules HEK-293T:** procedents de cèl·lules de ronyó embrionari humà. Deriven de les cèl·lules HEK-293 i en difereixen pel fet d'expressar l'antigen T-SV40 que afavoreix la ràpida replicació episomal de plàsmids que contenen l'origen de replicació SV40. Medi de cultiu: DMEM (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich).

### 1.2- Cultiu d'astròcits primaris de rata

Els cultius es prepararen a partir de rates SD d'un dia de vida. Les rates foren decapitades i els còrtex extrets immediatament. A continuació s'extraïeren les meninges i els vasos, el teixit s'esbocinà i fou incubat 10 min a 37°C en Buffer Krebs-Ringer sense Ca<sup>2+</sup> amb 0,0025% de tripsina. Tot seguit, el teixit es triturà mecànicament fent passar la suspensió a través d'una pipeta de vidre. Es varen addicionar inhibidor de tripsina (SBTI, 0,52 mg/ml) i DNasa (170 IU/ml), i es va filtrar la mescla a través d'una malla de niló de 40 µm. Les cèl·lules foren pelletejades per centrifugació, comptades en cambra de Neubauer emprant blau de tripà i sembrades a una concentració de 150.000 cèl·lules per pou en placa de 24 pous. Les cèl·lules restants foren sembrades en flasks T-150. Medi de cultiu: DMEM (Gibco), 10% sèrum fetal boví (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). Mantingudes a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. El medi de cultiu fou renovat cada 3-4 dies. El cultiu d'astròcits primaris de rata fou realitzat pel Servei de Cultius de l'Institut de Neurociències de la UAB.

### 1.3- Generació de línia estable MiaPaca2 mKeima-Red

Amb l'objectiu d'estudiar el procés de mitofàgia *in vivo* es va adquirir el plasmidi mKeima-Red-Mito-7 (Addgene). Aquest plasmidi expressa la proteïna Keima amb una seqüència de localització mitocondrial situada a l'extrem N-terminal. La proteïna Keima presenta un espectre d'excitació depenent del pH, de manera que en ambients neutres predomina una longitud d'ona d'excitació de 440 nm, mentre que en ambients àcids predomina una longitud d'ona d'excitació de 586 nm (emissió a 620 nm en ambdós casos). D'aquesta manera, es poden monitoritzar processos de mitofàgia *in vivo*. En condicions on es produeixi una inducció de la mitofàgia, hi haurà un increment en la proporció de proteïna Keima que es troba en ambients àcids degut a la inclusió de mitocondris en compartiments àcids per ser degradats. Aquest fet es tradueix en un increment del senyal de fluorescència detectat quan excitem a 586 nm.

Per generar línies cel·lulars que expressen de forma estable la proteïna mKeima es sembraren cèl·lules MiaPaca2 a una confluència del 40% en placa de 6 pous. Passades 24 hores es transfectaren amb el vector mKeima-Red-Mito-7 emprant el mètode amb lipofectamina (apartat 7.2 de Material i Mètodes). 24 hores després s'inicià el procés de selecció de les cèl·lules transfectades addicionant al medi de cultiu l'antibiòtic G418 (Geneticina, Sigma-Aldrich) a una concentració final de 750 µg/ml. El medi amb antibiòtic es renovà cada 24 hores durant 10 dies. En aquells pous on sobrevisqueren cèl·lules es procedí a canviar el

## MATERIAL I MÈTODES

---

tractament a 100 µg/ml de G418 per afavorir la formació de colònies. El medi amb antibiòtic fou renovat cada 3-4 dies. Passats 15 dies es seleccionaren colònies individuals, s'expandiren i s'analitzaren per microscòpia confocal (Leica TCS SP5, Leica Microsystems) per avaluar la detecció de fluorescència. Els tres clons que presentaren una major intensitat de fluorescència foren congelats i guardats en nitrogen líquid.

### 1.4- Tractament de les cèl·lules

**ABTL0812:** forma sòdica de l'acid 2-hidroxiilinoic; sintetitzat per Medialchemy. L'stock de treball d'ABTL0812 es preparà cada setmana per assegurar unes condicions òptimes de tractament que fossin mantingudes en tota l'experimental. El fàrmac fou dissolt en etanol absolut (Scharlab) amb un agitador temperat a 35°C. Un cop dissolt, l'ABTL0812 es filtrà a través d'un filtre de 0,22 µm en cabina de seguretat biològica. Els tractaments van ser aplicats normalment en medi de cultiu 0,5% FBS. Degut a la naturalesa lipídica de l'ABTL0812, el compost és segregat per les proteïnes del sèrum. La reducció en el percentatge de sèrum permet treballar amb concentracions més baixes de tractament. En experiments d'avaluació d'activitat mitocondrial i d'activitat lisosomal, els tractaments s'aplicaren en medi de cultiu 5% FBS, donat que la privació afecta de forma accentuada ambdues funcions cel·lulars.

Generalment, el tractament es va aplicar 24 hores després d'haver sembrat les cèl·lules. En l'estudi de l'estrès reticular i determinació d'esfingolípid (esfingolipidoma), es va sotmetre les cèl·lules a un període d'adaptació a les condicions de tractament, tot canviant el medi complet a medi 0,5% FBS durant 16 h; això minimitza fonts externes d'estrès i permet avaluar únicament els efectes derivats del tractament amb ABTL0812.

**AZD2014:** Sigma-Aldrich. Compost dissolt en DMSO. Inhibidor competitiu de mTOR.

**AZD5363:** Sigma-Aldrich. Compost dissolt en DMSO. Inhibidor quinasa pan-Akt.

**Bafilomicina A1:** Sigma-Aldrich. Compost dissolt en etanol absolut. Antibiòtic produït pel bacteri *Streptomyces griseus*. És un inhibidor altament específic de les bombes de protons vacuolars (V-ATPases).

**Brefeldina A:** Sigma-Aldrich. Compost dissolt en etanol absolut. Compost antiviral produït pel bacteri *Eupenicillium brefeldianum*. La Brefeldina A inhibeix el transport proteic del reticle endoplasmàtic (RE) a l'aparell de Golgi. El tractament inhibeix de forma reversible la proteïna GBF1 (proteïna de tipus GEF reclutada a la membrana del Golgi) que és l'encarregada de regular l'activació de la proteïna GTPasa Arf1p, essencial per a la iniciació de la formació de vesícules de transport entre el RE i el Golgi. La manca d'activació de la proteïna Arf1p comporta el col·lapse del Golgi i RE, fet que indueix l'activació d'estrès reticular.

**Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP):** Sigma-Aldrich. Tractament dissolt en etanol absolut. El CCCP és un compost químic que actua essencialment com a ionòfor, desacoblant el gradient de protons necessari per al bon funcionament de la cadena de transport electrònic mitocondrial. És un inductor de mitofàgia.

**Everolimus:** també anomenat RAD001; Sigma-Aldrich. Compost dissolt en DMSO. Inhibidor específic del complex mTORC1.

**E64d i Pepstatina-A:** Sigma-Aldrich. Composts dissolts en etanol absolut. L'E64d és un inhibidor de les cisteïna-catepsines (catepsines B, C, H, K, L). La Pepstatina-A és un inhibidor de les aspartil-catepsines (catepsines D i E).

**GW6471 i GW9662:** Sigma-Aldrich. Composts dissolts en DMSO. Són antagonistes dels receptors PPAR $\alpha$  (GW6471) i PPAR $\gamma$  (GW9662).

**N-[(1R,2S)-2-hidroxi-1-hidroximetil-2-(2-tridecil-1-ciclopropenil)etil]octanamida (GT11):** Avanti Polar Lipids. Compost dissolt en etanol absolut. El GT11 és un anàleg de la ceramida que conté un ciclopropè en l'estructura. És un inhibidor específic de l'enzim desaturasa-1.

**N-octanoïl-D-eritro-[4,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]esfinganina (D2c8dhCer):** sintetitzada al CSiC. Compost dissolt en etanol absolut. És un anàleg dideuterat de la dihidroceramida. Aquesta molècula és *N*-transacilada i desaturada un cop ha entrat a dins de les cèl·lules. Tanmateix, la desaturació es du a terme a un ritme més baix que en el cas de la dihidroceramida natural, degut a la presència d'un isòtop primari, fet que promou l'acumulació de dihidroceramides dideuterades a la cèl·lula que presenten diferent longitud de cadena degut als processos de transacilació. En tractaments de llarga durada cal renovar la dosi cada 12 h.

**BKM120:** Sigma-Aldrich. Compost dissolt en DMSO. Inhibidor pan-PI3K de Classe I.

**PQR309:** Sigma-Aldrich. Compost dissolt en DMSO. Inhibidor pan-PI3K de Classe I.

**WY14643 i rosiglitazona:** Sigma-Aldrich. Composts dissolts en DMSO. Són agonistes del receptors PPAR $\alpha$  (WY14643) i PPAR $\gamma$  (rosiglitazona).

**Tauroursodeoxicolat sòdic (TUDC):** Sigma-Aldrich. Compost dissolt en H<sub>2</sub>O. És un àcid biliar secundari consistent en la conjugació de la taurina amb l'àcid ursodeoxicòlic. Actua atenuant la resposta UPR (*Unfolded Protein Response*).

Tots els tractaments foren aplicats en medi de cultiu 0,5% FBS per mantenir les mateixes condicions de tractament emprades per l'ABTL0812.



## MATERIAL I MÈTODES

---

### 1.5- Assaig de viabilitat cel·lular (MTT)

La viabilitat cel·lular fou mesurada per assaig colorimètric utilitzant el reactiu MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli, Sigma-Aldrich). L'MTT travessa la membrana plasmàtica i és reduït per les cèl·lules metabòlicament actives a cristalls de formazan violetes, havent-hi una proporcionalitat directa entre el grau de reducció de l'MTT i el nombre de cèl·lules vives. Un cop aplicat el tractament corresponent, el medi de cultiu fou aspirat i s'addicionà el reactiu MTT dissolt en medi de cultiu complet a una concentració de 0,5 mg/ml (stock a 3.5 mg/ml). Les cèl·lules s'incubaren entre 40-50 minuts a 37°C. Posteriorment s'aspirà la solució de MTT i s'afegí DMSO per trencar les membranes cel·lulars i alliberar els cristalls de formazan violetes, quedant dissolts en el mateix DMSO. Finalment es determinà l'absorbància utilitzant el lector de microplaques Synergy HT (Bio Tek laboratories, Inc.), fixant una longitud d'ona de mesura de 560 nm i una de referència de 620 nm.

### 1.6- Tinció amb LisoTracker

El lisotracker (Lysotracker Red DND-99, Invitrogen) és un fluoròfor associat a una base dèbil que només és parcialment protonat a pH neutre. Un cop difon passivament a l'interior de la cèl·lula, el LisoTracker tendeix a acumular-se a orgànuls acídics de forma selectiva degut que en ambient àcid és protonat i queda retingut. D'aquesta manera podem estudiar *in vivo* la presència d'orgànuls acídics. Un cop aplicat el tractament corresponent, s'incubaren les cèl·lules amb LisoTracker 50 nM dissolt en medi de cultiu complet durant 40 minuts a 37°C. Seguidament s'aplicà un rentat amb PBS, s'addicionà medi complet fresc, es visualitzaren al microscopi de fluorescència i posteriorment s'analitzaren per citometria de flux (consulteu l'apartat 5.2 del Material i Mètodes).

## 2- Extracció i Anàlisi de proteïna

### 2.1- Lisi cel·lular i quantificació de proteïna

Un cop aplicats els tractaments oportuns, els cultius cel·lulars es rentaren dues vegades amb PBS i s'addicionà tampó de lisi RIPA fred (25 mM Tris-HCl pH 7.9, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 5 mM pirofosfat sòdic, 0.5% (p/v) àcid desoxicòlic, 0.1% (p/v) SDS, 1% (p/v) NP-40). A partir d'aquest moment es treballà sobre gel per a mantenir una temperatura baixa (4°C) i evitar la degradació proteica. Les cèl·lules s'acabaren de desadherir amb l'ajuda d'un *scraper* i els lisats obtinguts es sonicaren (3 rondes de 10 segons) i centrifugaren a 12,000 g durant 12 minuts a 4°C. El sobrenedant obtingut es separà i conservà a -20°C. Per determinar la concentració proteica dels lisats s'emprà el mètode de Bradford, fent servir el colorant *Comassie Blue* (Pierce, ThermoFisher Scientific) i BSA com a estàndard, i realitzant la lectura de l'absorbància a l'espectrofotòmetre (LAN OPTICS) a una longitud d'ona de 595 nm.

### 2.2- Extracció proteica de teixit

Els tumors xenografts extrets dels ratolins van ser pesats, es va addicionar tampó RIPA a una relació 1:10 (pes:RIPA; g:ml) i es deixà incubar en gel durant 10 minuts. Seguidament les mostres es van homogeneïtzar mecànicament amb l'ajuda d'un *Pestle* elèctric (Sigma). És important eliminar els grumolls en la mesura que sigui possible. La suspensió resultant fou inclosa en gel i sonicada (cicles de 15 segons per evitar l'escalfament excessiu de la mostra). Es realitzaren els cicles de sonicació necessaris per obtenir un lisat el més transparent possible. Tot seguit els lisats foren sotmesos a dues rondes de centrifugació a 15,000 g 12 minuts a 4°C. D'aquesta manera el detritus cel·lular i tissular és pelletejat i eliminat de la mostra. Els sobrenedants es recuperaren a tubs eppendorfs nous, es quantificaren pel mètode de Bradford i es conservaren a -20°C fins a ser analitzats.

### 2.3- Fraccionament subcel·lular

Per a la separació de les fraccions citosòlica, nuclear, mitocondrial i microsomal les cèl·lules van ser cultivades en discs de 10 cm. Un cop aplicats els tractaments corresponents, les cèl·lules van ser rentades una vegada amb PBS, aixecades suaument amb l'ajuda d'un *scraper* i centrifugades 5 minuts a 200 g. El pellet va ser resuspès en tampó de fraccionament (250 mM sacarosa, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, pH 7.4 (HCl)) i es deixà incubar en gel durant 10 minuts. A partir d'aquí és important treballar sempre a 4°C per evitar la degradació proteica. Seguidament les cèl·lules van ser homogeneïtzades mecànicament aplicant 50 *strokes* en homogeneïtzador de vidre (DD Biolab). A continuació es centrifugà l'homogenat durant 5 minuts a 2,000 g. El sobrenedant (citoplasma) es separà en un nou tub, el pellet (nuclis) es resuspengué en tampó de fraccionament i s'aplicà una nova centrifugació de 5 minuts a 2,000 g tant al citoplasma com als nuclis. Aquesta centrifugació serveix per netejar la fracció nuclear i per acabar d'eliminar restes nuclears de la fracció citoplasmàtica. Tot seguit, el citoplasma es conservà en gel i es processaren els nuclis.

El pellet nuclear fou resuspès en 250 µl de tampó RIPA, es deixà incubar 10 minuts en gel i s'homogeneïtzà fent passar la suspensió 5 vegades a través d'una xeringa 25G. Finalment, els nuclis es sonicaren i centrifugaren 12 minuts a 12,000 g per eliminar les membranes nuclears. El sobrenedant resultant corresponent a la fracció nuclear fou conservat a -20°C.

Prosseguint amb els citoplasmes reservats en gel, es centrifugaren 12 min a 10,000 g per a separar la fracció mitocondrial. Es recuperà el sobrenedant (citosol i membranes), es resuspengué el pellet (mitocondris) amb tampó de fraccionament i s'aplicà una altra vegada una centrifugació de 12 minuts a 10,000 g. El pellet mitocondrial resultant fou lisat amb 100 µl de tampó RIPA, sonicat i conservat a -20°C. Per últim, la fracció citosòlica restant fou centrifugada a 100,000 g durant 1h 30 minuts (ultracentrifuga), per obtenir la fracció microsomal. El sobrenedant (fracció citosòlica pura) fou separat i conservat a -20°C, i el pellet microsomal lisat en 100 µl de tampó RIPA i finalment conservat a -20°C.

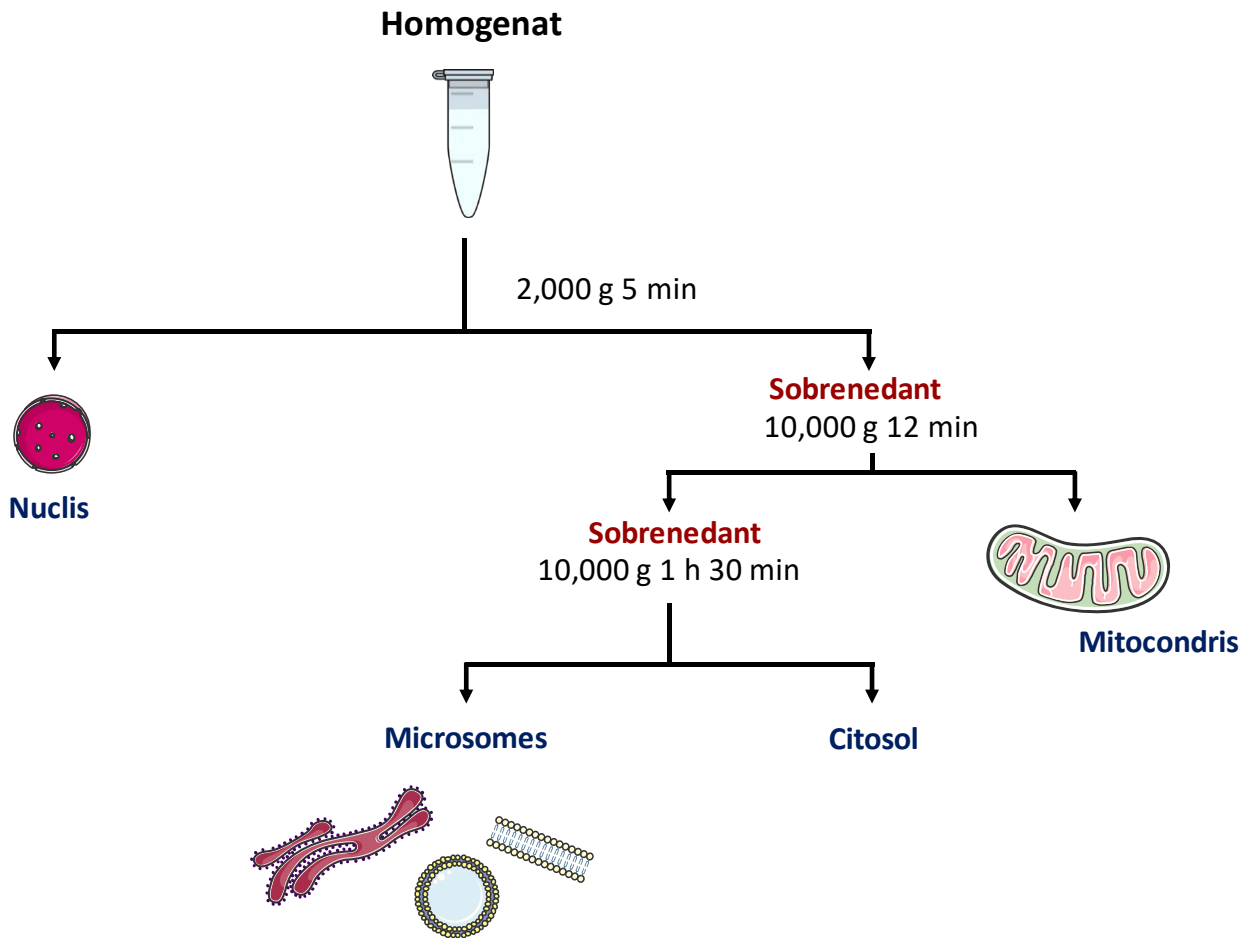


Figura 73: Fraccionament subcel·lular. Diagrama explicatiu del protocol de fraccionament subcel·lular.

## 2.4- Tècniques electroforètiques per a la detecció de proteïnes

Tampó	Composició
Tampó de mostra	25 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% p/v SDS; 10% glicerol, 10 mM DTT; 0.002% p/v blau de bromofenol
Tampó d'electroforesi	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 20% SDS
Tampó de transferència	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 20% metanol
TBS-Tween	20 mM Tris HCl pH 7.6; 150 mM NaCl; 0.2% Tween
Tampó de bloqueig	TBS-Tween, 5% llet desnatada (detecció proteïna total) TBS-Tween, 5% BSA (detecció residus fosforilats)

Taula 1: Reactius utilitzats per a la detecció de proteïnes.

**Electroforesi en gel de SDS-Poliacrilamida.** Per a l'anàlisi dels lisats cel·lulars i tissulars les proteïnes van ser resoltes per electroforesi desnaturalitzant en gel de SDS-poliacrilamida, emprant el sistema kit Mini-Protean III de Bio-Rad. Les mostres es prepararen a la concentració desitjada dissoltes en tampó de mostra (**Taula 1**) amb 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, s'escalfaren a 95°C durant 5 minuts i es van separar per electroforesi aplicant un voltatge constant de 150 V durant 80 minuts (composició del tampó d'electroforesi a la **Taula 1**). El percentatge d'acrilamida dels gels utilitzats varia en funció del pes molecular de la proteïna d'interès. A cada carril es van carregar entre 5-30  $\mu$ g de proteïna.

**Electrotransferència de proteïnes: immunoblot.** Acabada l'electroforesi, les proteïnes foren transferides a membrana de nitrocel·lulosa (porus 0.45  $\mu$ m; Merck Millipore) utilitzant el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell* de Bio-Rad, emprant tampó de transferència (**Taula 1**) i aplicant un voltatge constant de 100 V durant 90 min. La correcta transferència de les proteïnes fou validada per tinció de la membrana de nitrocel·lulosa amb el colorant Ponceau (Sigma-Aldrich). La membrana amb les proteïnes transferides fou bloquejada amb tampó de bloqueig (**Taula 1**) durant 1 h en agitació constant. Tot seguit s'incubà amb l'anticòs primari corresponent, diluït en tampó de bloqueig, durant 16 h a 4°C i en agitació.

A continuació, la membrana fou sotmesa a tres rentats de 5 minuts amb TBS-Tween (**Taula 1**) i va ser incubada durant 1 h a temperatura ambient amb anticòs secundari conjugat amb peroxidasa dissolt a 1:6000 en TBS-Tween 5% llet desnatada. Finalment, es realitzaren tres rentats de 10 minuts en tampó TBS-Tween i es van visualitzar les proteïnes per quimioluminescència, emprant el reactiu *Clarity* de Bio-Rad i fent detecció per revelat en pel·lícula fotogràfica (Medical X-Ray Film, Fujifilm).

La **Taula 2** mostra els anticossos primaris emprats en la realització d'aquest treball, així com les condicions d'ús utilitzades. Els anticossos secundaris (Pierce, Thermofisher scientific) utilitzats foren: goat anti-rabbit (31460), goat anti-mouse (31430) i rabbit anti-sheep (31480).

## MATERIAL I MÈTODES

Anticòs primari	Generat en	Subministrat per	Concentració
Actina	Ratolí	Santa Cruz, sc-47778	WB 1:10,000
Akt	Conill	Cell Signaling, 9272	WB 1:5,000
pAkt (S473)	Conill	Cell Signaling, 9271	WB 1:1,000
pAkt (T308)	Conill	Cell Signaling, 9275	WB 1:1,000
AMPK $\alpha$	Conill	Cell Signaling, 5832	WB 1:
pAMPK (T172)	Conill	Cell Signaling, 2535	WB 1:1000
ATF4	Conill	Cell Signaling, 11815	WB 1:1000
BiP/GRP78	Ratolí	BD Transduction Lab, 610978	WB 1:10,000
Catepsina B		Cell Signaling,	WB 1:1,000
CHOP	Ratolí	Cell Signaling, 2895	WB 1:1,000
CHOP/DDIT3	Conill	Sigma-Aldrich, HPA068416	IHQ 1:100
Desaturasa-1	Conill	Abcam, ab185237	WB 1:5,000
Hsp90	Ratolí	Abcam, ab82395	WB 1:10,000
Lamp2A	Ratolí	Abcam, ab25631	ICQ 1:200
LC3B	Conill	Abcam, ab48394	WB 1:8,000
Parkina	Conill	Abcam, ab15954	WB 1:1,000
PDI	Conill	Abcam, ab3672	ICQ 1:200
peif2 $\alpha$ (S51)	Conill	Cell Signaling, 9721	WB 1:1,000
Prohibitina	Conill	Abcam, ab75766	ICQ 1:200
PINK1	Conill	Novus, BC100-494SS	WB 1:1,000
PRAS40	Ovella	MRC-Protein Phosphorylation Unit. Dundee, UK	WB 1:2000
pPRAS40 (T246)	Conill	Cell Signaling, 2997	WB 1:1000
S6	Conill	Cell Signaling, 2217	WB 1:15,000
pS6 (S235/236)	Conill	Cell Signaling, 4858	WB 1:5,000
S6K	Conill	Cell Signaling, 9202	WB 1:5000
pS6K (T389)	Conill	Cell Signaling, 9205	WB 1:1000
TOM20	Conill	Santa Cruz, sc-11415	WB 1:20,000
TOM20	Ratolí	Abcam, ab56783	ICQ 1:200
TRIB3	Conill	Abcam, ab50516	WB 1:4,000 IHQ 1:100
TSC2	Ovella	MRC-Protein Phosphorylation Unit. Dundee, UK	WB 1:1000
pTSC2 (T1462)	Conill	Cell Signaling, 3611	WB 1:1000
Ubiquitina	Ratolí	Santa Cruz, sc-8017	WB 1:5000

**Taula 2:** Anticòs utilitzats en aquest treball. WB: western bot; IHQ: immunohistoquímica; ICQ: immunocitoquímica.

### 3- Immunocitoquímica

Les cèl·lules van ser sembrades en plaques de 24 pous en les quals prèviament s'havien inclòs cobreobjectes que s'incubaren amb poli-L-lisina (40 µg/ml; Sigma-Aldrich) durant 1 h a 37°C per afavorir l'adhesió cel·lular. Un cop aplicat el tractament corresponent les cèl·lules es van rentar amb PBS i fixar amb una solució de PBS 4% paraformaldehid durant 20 minuts a 4°C. A continuació, s'aplicaren tres rentats amb PBS i es prosseguí amb el protocol d'immunocitoquímica. Les cèl·lules es permeabilitzaren amb el tampó 1 (**Taula 3**) durant 7 minuts. Després d'haver aplicat un rentat amb PBS es va bloquejar incubant les cèl·lules 15 minuts amb el tampó 2 (**Taula 3**) i 1 h amb el tampó 3 (**Taula 3**). Seguidament, els cobreobjectes s'incubaren amb l'anticòs primari corresponent diluït en tampó 4 (**Taula 3**) durant 16 h. La incubació amb anticòs primari (anti-PDI, 1:200; **Taula 2 secció 2.4**) es realitzà en cambra humida a 4°C. Després de 5 rentats de 5 min amb PBS els cobreobjectes s'incubaren amb anticòs secundari conjugat a fluorescència diluït en tampó 4. La incubació es realitzà a temperatura ambient, en cambra humida i protegint els cobreobjectes de la llum per preservar el fluoròfor conjugat a l'anticòs secundari (Alexa fluor 594 chicken anti-mouse IgG, o Alexa fluor 488 chicken anti-rabbit IgG; Invitrogen). A partir d'aquest punt tots els passos es dugueren a terme protegint els cobreobjectes de la llum. S'aplicaren 5 rentats amb PBS i es tenyiren els nuclis incubant les cèl·lules durant 5 minuts amb Hoescht 5 ng/ml (dissolt en aigua miliQ; Invitrogen). Finalment, els cobreobjectes van ser rentats 4 vegades amb PBS i es van muntar a sobre de portaobjectes utilitzant medi de muntatge Fluorsave (Calbiochem). Les preparacions es visualitzaren per microscòpia de fluorescència en un microscopi Nikon Eclipse 90i (Nikon) o per microscòpia confocal en un microscopi Leica TCS SP5 (Leica Microsystems).

Tampó	Composició
1	0.02% saponina en PBS
2	0.01% saponina; 10 mM Glicina en PBS
3	0.01% saponina; 10 mM Glicina; 5% BSA en PBS
4	0.01% saponina; 1% BSA en PBS

**Taula 3:** Reactius utilitzats per a immunocitoquímica.

### 4- Microscòpia Electrònica

Les cèl·lules, un cop sotmeses a les condicions d'interès, van ser pelletejades i fixades amb una solució de tampó fosfat (100 mM, pH 7.4) al 2.5% (v/v) de glutaraldehid i 2% (v/v) de paraformaldehid. Els pellets fixats van ser rentats 4 vegades amb tampó fosfat i fixats secundàriament amb una solució 1% (p/v) de tetròxid d'osmi que conté un 0.8% (p/v) d'hexacianoferrat de potassi (III). Els pellets foren rentats 4 vegades amb aigua miliQ i deshidratats seqüencialment amb acetona. Tot el procés fou realitzat a 4°C. Els pellets van ser inclosos en resina Epon-12TM i es deixà polimeritzar durant 48 h a 60°C. Es feren seccions ultrafines (70 nm de gruix) que es contrastaren amb solucions d'acetat d'uranil i de citrat de plom. Les preparacions foren visualitzades en un microscopi de transmissió electrònica (Jeol JEM-1400) equipat amb una càmera Erlangshen CCD-GATAN-ES1000W del servei de microscòpia de la UAB. L'obtenció d'imatges fou realitzada amb el suport dels tècnics del servei.

### 5- Citometria de flux

#### 5.1- Assaig d'avaluació de mort cel·lular per incorporació de iodur de propidi

Es van sembrar  $5 \times 10^5$  cèl·lules en discos de 60 mm. Un cop aplicat el tractament, les cèl·lules foren rentades dues vegades amb PBS i tripsinitzades. Ja desadherides, les cèl·lules van ser resuspeses en 2 ml de PBS i centrifugades 5 minuts a 200 g a 15°C. El pellet obtingut va ser resuspès en 0.5 ml de PBS, s'addicionaren 5 µl de iodur de propidi, la mescla fou vortexada, i s'incubà durant 10 minuts a 4°C preservada de la llum. A partir d'aquest moment les mostres van ser manipulades preservant-les de la llum en tot moment. Acabat el temps estipulat d'incubació, la mostra s'analitzà al citòmetre de flux (Beckman Coulter FC 500; longitud d'ona d'excitació única a 488 nm), comptant 20,000 esdeveniments totals per condició i quantificant la intensitat de fluorescència a una longitud d'ona d'emissió de 525 nm.

#### 5.2- Quantificació de la intensitat de tinció amb LisoTracker

Les cèl·lules tenyides amb LisoTracker (secció 1.6 del Material i Mètodes) van ser tripsinitzades, resuspeses en 2 ml de PBS i centrifugades 5 minuts a 200 g a 15°C. El pellet obtingut fou resuspès en 0.5 ml de PBS i analitzat en citòmetre de flux Beckman Coulter FC 500 (longitud d'ona d'excitació única a 488 nm), comptant 20,000 esdeveniments en regió delimitada per al comptatge de cèl·lules íntegres. La intensitat de fluorescència fou quantificada a una longitud d'ona d'emissió a 620 nm.

## **6- Estudi de la funció mitocondrial**

Les cèl·lules foren sembrades en disc de 60 mm a raó de  $8 \times 10^5$  cèl·lules/disc. 24 h post-sembrat s'aplicaren els tractaments d'interès durant el temps estipulat. Un cop acabat el tractament les cèl·lules foren rentades amb PBS, desadherides mecànicament amb l'ajuda d'un *scraper*, resuspeses en 1 ml de PBS i incloses en tubs eppendorf. Es prengueren 10  $\mu$ l de suspensió cel·lular per fer comptatge de cèl·lules amb blau de tripà en cambra de Neubauer; paral·lelament es centrifugaren els tubs eppendorf a 200 g 4°C durant 5 minuts. Després d'eliminar el sobrenedant, els pellets foren lisats amb *somatic cell ATP releasing reagent* (Sigma-Aldrich) i les mostres es congelaren ràpidament submergint-les en nitrogen líquid. L'ATP es degrada amb facilitat i és molt important processar i congelar les mostres amb la major celeritat possible per minimitzar la pèrdua de l'analit. Les mostres es conservaren a -80°C fins a ser processades per a la determinació dels nivells d'ATP i activitat ATP-citrat sintasa (procediments realitzats pel grup de recerca de Biologia Vasculat i Metabolisme (VAM) del Vall d'Hebron Institut de Recerca, VHIR).

### **6.1- Mesura dels nivells d'ATP cel·lular**

La mix de reacció per determinar els nivells d'ATP en els lisats obtinguts contenia: glucosa 2.5 mM, 0.5 unitats d'hexoquinasa, 0.5 unitats de glucosa-6P deshidrogenasa, 0.2 mM de NADP<sup>+</sup>, en tampó fosfat 10 mM pH 8. La reacció es realitzà a temperatura ambient. La ràtio de conversió del NADP<sup>+</sup> a NADPH fou quantificada espectrofotomètricament enregistrant canvis d'absorbància del NADPH a 340 nm. Els nivells de NADPH produïts són proporcionals al contingut inicial d'ATP de la mostra, necessari per a la reacció enzimàtica. Per tal de definir la concentració d'ATP de la mostra problema, s'utilitzà una corba estàndard confeccionada prèviament. Els valors obtinguts en les diferents mostres es normalitzaren pel nombre de cèl·lules establert pel comptatge dut a terme el dia de la recollida i lisi de les cèl·lules. Les dades s'expressaren en nmol d'ATP per milió de cèl·lules (nmol ATP/10<sup>6</sup> cèl·lules).

### **6.2- Mesura de l'activitat citrat sintasa (CS)**

La mix de reacció per determinar l'activitat citrat sintasa als lisats obtinguts contenia: 5,5'-Ditiobis (2-nitrobenzoic)(DTNB) 0.1 mM, acetil-CoA 0.3 mM, oxalacetat 0.5 mM, en tampó Tris 100 mM pH 8.1 (ajustat amb HCl). La citrat sintasa catalitza, a partir de l'acetil-CoA i l'oxalacetat, la síntesi de citrat tot alliberant coenzim A (CoA-SH). El CoA-SH reacciona amb el DTNB, i el rati de reacció fou quantificat espectrofotomètricament per determinació d'absorbància a 412 nm (mesura de l'alliberament de CoA-SH). La reacció es realitzà a temperatura ambient. Els valors obtinguts en les diferents mostres es normalitzaren pel número de cèl·lules establert pel comptatge dut a terme el dia de la recollida i lisi de les cèl·lules. Les dades es representaren per unitat d'enzim per milió de cèl·lules (UCS/10<sup>6</sup> cèl·lules). Una unitat de citrat sintasa és la quantitat d'enzim que catalitza l'alliberació d'un pmol de CoA-SH.



### 7- Estudi del metabolisme dels esfingolípid

#### 7.1- Anàlisi de lípids

Per als experiments d'anàlisi de lípids es sembraren  $1.5 \times 10^6$  cèl·lules en discos de 60 mm (tres per cada condició a avaluar). Un cop aplicat el tractament corresponent, les cèl·lules es rentaren amb PBS i es recolliren per tripsinització. La suspensió cel·lular obtinguda va ser centrifugada 5 minuts a 200 g a 15°C. Per extreure els lípids del pellet cel·lular resultant, s'addicionà metanol (0.5 ml) i cloroform (0.25 ml). A la mescla s'hi afegiren espècies d'esfingolípid com a estàndards interns (0.2 nmol de cadascuna): *N*-dodecanoïlesfingosina, *N*-dodecanoïlglucosilesfingosina i *N*-dodecanoïlesfingosil-fosforilcolina. Les mostres s'incubaren *overnight* a 48°C. Seguidament, s'addicionaren 75 µl d'hidròxid de potassi 1 M dissolt en metanol i es va incubar durant 2 h a 37°C. La mescla es neutralitzà amb 75 µl d'àcid acètic 1 M i es va dessecar amb nitrogen líquid. Els extractes lipídics obtinguts es solubilitzaren en 150 µl de metanol.

Per a l'anàlisi per espectròmetre de masses es va utilitzar un sistema Waters Acquity UPLC (espectròmetre *ultraperformance* de masses acoblat a cromatografia líquida; LC (UPLC) MS) connectat a un espectròmetre Waters LCT Premier Orthogonal Accelerated Time of Flight (espectròmetre de masses per temps de vol; TOF MS), que es programà en mode de ionització d'electrosprai positiva i negativa. S'obtingué un espectre complet de 50 a 1500 Da. La precisió en la determinació de masses i la reproductibilitat es mantingueren utilitzant un esprai de referència independent (Lock Spray).

Per al sistema UPLC es va utilitzar una columna analítica de 100mm x 3.1 mm id, 1.7 µm C8 Acquity UPLC BEH (Waters). Les dues fases mòbils utilitzades foren de format d'amoni 1 mM, 0.05 mM àcid fòrmic en metanol (Fase A), i format d'amoni 2 mM, 0.05 mM àcid fòrmic en H<sub>2</sub>O (Fase B). El gradient que es va programar fou: gradient 0 minuts 80% A; 3 minuts 90% A, 6 minuts 90% A; 15 minuts 99% A; 18 minuts 99% A; 20 minuts 80% A. La columna es va córrer a 30°C.

La quantificació fou realitzada utilitzant el cromatograma iònic obtingut per cada condició, definint una finestra de 50 mDa. El rang dinàmic lineal es va determinar per injecció de mescles estàndard. La identificació positiva dels composts es basà en la mesura precisa de masses (error de <5 ppm) i en la comparació del temps de retenció de la cromatografia líquida de la mostra problema amb el de l'estàndard.

La preparació de les mostres es va realitzar al nostre laboratori. L'anàlisi per espectrometria de masses LC (UPLC)-TOFMS va ser dut a terme a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC; CSiC), pel grup de recerca dirigit per les doctores Josefina Casas i Gemma Fabriàs.

#### 7.2- Assaig d'activitat enzimàtica de la desaturasa-1 (Des-1)

Per a la determinació de l'activitat de la Des-1 es va utilitzar el compost 6-[N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino] hexanoïlesfinganina (DHCerC6NBD; sintetitzat a l'IQAC, CSiC), anàleg fluorescent de

dihidroceramides de 6 carbonis. Un cop internalitzada per les cèl·lules, la DHCerC6NBD és desaturada a l'anàleg de la ceramida 6-[N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino] hexanoïlesfingosina (CerC6NBD). Tenint en compte que les dihidroceramides són desaturades de forma majoritària per la Des-1, la utilització de la DHCerC6NBD i mesura dels nivells de CerC6NBD generats per la cèl·lula representa un bon mètode per a la determinació de l'activitat enzimàtica de la Des-1. Es va realitzar l'assaig en lisats cel·lulars i en cèl·lules en cultiu. L'anàlisi dels nivells de CerC6NBD fou realitzat per HPLC acoblat a un detector fluorimètric (Muñoz-Olaya et al., 2008).

Per a la preparació del lisat cel·lular es van sembrar  $10^6$  cèl·lules que passades 24 h van ser rentades, tripsinitzades i pelletejades (5 minuts a 200 g a 15°C). El pellet va ser resuspès en tampó fosfat 0.2 M pH 7.4, i la solució va ser sonicada. Seguidament, al lisat s'hi adicionà el tractament d'interès i la mescla substrat (10  $\mu$ M DHCerC6NBD, 2 mg/ml NADH). La reacció enzimàtica es realitzà a 37°C durant 4 h, i s'aturà mitjançant l'addició de metanol. Les mostres van ser vortexades i conservades a 4°C *overnight*. Finalment les mostres foren centrifugades (1,500 g 3 minuts), els sobrenedants transferits a vials de HPLC i se n'injectaren 25  $\mu$ l al sistema HPLC.

Per als assajos en cultiu cel·lular, es sembraren  $1.5 \times 10^6$  cèl·lules en discs de 60 mm (tres per condició). Un cop aplicats els tractaments d'interès, el medi va ser eliminat, es va afegir medi fresc amb DHCerC6NBD 10  $\mu$ M i es deixà incubar durant 4 h a 37°C. Passat el temps de reacció, el medi es va recollir i les cèl·lules van ser rentades amb PBS que es recuperà mesclant-lo amb el medi. Les cèl·lules es tripsinitzaren, pelletejaren (5 minuts a 200 g a 15°C) i es van sotmetre a un altre rentat amb PBS. El pellet resultant fou lisat per resuspensió en aigua i sonicació. Després d'haver afegit metanol tant al medi com al lisat cel·lular per a parar la reacció enzimàtica, les mostres van ser conservades 16 h a 4°C. Finalment, el lisat cel·lular va ser centrifugat (1,500 g 3 minuts), i el sobrenedant i la mostra de medi es van transferir a vials de HPLC. S'injectaren 25  $\mu$ l de la mostra de medi i 0.1 ml del lisat cel·lular als sistema HPLC.

La preparació de les mostres van ser realitzada al nostre laboratori. L'anàlisi per HPLC va ser dut a terme a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC; CSiC), pel grup de recerca dirigit per les doctores Josefina Casas i Gemma Fabriàs.

## MATERIAL I MÈTODES

---

### 8- Transfecció de DNA a cèl·lules de mamífer

En funció de la línia cel·lular a transfectar s'utilitzà el mètode de la polietilenimina (PEI; Polysciences Inc.) o la lipofectamina (Lipofectamine™ 2000).

Vector	Proteïna de fusió	Procedència
pGL3-Basic	Luciferasa-promotor TRIB2	Dra. Karen Keeshan, Beatson Institute for Cancer Research
pGL3-Basic	Luciferasa-promotor TRIB3	Dra. Karen Keeshan, Beatson Institute for Cancer Research
mKeima-Red-Mito-7	mKeima-Red	Addgene
pGlo-myc	MYC-TRIB3	Dr. Guillermo Velasco, Universidad Complutense de Madrid
pRL-CMV	Renilla	Promega

Taula 4: Plasmidis utilitzats en aquest projecte.

#### 8.1 – Transfecció amb PEI (polietilenimina)

Tècnica de transfecció utilitzada en cèl·lules HEK-293T. La polietilenimina és un polímer policatiònic constituït per monòmers d'etilenimina. Concretament, per a la realització d'aquest treball emprarem el polímer lineal de 25 kDa. Els cations dels grups amino del polímer interaccionen amb les càrregues negatives dels grups fosfat del DNA i el condensen sobre si mateix, obtenint estructures més compactes que en faciliten l'entrada a la cèl·lula. El PEI fou dissolt en aigua a pH 7.4 (neutralitzada amb HCl) a una concentració de 1 mg/ml i al·liquotat en vials d'1 ml. Els vials *stock* foren conservats a -80°C. Prèviament a la transfecció dels DNAs d'interès, fou necessari un treball experimental previ per definir la relació DNA:PEI ( $\mu\text{g}:\mu\text{l}$ ) que permetia una transfecció òptima a les cèl·lules HEK-293T. La relació determinada fou d'1:10 ( $\mu\text{g}:\mu\text{l}$ ).

Les cèl·lules HEK-293T van ser sembrades en plaques de 6 pous a una confluència del 60%. A les 24 h post-sembrat es procedí a preparar la mescla per a la transfecció d'1  $\mu\text{g}$  de plasmidi per pou. El volum de PEI necessari (10  $\mu\text{l}$ ) fou diluït en 250  $\mu\text{l}$  de medi DMEM sense sèrum i mesclat amb vòrtex. Seguidament, s'addicionà 1  $\mu\text{g}$  del plasmidi, es vortexà i es deixà reposar 10 minuts a temperatura ambient per permetre la interacció DNA-PEI. Finalment, tot el volum fou afegit gota a gota al pou corresponent i es deixaren incubar les cèl·lules 24-48 h a 37°C.

#### 8.2- Transfecció amb lipofectamina

Tècnica de transfecció utilitzada en cèl·lules MiaPaca2 i A549, línies cel·lulars en les quals el PEI assoleix un rendiment de transfecció molt baix. Aquesta tècnica es basa en la utilització de liposomes catiònics. Les

càrregues positives dels liposomes interaccionen amb els grups fosfat del DNA, formant una estructura en la que el DNA queda envoltat. Els liposomes que contenen DNA exposen càrrega neta positiva que permet superar la repulsió electrostàtica del DNA amb la membrana plasmàtica (càrrega negativa), fusionar-s'hi i alliberar el DNA a l'interior de la cèl·lula. El mètode de transfecció amb lipofectamina permet assolir un alt rendiment de transfecció però, com a contrapunt, la seva toxicitat és més elevada que la del PEI.

Les cèl·lules van ser sembrades en plaques de 6 pous a una confluència del 60%. A les 24 h post-sembrat es procedí a preparar la mescla de transfecció. Transfectàrem 1 µg de plasmidi per cada pou. La relació DNA:lipofectamina (µg:µl) que determinàrem va ser d'1:2. El volum de lipofectamina necessari (2 µl) va ser diluït en 250 µl de medi OPTIMEM, mesclat amb vòrtex i es deixà reposar 4 minuts a temperatura ambient. En paral·lel, s'addicionà 1 µg del plasmidi d'interès a 250 µl de medi OPTIMEM, es vortexà i un cop passats els 4 minuts de repòs de la lipofectamina, es mesclaren els dos volums (500 µl totals) i es deixà incubar durant 20 minuts a temperatura ambient. Seguidament, tot el volum va ser afegit gota a gota al pou corresponent i es deixaren incubar les cèl·lules 4 h a 37°C. Passat aquest temps és necessari eliminar el medi amb lipofectamina i addicionar medi fresc amb 10% de sèrum. La lipofectamina és altament tòxica i una incubació més llarga induiria mort cel·lular. Les cèl·lules es deixaren incubar amb medi fresc 24-48 h a 37°C.

## 9- Biologia Molecular

### 9.1- Amplificació de DNA

L'amplificació de plasmidis s'efectuà en bacteris *E.coli* DH5α altament competents per a la transformació de DNA. Tots els procediments foren efectuats treballant amb bunsen per minimitzar el risc de contaminació.

Els *stocks* de bacteris supercompetents van ser preparats amb anterioritat al laboratori pel Dr. Gerard Ruiz Babot. Bacteris DH5α van ser crescuts en 250 ml de medi LB (*Luria Broth Base*, 25g/l en aigua destil·lada i autoclavat; Invitrogen) durant 16 h a temperatura ambient. Seguidament el cultiu va ser incubat en gel durant 10 minuts i centrifugat a 1,000 g durant 10 minuts a 4°C. El pellet s'incubà amb 80 ml de tampó TB (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl pH 6.7 (KOH)) durant 10 minuts en gel i es va tornar a centrifugar a 1,000 g durant 10 minuts a 4°C. El pellet resultant va ser resuspès en tampó TB 7% DMSO, al·lquotat i congelat ràpidament en nitrogen líquid. Les al·lquotetes van ser conservades a -80°C.

A un tub eppendorf amb 100 µl de cultiu de bacteris supercompetents s'addicionaren 10 ng del plasmidi a amplificar. A continuació, el tub va ser incubat en gel durant 30 minuts i, tot seguit, 2 minuts a 42°C sense agitació (transformació per *shock* tèrmic). Després d'afegir 400 µl de medi LB, l'eppendorf s'incubà a 37°C

## MATERIAL I MÈTODES

---

durant 40 minuts en agitació (1000 rpm). Passats els 40 minuts, es prengueren 50 µl de cultiu transformat i es plaquejaren en disc de petri amb l'ajuda d'una nansa de vidre. La placa utilitzada per sembrar conté LB-agar (Invitrogen) amb el corresponent antibiòtic de selecció. Deixàrem incubar la placa de petri a 37°C *overnight*. El matí següent, es picaren tres colònies individuals i es resuspengueren per separat en tubs falcon de 15 ml que contenien 2 ml de medi LB amb l'antibiòtic de selecció corresponent (concentració 1:1,000). Els cultius es deixaren créixer a 37°C en agitació (250 rpm) durant 6-7 h. Passat aquest temps, confirmàrem si els bacteris havien crescut observant la terbolesa dels cultius. Seguidament, incloguérem un dels cultius crescuts a un erlenmeyer amb 250 ml de medi LB amb antibiòtic de selecció a concentració 1:1,000, i l'incubàrem a 37°C en agitació (250 rpm) durant 16 h.

Amb el volum sobrant dels altres cultius transformats crescuts en tub falcon es va fer el glicerinat. Es prengueren 800 µl de cultiu i s'addicionaren a un tub eppendorf conjuntament amb 200 µl de glicerol. El glicerinat es conservà a -80°C i va permetre disposar de cultiu transformat per a la següent ocasió en què va caldre amplificar el DNA en qüestió.

Finalment, el cultiu de 250 ml crescut fou centrifugat a 3,500 rpm durant 15 min a 4°C. El sobrenedant fou eliminat i el pellet de bacteris congelat a -20°C fins a ser processat per purificar el plasmidi d'interès. Per a tal efecte s'utilitzà el kit comercial *Qiagen Plasmid Purification Midprepi kit* (Qiagen, ThermoFisher Scientific). El DNA purificat, fou dissolt en aigua destil·lada i quantificat al Nanodrop (ThermoFisher Scientific). Els DNAs van ser conservats a -20°C.

### **9.2- Assaig de gen reporter luciferasa per a l'activitat transcripcional dels promotors de TRIB2 i TRIB3**

Aquest procediment experimental es dugué a terme per determinar l'efecte del tractament amb ABTL0812 sobre l'activitat transcripcional dels promotors dels gens de TRIB2 i TRIB3. Amb aquest objectiu s'utilitzaren els vectors de gen reporter luciferasa pGL3-Basic, que expressen els promotors de TRIB2 (insert de 2.6 kb *upstream* des de l'inici de transcripció de TRIB2) o TRIB3 (regió promotora des de posició -262 fins a regió 5'-UTR), fusionats al gen de la luciferasa.

Cèl·lules MiaPaca2 i A549 foren sembrades en plaques de 12 pous a una confluència del 60%. El dia següent, les cèl·lules van ser transfectades amb 500 ng de DNA total (450 ng del vector de gen reporter i 50 ng del vector pRL-CMV-Renilla luciferasa, Promega). La renilla va ser utilitzada com a control de transfecció; els valors d'activitat renilla permeteren normalitzar els valors d'activitat luciferasa en funció del grau de transfecció assolit a cada pou. 24 h post-transfecció, les cèl·lules van ser tractades amb vehicle (etanol) o ABTL0812 els temps estipulats.

Un cop aplicats els tractaments es va procedir a la lectura de l'activitat luciferasa emprant el kit comercial *Dual Luciferase Reporter Assay System* de Promega. Les cèl·lules van ser rentades amb PBS, lisades amb *Passive Lysis Buffer* (kit Promega) i incubades durant 15 minuts en agitació intensa. Els lisats foren recollits i mantinguts en gel. Per a la lectura de l'activitat luciferasa i renilla utilitzarem plaques opaques de 96 pous. A continuació es segueixen les instruccions estipulades al manual de la casa comercial del kit de Promega. A cada pou s'addicionaren 25 µl de lisat i 50 µl de LAR( *Luciferasa Assay Reagent*; substrat de la luciferasa, kit Promega) i es va llegir la placa. A continuació, s'addicionaren a cada pou 50 µl del tampó Stop&Glo (kit Promega), que inhibeix el senyal generat per la luciferasa i aporta el substrat que inicia la reacció catalitzada per la Renilla, i es va fer una segona lectura. Les lectures de luminescència es realitzaren al lector de microplaques *Clarity™* (BioTek Instruments). Les dades obtingudes es representen en valors d'activitat luciferasa normalitzats pels nivells de l'activitat renilla.

### 9.3- Extracció de RNA total de cèl·lules en cultiu

Per a l'aïllament de RNA total es sembraren 2 discs de 10 cm per cada condició a avaluar. Les cèl·lules foren sembrades i després d'aplicar els tractaments d'interès foren rentades amb PBS i tripsinitzades. Un cop desadherides, les cèl·lules es resuspengueren en PBS i es pelletejaren per centrifugació a 200 g durant 5 minuts. L'RNA total fou extret dels pellets cel·lulars utilitzant el *Ribopure RNA purification kit* (ThermoFisher Scientific), seguint les instruccions estipulades per la casa comercial. Els pellets cel·lulars van ser homogeneïtzats emprant el tampó *TRI Reagent* (kit ThermoFisher Scientific), una solució que conté fenol i tiocianat de guanidina que lisa les cèl·lules i inactiva ràpidament les nucleases. Posteriorment s'addicionà bromocloropropà per separar l'homogenat en fases aquosa i orgànica. La fase aquosa, que conté l'RNA, va ser recuperada i filtrada per una columna amb captura RNA (kit ThermoFisher Scientific). Es van aplicar diversos rentats a la columna amb tamps de rentat (kit ThermoFisher Scientific) i finalment es va eluir l'RNA. L'RNA purificat fou dissolt en aigua destil·lada i quantificat al Nanodrop (ThermoFisher Scientific). Els RNAs van ser conservats a -80°C. La posterior anàlisi per RT-qPCR està descrita a l'apartat 10.4 de Material i Mètodes.

### 10- Generació de tumors xenograft

Per a la generació de tumors xenograft de cèl·lules MiaPaca2 i A549 s'utilitzaren ratolins femella atímics de la soca Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu de 6 setmanes d'edat. Els ratolins foren adquirits amb 5 setmanes d'edat i foren mantinguts en quarantena durant una setmana abans d'iniciar el treball experimental. Al tractar-se de ratolins immunodeprimits i pel fet d'estar treballant amb material cancerós humà, la seva manipulació va ser duta a terme en sala de seguretat biològica de nivell 2 al mòdul SPF (*Specific Pathogen Free*) del servei d'estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Tots els procediments duts a terme amb animals van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal i Humana (CEEAH) de la UAB. Els experiments amb ratolins foren dissenyats i supervisats per la Dra. Sònia Solé.

#### 10.1- Amplificació i injecció de cèl·lules

El nombre de cèl·lules necessàries per a la generació dels xenografts ve definit pel nombre de ratolins emprats ( $n=8$  per grup de tractament) i pel nombre de cèl·lules a injectar per a la generació d'un tumor. En aquest cas, després d'un experiment previ d'escalat es va definir un nombre de  $3 \times 10^6$  cèl·lules per tumor. D'aquesta manera el nombre de cèl·lules necessàries per a cada experiment, considerant un grup vehicle i un de tractament amb ABTL0812, oscil·là entre els 50-60 milions de cèl·lules.

L'amplificació de les línies cel·lulars s'inicià una setmana i mitja abans del dia definit per a la injecció. Les cèl·lules foren crescudes en *flasks* T75 i mantingudes a una confluència màxima del 80% per assegurar un ritme proliferatiu òptim. El dia de la injecció, les cèl·lules foren rentades una vegada amb PBS, tripsinitzades, resuspeses en medi DMEM 10% FBS i incloses en tubs falcon de 50 ml. Es prengueren 10  $\mu$ l de la suspensió cel·lular de cada tub falcon per fer comptatge amb blau de tripà en cambra de Neubauer. En paral·lel al comptatge els tubs falcon foren centrifugats 5 minuts a 200 g a 10°C. Els sobrenedants foren eliminats per aspiració, els pellets rentats amb PBS i centrifugats 5 minuts a 200 g a 10°C novament. Per acabar, els pellets foren resuspesos en medi DMEM 0% FBS. El volum de medi addicionat vingué determinat pel total de cèl·lules recollides i es prepararen a una concentració de  $50 \times 10^6$  cèl·lules/ml ( $3 \times 10^6$  cèl·lules en 60  $\mu$ l). Es preparà un eppendorf amb 60  $\mu$ l de suspensió cel·lular per cada ratolí i foren transportats en gel a l'estabulari. És important que el medi utilitzat estigui lliure de sèrum, ja que si no és així provoca irritació cutània als ratolins.

A la cabina de seguretat biològica a l'estabulari, es mesclaren els 60  $\mu$ l de suspensió cel·lular de cada eppendorf amb el mateix volum de matrigel (Matrigel™ Matrix, Corning). Els 120  $\mu$ l de cada eppendorf foren injectats subcutàniament a un flanc de cadascun dels ratolins emprant una agulla de 25G. Els ratolins foren mantinguts en gàbies incloses en racs amb sistema de ventilació independent. Es realitzaren mesures del volum tumoral cada dos dies determinant l'amplada i la llargada dels tumors amb un peu de rei. La

fórmula utilitzada per al càlcul del volum tumoral fou:  $(\text{llargada} \times \text{amplada}^2)/2$ . Quan els tumors assoliren un volum de  $100 \text{ mm}^3$  els ratolins foren distribuïts aleatòriament als diferents grups de tractament.

### 10.2- Tractament i seguiment dels ratolins

Els tractaments utilitzats en aquest projecte foren l'ABTL0812 i el quimioterapèutic Docetaxel. L'ABTL0812 s'administrà diluït en 5% glicerol en aigua a una concentració de 120 mg/kg (volum administrat: 150  $\mu\text{l}$ ). L'administració fou realitzada cinc cops per setmana per via oral utilitzant sonda gàstrica. Pel que fa a la quimioteràpia amb Docetaxel, fou administrada diluïda en sèrum fisiològic a una concentració de 15 mg/kg (volum administrat: 100  $\mu\text{l}$ ). El Docetaxel fou administrat per via intraperitoneal tres cops per setmana.

Els volums tumorals foren determinats tres cops per setmana de la manera ja exposada en l'apartat anterior per fer un seguiment exhaustiu del creixement tumoral. Quan els tumors assoliren un volum de  $1300 \text{ mm}^3$  els animals foren eutanasiats. Paral·lelament es va fer un seguiment del pes dels ratolins (mesura tres cops per setmana) per monitoritzar l'evolució del seu estat de salut. Descensos d'un 20% respecte del pes inicial del ratolí foren considerats criteri d'exclusió i comportà l'eutanàsia dels ratolins en qüestió.

### 10.3- Necròpsia i obtenció de mostres

Els ratolins foren eutanasiats per inhalació de  $\text{CO}_2$  a la zona habilitada per a tal efecte al servei d'estabulari de la UAB. Per processar els ratolins el més ràpidament possible un cop eutanasiats, es va fer en grups de cinc animals com a màxim i realitzat per dues persones treballant en paral·lel. Un cop sacrificats, els ratolins es manipularen en cabina d'extracció de gasos a la sala de necròpsies del servei d'estabulari de la UAB. Els animals foren disseccionats per extreure els tumors i avaluar l'estat general dels òrgans. Els tumors foren pesats i fragmentats en tres porcions, destinades a l'anàlisi proteic, extracció de RNA i anàlisi immunohistoquímic. Els fragments destinats a l'extracció de proteïna i RNA foren inclosos en tubs eppendorf degudament identificats i es conservaren a  $-80^\circ\text{C}$  fins a ser processats. Pel que fa al fragment tumoral destinat a l'anàlisi immunohistoquímic fou inclòs en *cassette* i fixat en formol 16 h. El dia següent els *cassettes* foren rentats i conservats en PBS i parafinats.

### 10.4- Immunohistoquímica

Els blocs de tumors en parafina foren enviats a la Unitat de Patologia Murina i Comparada (UPMiC) de la Facultat de Veterinària de la UAB, per a l'anàlisi de TRIB3 i CHOP. A partir dels blocs es generaren seccions de 4  $\mu\text{m}$  de gruix que es muntaren en portaobjectes. Els talls histològics foren desparafinats inclosos en bany a  $60^\circ\text{C}$  durant 30 minuts i aplicant 4 rentats amb xilol (el primer de 15 minuts, els restants de 10 minuts). Seguidament els talls foren rehidratats fent tres rentats de 5 minuts amb alcohols de  $100^\circ$ ,  $96^\circ$  i  $70^\circ$ , i un últim rentat de 5 minuts amb aigua destil·lada. A continuació, es procedí al desemascarat



## MATERIAL I MÈTODES

---

antigènic. Com a conseqüència del procés de fixació amb formol, es generen un nombre elevat d'interaccions (ponts de metilè) entre proteïnes del teixit que poden emascarar els epítops d'interès. És necessari trencar aquest *cross-linking* entre proteïnes per permetre una detecció òptima de l'antigen. S'aplicà un protocol de recuperació antigènica induïda per calor. Els talls foren inclosos en cubetes plenes de citrat sòdic (pH 6) i s'aplicaren tres cicles consistents en: 5 minuts al microones a 650 W, 3 minuts a temperatura ambient i omplir la cubeta amb més citrat (evita la deshidratació excessiva dels talls i ajusta el pH per a una incubació òptima amb l'anticòs primari). Acabats aquests cicles es deixaren refredar els talls durant 20 minuts i s'aplicà un rentat de 5 minuts amb aigua destil·lada. Tot seguit, es procedí a inhibir l'activitat peroxidasa endògena dels talls per evitar que interferís amb la detecció de l'activitat peroxidasa associada a l'anticòs secundari emprat. Es van incubar els talls amb una solució de 30% metanol i 3% peròxid d'hidrogen en aigua destil·lada, durant 10 minuts a temperatura ambient i a la fosques. Després de tres rentats amb TBS-tritó 0.1% (permeabilització suau), els talls es bloquejaren amb sèrum de cavall 5% durant 1 h a temperatura ambient. La incubació amb l'anticòs primari (anti-CHOP/DDIT3, 1:100; anti-TRIB3, 1:100; **Taula 2 secció 2.4**) es realitzà en cambra humida *overnight* a 4°C. El dia següent, els talls foren rentats tres vegades amb TBS-tritó 0.1% (5 minuts cada rentat) i incubats amb anticòs secundari conjugat a peroxidasa (Dako, Agilent) durant 45 minuts en cambra humida. Després d'aplicar altra vegada tres rentats de 5 minuts amb TBS-tritó 0.1%, els talls s'incubaren amb DAB (3,3'-diaminobenzidina, substrat de la peroxidasa associada a l'anticòs secundari que du associat un cromogen) durant 3-8 minuts a temperatura ambient. La reacció s'aturà realitzant un rentat amb aigua destil·lada. Per visualitzar bé el teixit, es realitzà una contraincubació amb hematoxilina de Harris diluïda 1:4. Els portaobjectes es banyaren en cubeta amb hematoxilina durant 10 segons a temperatura ambient i seguidament es rentaren amb aigua corrent. Finalment, els talls foren deshidratats submergint-los en alcohols de graduació creixent (70°, 96° i 100°), aplicant el mateix temps d'exposició que en la hidratació inicial, i efectuant tres rentats amb xilol per eliminar l'aigua residual. Per acabar, es cobriren les preparacions amb cobreobjectes utilitzant DPX (VWR internacional) com a medi de muntatge. Els marges del cobreobjectes van ser segellats amb esmalt transparent per evitar l'entrada d'aire. Els talls d'immunohistoquímica van ser conservats a temperatura ambient i visualitzats per microscòpia de camp clar utilitzant un microscopi Nikon Eclipse 90i (Nikon).

### **11- Obtenció de mostres de pacients i anàlisi dels marcadors farmacodinàmics TRIB3 i CHOP**

L'ABTL0812 es troba actualment en Fase Clínica 2 en pacients amb càncer de pulmó (NSCLC escamós) i d'endometri avançat. L'estudi va ser aprovat per l'Agència espanyola de medicaments i dispositius mèdics. L'assaig clínic està registrat a [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), amb l'identificador NCT03366480. L'ABTL0812 és administrat com a primera línia de tractament en combinació amb quimioteràpia estàndard (dos cicles de

carboplatí i paclitaxel). L'ABTL0812 és administrat per via oral, a una dosi diària de 4,000 mg (3 administracions de 1,300 mg, una cada 8 h). La presa d'ABTL0812 comença 1 setmana abans del primer cicle de quimioteràpia i es manté fins a la finalització de l'estudi.

En aquest treball també s'analitzaren mostres de pacients enrolats en la Fase Clínica 1 que tenien tumors sòlids en estat avançat. L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic de Barcelona i l'Agència espanyola de medicaments i dispositius mèdics. L'assaig està registrat a [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), amb l'identificador NCT02201823. L'ABTL0812 va ser administrat com a tractament únic. El fàrmac va ser administrat diàriament per via oral a una dosi de 4,000 mg (dues administracions de 2,000 mg, una cada 12 h) durant 28 dies.

### 11.1- Presa de mostres

Les mostres sanguínies per a l'anàlisi dels biomarcadors farmacodinàmics s'obtingueren per venopunció amb agulla de 21G i emprant vials amb citrat (Vacutainer). El volum de sang extret oscil·là entre els 14-16 ml. A la Fase Clínica 1 es van fer 4 preses de mostra a cada pacient: una mostra abans de començar el tractament, dues mostres durant el tractament, i una mostra just després de completar els 28 dies de tractament (dia 0, dia 5, dia 15 i dia 29 de tractament; pres abans de la primera dosi diària d'ABTL0812). Els temps de presa de mostres per a la Fase Clínica 2 estan indicats a la **Taula 5**. Les mostres, un cop adquirides, van ser enviades a 4°C al laboratori, on es processaren el mateix dia.

<b>Dia</b>	<b>Hora</b>	
<b>Dia 0</b>	0h	Abans 1a administració ABTL0812
	8h	Abans 2a administració ABTL0812
<b>Dia 7</b> Cicle 1 de quimioteràpia	0h	Abans 1a administració ABTL0812
<b>Dia 21</b> Cicle 2 de quimioteràpia	0h	Abans 1a administració ABTL0812

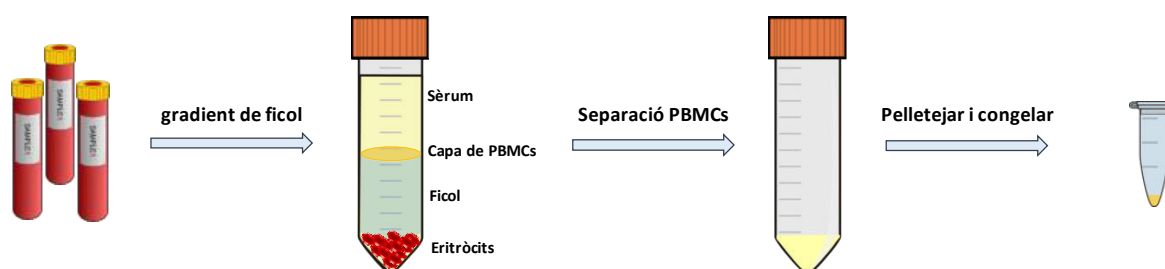
**Taula 5:** Punts de presa de mostres sanguínies en pacients de la Fase Clínica 2.

### 11.2- Aïllament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) per gradient de ficoll

Procediment experimental realitzat en cabina de seguretat biològica de nivell 2 pel fet de tractar-se de mostra biològica humana (tant per a les mostres procedents de pacients enrolats a les fases clíniques, com de voluntaris sans). S'empraren 10 ml de mostra sanguínia. El volum de sang s'incloué en un tub falcon de 50 ml i s'hi addicionà el mateix volum de PBS. En un altre tub falcon de 50 ml s'afegiren 12 ml de ficol (GE

## MATERIAL I MÈTODES

Healthcare), vigilant de no deixar gotes a les parets del tub. Addicionarem els 20 ml de sang diluïda a sobre del ficoll amb molta cura de no barrejar ambdós líquids. Si el pas s'ha fet correctament es formen dues capes ben diferenciades. El tub falcon es centrifugà durant 20 min a 1,200 g, a temperatura ambient i sense frens (important per a la formació del gradient). Un cop completada la centrifugació es visualitzaren clarament 4 fases diferents, corresponents al eritròcits, ficoll i sèrum, i una banda prima blanca de PBMCs. Ajudant-nos d'una pipeta *pasteur* de vidre, prenguérem la capa de PBMCs i les incloguérem a un tub falcon de 50 ml nou. S'addicionà PBS fins a assolir un volum total de 40 ml i es centrifugà durant 10 minuts a 300 g, a temperatura ambient. El pellet blanc obtingut fou resuspès en 10 ml de PBS, es prengueren 10  $\mu$ l de suspensió cel·lular per realitzar un comptatge amb blau de tripà en cambra de Neubauer, i es centrifugà novament 10 minuts a 300 g, a temperatura ambient. Finalment, el pellet cel·lular obtingut fou conservat a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins a ser processades.



**Figura 74: Protocol d'aïllament de PBMCs per gradient de ficoll.** Esquema explicatiu del procediment aplicat per a aïllar cèl·lules mononuclears de sang perifèrica mitjançant gradient de ficoll.

### 11.3- Cultiu i tractament *in vitro* de PBMCs

Per al cultiu de les cèl·lules PBMCs aïllades, es descongelaren i sembraren en discs de 10 cm en medi de cultiu RPMI 10% FBS. Els discs amb PBMCs en suspensió es van deixar reposar 2 h a l'incubador a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuació es van aplicar els tractaments corresponents directament als disc i es va deixar incubar 6 h. Finalment, la suspensió cel·lular va ser recollida i centrifugada a 200 g durant 5 minuts. El pellet cel·lular va ser sotmès a protocols d'extracció proteica o de RNA.

### 11.4- Extracció de RNA de sang total i PBMCs

Per a l'aïllament de RNA total del pellet de PBMCs i de sang total de pacient s'utilitzà el *Ribopure RNA purification kit for whole blood* (ThermoFisher Scientific), seguint les instruccions estipulades per la casa comercial. Pel que fa a la sang total, es treballà amb 0.5 ml de mostra sanguínia. El kit utilitzat permet

treballar directament tant amb cèl·lules com amb sang, i combina dos mètodes de purificació de RNA. En una primera etapa es va addicionar la solució de lisi (kit de ThermoFisher Scientific) i es va realitzar la purificació inicial de RNA a través d'extracció amb fenol/cloroform (kit ThermoFisher Scientific). Seguidament, es va dur a terme la segona purificació de RNA fent passar la solució per un filtre de fibra de vidre (kit ThermoFisher Scientific). L'RNA purificat, fou dissolt en aigua destil·lada, quantificat al Nanodrop (ThermoFisher Scientific) i conservat a -80°C fins a ser analitzats.

### 11.5- PCR quantitativa per transcripció reversa (RT-qPCR)

L'obtenció del cDNA a partir de l'RNA total aïllat es va fer utilitzant l'*iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). Es va utilitzar 1 µg de RNA de cada condició en cada reacció. Per a preparar la mix de reacció es segueixen les indicacions de la casa comercial. Les condicions de reacció foren: 5 minuts a 25°C (unió dels primers), 20 minuts a 46°C (transcripció reversa), 1 minut a 95 °C (inactivació de la transcriptasa inversa). El termociclador utilitzat fou un PTC-100™ (MJ Research, Inc.). El cDNA va ser conservat a -20°C fins a ser emprat per a la PCR quantitativa (qPCR).

Per preparar les reaccions per a la qPCR s'utilitzà la TaqMan Gene Expression Master Mix (ThermoFisher Scientific). Les sondes (ThermoFisher Scientific) utilitzades per a la detecció dels amplicons d'interès van ser les següents: ATF4 humà (Hs00909569\_g1), DDIT3/CHOP humà (Hs99999172\_m1), GAPDH humà (Hs03929097\_g1) i TRIB3 humà (Hs01083394\_m1). Al treballar amb el cDNA procedent de mostres dels pacients (sang total i PBMCs) s'utilitzaren 150 ng per dur a terme la qPCR; en el cas dels cDNA procedents de cèl·lules de cultiu tractades *in vitro* (apartat 7.3 de material i mètodes) se n'empraren 50 ng. L'amplificació fou duta a terme al Laboratori d'Anàlisi i Fotodocumentació, d'Electroforesis, Autoradiografies i Luminescència (LAFEAL) de la Facultat de Medicina de la UAB. El termociclador de qPCR utilitzat fou un Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad) i el protocol seguit: 50 °C 2 min, 95°C 10 min, i 39 cicles de: 95°C 15 s, 55°C 1 min, lectura de placa. Els dispositius foren controlats amb el software Bio-Rad CFX Manager v 3.1.

### 11.6- Aïllament de plaquetes per monitoritzar nivells de fosfo-Akt (Ser473)

Procediment experimental realitzat en cabina de seguretat biològica de nivell 2 pel fet de tractar-se de mostra biològica humana (tant per les mostres procedents de pacients enrolats a les fases clíniques, com de voluntaris sans). Per a l'aïllament de plaquetes s'utilitzaren 3 ml de mostra sanguínia. La mostra es va separar en dos tubs eppendorf (Tub A i B; 1.5 ml per tub). Ambdós tubs van ser centrifugats a 200 g durant 20 minuts a 4°C. Els sobrenedants van ser recuperats i inclosos en nous tubs eppendorf. El tub A (control) va ser centrifugat a 1,000 g durant 10 min a 4°C i el pellet es congelà a -80°C. El tub B (trombina) va ser centrifugat a 1,000 g durant 10 min a 4°C i el pellet resuspès en 1.5 ml de tampó Tyrode (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.42 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM glucosa, 10 mM HEPES, 0.2% (p/v) BSA, en aigua destil·lada). Tot seguit, es van addicionar 4.5 µl de trombina diluïda 1:10 en tampó Tyrode i s'incubà durant

## MATERIAL I MÈTODES

---

5 minuts a 37°C. La reacció va ser aturada incloent el tub en gel. Finalment, es va centrifugar a 1,000 g durant 10 min a 4°C i el pellet es congelà a -80°C. L'activació de les plaquetes amb trombina fou duta a terme per maximitzar el senyal de fosfo-Akt i poder detectar-lo amb més facilitat. L'anàlisi dels nivells de fosfo-Akt (Ser473) fou duta a terme per l'empresa Kymos Pharma Services, que disposa de la plataforma d'immunoassaig *Meso Scale Discovery* (Meso Scale Diagnostics, LLC). Els valors de fosfo-Akt (Ser473) van ser normalitzats pels valors de la proteïna Akt de les mateixes mostres.

### 12- Anàlisi estadístic

L'anàlisi i processat d'imatges fou realitzat amb els softwares ImageJ 1.51p 22 (Wayne Rasband, National Institutes of Health) i l'Adobe Photoshop CS6. La significació estadística de les dades obtingudes *in vitro* i *in vivo* fou determinada utilitzant el programa GraphPad Prism v 6.0. S'utilitzà l'anàlisi de variància ANOVA d'una via seguit pel test de correcció Tukey de comparacions múltiples, o un test de t de Student bilateral. Per al càlcul d'índex de combinació (CI) es va utilitzar el programa CompuSyn, basat en el mètode de Chou-Talalay (Chou, 2010). Es considerà que una diferència era significativament estadística quan  $P < 0.05$ . Els graus de significació es representaren: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  i \*\*\*  $P < 0.001$ .

# **BIBLIOGRAFIA**



## A

- Ahmed, Z., & Bicknell, R. (2009). Angiogenic signalling pathways. *Methods Mol Biol*, 467, 3-24.
- Aita, V. M., Liang, X. H., Murty, V. V., Pincus, D. L., Yu, W., Cayanis, E., ... Levine, B. (1999). Cloning and Genomic Organization of Beclin 1, a Candidate Tumor Suppressor Gene on Chromosome 17q21. *Genomics*, 59(1), 59-65.
- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), 2-11.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal*, 15(23), 6541-6551.
- Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A., & Cohen, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Letters*, 399, 333-338.
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., ... Bownes, M. (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): Structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Current Biology*, 7(10), 776-789.
- Altomare, D. A., & Testa, J. R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24(50), 7455-7464.
- Andruska, N., Zheng, X., Yang, X., Helferich, W. G., Shapiro, D. J., & Shapiro, D. (2015). Anticipatory Estrogen Activation of the Unfolded Protein Response is Linked to Cell Proliferation and Poor Survival in Estrogen Receptor  $\alpha$  Positive Breast Cancer. *Oncogene*, 34(29), 3760-3769.
- Araki, K., & Nagata, K. (2012). Protein Folding and Quality Control in the ER. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(8), a007526.
- Aredia, F., Guamán Ortiz, L. M., Giansanti, V., & Scovassi, A. I. (2012). Autophagy and Cancer. *Cells*, 1(4), 520-534.
- Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P. F., Meijer, A. J., Codogno, P., & Ogier-Denis, E. (2001). The Tumor Suppressor PTEN Positively Regulates Macroautophagy by Inhibiting the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35243-35246.
- Atlashkin, V., Kreykenbohm, V., Eskelinen, E.-L., Wenzel, D., Fayyazi, A., & Fischer von Mollard, G. (2003). Deletion of the SNARE vti1b in Mice Results in the Loss of a Single SNARE Partner, Syntaxin 8. *Molecular and Cellular Biology*, 23(15), 5198-5207.
- Avivar-Valderas, A., Salas, E., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Nagi, C., Debnath, J., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2011). PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses To Promote Survival during Extracellular Matrix Detachment. *Molecular and Cellular Biology*, 31(17), 3616-3629.
- Avril, T., Vauléon, E., & Chevet, E. (2017). Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis*, 6(8), e373.
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., ... Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 182(4), 685-701.



## BIBLIOGRAFIA

---

Azam, F., Mehta, S., & Harris, A. L. (2010). Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *European Journal of Cancer*, 46(8), 1323–1332.

## B

---

Bailey, F. P., Byrne, D. P., McSkimming, D., Kannan, N., & Evers, P. A. (2015). Going for broke: targeting the human cancer pseudokinome. *Biochemical Journal*, 465(2), 195–211.

Balkwill, F. R., & Mantovani, A. (2012). Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology*, 22(1), 33–40.

Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R., & Sabatini, D. M. (2012). An expanded Ragulator is a GEF for the Rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell*, 150(6), 1196–1208.

Barceló, F., Prades, J., Funari, S. S., Frau, J., Alemany, R., & Escribá, P. V. (2004). The hypotensive drug 2-hydroxyoleic acid modifies the structural properties of model membranes. *Molecular Membrane Biology*, 21(4), 261–268.

Bartolomeo, S. Di, Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., ... Fimia, G. M. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *Journal of Cell Biology*, 191(1), 155–168.

Bastarache, J.A., T.Koyama, Wickersham, N. ., & Ware, L. B. (2015). Validation of a multiplex electrohemiluminiscent immunoassay platform in human and mouse samples. *J Immunol Methods*, 408, 13–23.

Baumann, O., & Walz, B. (2001). Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol*, 205, 149-214.

Bayascas, J. R. (2008). Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. *Cell Cycle*, 7(19), 2978–2982.

Becher, O. J., Hambardzumyan, D., Walker, T. R., Helmy, K., Nazarian, J., Albrecht, S., ... Holland, E. C. (2010). Preclinical Evaluation of Radiation and Perifosine in a Genetically and Histologically Accurate Model of Brainstem Glioma. *Cancer Research*, 70(6), 2548–2557.

Beljanski, V., Knaak, C., & Smith, C. (2010). A Novel Sphingosine Kinase Inhibitor Induces Autophagy in Tumor Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(2), 454–464.

Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., & Tsichlist, P. N. (1991). A Retroviral Oncogene, akt, Encoding a Serine-Threonine Kinase Containing an SH2-Like Region. *Science*, 254(5029), 274–277.

Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S. J. H., Asara, J. M., & Manning, B. D. (2016). mTORC1 Induces Purine Synthesis through Control of the Mitochondrial Tetrahydrofolate Cycle. *Science*, 351(6274), 728–733.

Berdel, W. E., Fink, U., & Rastetter, J. (1987). Clinical Phase I Pilot Study of the Alkyl Lysophospholipid Derivative ET-18-OCH<sub>3</sub>. *Lipids*, 22(11), 967–969.

Bergers, G., & Hanahan, D. (2008). Mode of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 592–603.

Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R. J., Ferlinz, K., Schuchman, E. H., & Sandhoff, K. (1995). Purification, Characterization, and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(19), 11098–11102.

- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, 2(6), 326–332.
- Bingol, B., & Sheng, M. (2016). Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 210–222.
- Biondi, R. M., Kieloch, A., Currie, R. A., Deak, M., & Alessi, D. R. (2001). The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO Journal*, 20(16), 4380–4390.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., ... Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of Cell Biology*, 171(4), 603–614.
- Blais, J. D., Addison, C. L., Edge, R., Falls, T., Zhao, H., Wary, K., ... Bell, J. C. (2006). Perk-Dependent Translational Regulation Promotes Tumor Cell Adaptation and Angiogenesis in Response to Hypoxic Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9517–9532.
- Bleicher, R.J., & Cabot, M.C. (2002). Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1585 (2-3), 172-178.
- Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., & Alessi, D. R. (2006). Emerging roles of pseudokinases. *Trends in Cell Biology*, 16(9), 443–452.
- Boudeau, J., Sapkota, G., & Alessi, D. R. (2003). LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. *FEBS Letters*, 546(1), 159–165.
- Bowers, A. J., Scully, S., & Boylan, J. F. (2003). SKIP3, a novel Drosophila tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia. *Oncogene*, 22(18), 2823–2835.
- Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.-L., Metivier, D., ... Kroemer, G. (2003). Lysosomal Membrane Permeabilization Induces Cell Death in a Mitochondrion-dependent Fashion. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(10), 1323–1334.
- Boya, P., & Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27(50), 6434–6451.
- Braakman, I., & Hebert, D. N. (2013). Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5), a013201. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013201>
- Braccini, L., Ciruolo, E., Campa, C. C., Perino, A., Longo, D. L., Tibolla, G., ... Hirsch, E. (2015). PI3K-C2γ 3 is a Rab5 effector selectively controlling endosomal Akt2 activation downstream of insulin signalling. *Nature Communications*, 6, 7400.
- Breen, P., Joseph, N., Thompson, K., Kravetska, J. M., Gudz, T. I., Li, L., ... Separovic, D. (2013). Dihydroceramide Desaturase Knockdown Impacts Sphingolipids and Apoptosis after Photodamage in Human Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. *Anticancer Research*, 33(1), 77–84.
- Brennan, D. F., Dar, A. C., Hertz, N. T., Chao, W. C. H., Burlingame, A. L., Shokat, K. M., & Barford, D. (2011). A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature*, 472(7343), 366–369.
- Brocklyn, J. R. Van, & Williams, J. B. (2012). Comparative Biochemistry and Physiology , Part B The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase : Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 163(1), 26–36.
- Brockman, H. L., Momsen, M. M., Brown, R. E., He, L., Chun, J., Byun, H. S., & Bittman, R. (2004). The 4,5-Double Bond of Ceramide Regulates Its Dipole Potential, Elastic Properties, and Packing Behavior. *Biophysical Journal*, 87(3), 1722–1731.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Brodsky, J. L., & Skach, W. R. (2011). Protein Folding and Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Recent Lessons from Yeast and Mammalian Cell Systems. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(4), 464–475.
- Bröker, L. E., Huisman, C., Span, S. W., Rodriguez, A., Kruyt, F. a E., & Giaccone, G. (2004). Cathepsin B Mediates Caspase-Independent Cell Death Induced by Microtubule Stabilizing Agents in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Advances in Brief Cathepsin B Mediates. *Cancer Research*, 64, 27–30.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Bum Shin, T., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369(6483), 756–758.
- Bruchmann, A., Roller, C., Walther, T. V., Schäfer, G., Lehmusvaara, S., Visakorpi, T., ... Maddalo, D. (2013). Bcl-2 associated athanogene 5 (Bag5) is overexpressed in prostate cancer and inhibits ER-stress induced apoptosis. *BMC Cancer*, 13, 96.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., ... Jr, W. G. K. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes and Development*, 18(23), 2893–2904.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., ... Greenberg, M. E. (1999). Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*, 96(6), 857–868.
- Bulleid, N. J. (2012). Disulfide Bond Formation in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), a013219.
- Burman, C., & Ktistakis, N. T. (2010). Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Letters*, 584(7), 1302–1312.
- Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Torok, L., Pandey, S., Sikorska, M., ... Hermann, R. S. (1996). Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*, 17(8), 1595–1607.
- Byrne, D. P., Foulkes, D. M., & Evers, P. A. (2017). Pseudokinases: update on their functions and evaluation as new drug targets. *Future Med Chem*, 9(2), 245–265.

## C

---

- C.Yao, K., Komata, T., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kondo, S., & M.Germano, I. (2003). Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *J Neurosurg*, 98, 378–384.
- Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., ... Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92–96.
- Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B. A., ... Larijani, B. (2007). Intramolecular and Intermolecular Interactions of Protein Kinase B Define Its Activation In Vivo. *PLoS Biology*, 5(4), 780–791.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257.
- Carnero, A. (2010). The PKB/AKT Pathway in Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1), 34–44.

- Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., ... Thomas, J. E. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, *448*(7152), 439–444.
- Carracedo, A., Lorente, M., Egia, A., Blázquez, C., García, S., Giroux, V., ... Velasco, G. (2006). The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*, *9*(4), 301–312.
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., ... Pandolfi, P. P. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(9), 3065–3074.
- Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P. R., & Ali, M. M. (2015). Crystal structures reveal transient PERK luminal domain tetramerization in endoplasmic reticulum stress signaling. *The EMBO Journal*, *34*(11), 1589–1600.
- Carreras-Sureda, A., Pihán, P., & Hetz, C. (2018). Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: Fine-tuning stress responses. *Cell Calcium*, *70*, 24–31.
- Carver, B. S., Chapinski, C., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Chen, Y., Chandarlapaty, S., ... Sawyers, C. L. (2011). Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cancer Cell*, *19*(5), 575–586.
- Casasampere, M., Ordóñez, Y. F., Casas, J., & Fabrias, G. (2017). Dihydroceramide desaturase inhibitors induce autophagy via dihydroceramide-dependent and independent mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *1861*(2), 264–275.
- Causeret, C., Geeraert, L., Van der Hoeven, G., Mannaerts, G. P., & Van Veldhoven, P. P. (2000). Further Characterization of Rat Dihydroceramide Desaturase: Tissue Distribution, Subcellular Localization, and Substrate Specificity. *Lipids*, *35*(10), 1117–1125.
- Chan, M. C., Nguyen, P. H., Davis, B. N., Ohoka, N., Hayashi, H., Du, K., ... Hata, A. (2007). A Novel Regulatory Mechanism of the Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling Pathway Involving the Carboxyl-Terminal Tail Domain of BMP Type II Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(16), 5776–5789.
- Chazotte, B. (2011). Labeling lysosomes in live cells with lysotracker. *Cold Spring Harbor Protocols*, *6*(2), 210–212.
- Chen, N., & Karantza-Wadsworth, V. (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *1793*(9), 1516–1523.
- Chen, Y., & Klionsky, D. J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of Cell Science*, *124*(2), 161–170.
- Chen, Y., Liu, Y., Sullards, M. C., & Jr, A. H. M. (2010). An Introduction to Sphingolipid Metabolism and Analysis by New Technologies. *Neuromol Med*, *12*, 306–319.
- Cheng, H., Zou, Y., Ross, J. S., Wang, K., Liu, X., Halmos, B., ... Core, M. C. (2015). RICTOR amplification defines a novel subset of lung cancer patients who may benefit from treatment with mTOR1/2 inhibitors. *Cancer Discov*, *5*(12), 1262–1270.
- Chevet, E., Hetz, C., & Samali, A. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress – Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis. *Cancer Discov*, *5*(6), 586–597.
- Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F., & Birnbaum, M. J. (2001). Akt1/PKBα Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(42), 38349–38352.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Choi, A. M. K., Ryter, S. W., & Levine, B. (2013). Autophagy in Human Health and Disease. *The New England Journal of Medicine*, 368(7), 651–662.
- Choo, A. Y., Yoon, S., Gyun, S., Roux, P. P., & Blenis, J. (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *PNAS*, 105(45), 17414–17419.
- Chou, T. (2010). Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*, 70(2), 440–447.
- Chow, L. M. L., & Baker, S. J. (2006). PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Letters*, 241, 184–196.
- Cnop, M., Toivonen, S., Igoillo-Esteve, M., & Salpea, P. (2017). Endoplasmic reticulum stress and eIF2a phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic beta cells. *Molecular Metabolism*, 6(9), 1024–1039.
- Coffer, P. J., & Woodgett, J. R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*, 201, 475–481.
- Collins, B. J., Deak, M., Arthur, J. S. C., Armit, L. J., & Alessi, D. R. (2003). In vivo role of the PIF-binding docking site of PDK1 defined by knock-in mutation. *The EMBO Journal*, 22(16), 4202–4211.
- Colombini, M. (2013). Membrane Channels Formed by Ceramide. *Handb Exp Pharmacol*, (215), 109–126.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073–1081.
- Cook, K. L., Clarke, P. A. G., Parmar, J., Hu, R., Schwartz-roberts, J. L., Abu-asab, M., ... Clarke, R. (2014). Knockdown of estrogen receptor-alpha induces autophagy and inhibits antiestrogen-mediated unfolded protein response activation, promoting ROS-induced breast cancer cell death. *The FASEB Journal*, 28(9), 3891–3905.
- Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., Depinho, R. A., & Guan, K. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes and Development*, 18(734), 1533–1538.
- Costa, R. L. B., Sook, H., & William, H. (2018). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. *Breast Cancer Research and Treatment*, 169, 397–406.
- Crackower, M. A., Oudit, G. Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., ... Torino, U. (2002). Regulation of Myocardial Contractility and Cell Size by Distinct PI3K-PTEN Signaling Pathways. *Cell*, 110, 737–749.
- Cross, D. A. E., R. Alessi, D., Cohen, P., Andjelkovich, M., & A.Hemmings, B. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378, 785–789.
- Cullough, K. D. M. C., Martindale, J. L., Klotz, L., Aw, T., & Holbrook, N. J. (2001). Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), 1249–1259.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, J. S., & Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381(6585), 800–803.

## D

- Dany, M., & Ogretmen, B. (2015). Ceramide induced mitophagy and tumor suppression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1853(1000), 2834–2845.
- de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., & Appelmans, F. (1955). Tissue Fractionation Studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, 60(4), 604–617.
- de Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of Lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 28, 435–492.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., ... Jin, S. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10(1), 51–64.
- Dejeans, N., Pluquet, O., Lhomond, S., Grise, F., Bouchecharilh, M., Juin, A., ... Chevet, E. (2010). Autocrine control of glioma cells adhesion and migration through IRE1a-mediated cleavage of SPARC mRNA. *Journal of Cell Science*, 125, 4278–4287.
- Denardo, D. G., Johansson, M., & Coussens, L. M. (2008). Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 27, 11–18.
- Denton, D., Nicolson, S., & Kumar, S. (2012). Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 87–95.
- Devlin, C. M., Lahm, T., Hubbard, W. C., Demark, M. Van, Wang, K. C., Wu, X., ... Petrache, I. (2011). Dihydroceramide-based Response to Hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38069–38078.
- Dillon, L. M., & Miller, T. W. (2014). Therapeutic targeting of cancers with loss of PTEN function. *Curr Drug Targets*, 15(1), 65–79.
- Ding, W., Ni, H., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D. B., Ron, D., & Yin, X. (2007). Linking of Autophagy to Ubiquitin-Proteasome System Is Important for the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Viability. *The American Journal of Pathology*, 171(2), 513–524.
- Djordjevic, S., & Driscoll, P. C. (2002). Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(8), 426–432.
- Dong, S., Xia, J., Wang, H., Sun, L. I., Wu, Z., Bin, J., ... Liao, W. (2016). Overexpression of TRIB3 promotes angiogenesis in human gastric cancer. *Oncology Reports*, 36, 2339–2348.
- Dreyling, M., Santoro, A., Mollica, L., Leppä, S., Follows, G.A., Lenz, G., ... Zinzani, P.L. (2017). Phosphatidylinositol 3-kinase Inhibition by Copanlisib in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *J Clin Oncol*, 35 (35), 3898–3905.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N., & Montminy, M. (2003). TRB3: A tribbles Homolog That Inhibits Akt/PKB Activation by Insulin in Liver. *Science*, 300, 1574–1578.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N., Montminy, M., Du, K., Herzig, S., ... Montminy, M. (2003). TRB3 : A Tribbles Homolog That Inhibits Akt/PKB Activation by Insulin in Liver. *Science*, 300(5625), 1574–1577.
- Duggan, S. P., Behan, F. M., Kirca, M., Smith, S., Reynolds, J. V, Long, A., & Kelleher, D. (2010). An integrative genomic approach in oesophageal cells identifies TRB3 as a bile acid responsive gene, downregulated in Barrett's oesophagus, which regulates NF- $\kappa$ B activation and cytokine levels. *Carcinogenesis*, 31(5), 936–945.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Dummer, R., Krasovec, M., Röger, J., Sindermann, H., & Burg, G. (1993). Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: Results of a phase I/II study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 29(6), 963–970.
- Dumontet, C., Thomas, L., Bérard, F., Gimonet, J.F., & Coiffier, B. (2006). A phase II trial of miltefosine in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Bull Cancer*, 93 (11), 115-118.

## E

---

- Eberhart, K., Oral, O., & Gozuacik, D. (2014). Induction of Autophagic Cell Death by Anticancer Agents. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* (Vol. 1, pp. 179–202). Elsevier Inc.
- Ebner, M., Lucic, I., Leonard, T. A., & Yudushkin, I. (2016). PI(3, 4, 5)P3 Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes. *Molecular Cell*, 65, 416–431.
- Ebner, M., Sinkovics, B., Szczygie, M., Ribeiro, D. W., & Yudushkin, I. (2017). Localization of mTORC2 activity inside cells. *Journal of Cell Biology*, 216(2), 343–353.
- Ebos, J. M. L., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. A., James, G., & Kerbel, R. S. (2009). Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. *Cancer Cell*, 15(3), 232–239.
- Egan, D. F., Kim, J., Shaw, R. J., & Guan, K. (2011). The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*, 7(6), 645–646.
- Egeblad, M., Nakasone, E. S., & Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell*, 18(6), 884–901.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H., & Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation*, 16(7), 966–975.
- Elrod, H. A., Lin, Y., Yue, P., Wang, X., Lonial, S., & Khuri, F. R. (2007). The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(7), 2029–2039.
- Eng, C. P., Sehgal, S. N., & Vezna, C. (1984). Activity of Rapamycin (AY-22, 989) Against Transplanted Tumors. *The Journal of Antibiotics*, XXXVII(10), 1231–1237.
- Erazo, T., Lorente, M., López-Plana, A., Muñoz-Guardiola, P., Fernández-Nogueira, P., García-Martínez, J. A., ... Lizcano, J. M. (2016). The New Antitumor Drug ABTL0812 Inhibits the Akt/mTORC1 Axis by Upregulating Tribbles-3 Pseudokinase. *Clinical Cancer Research*, 22(10), 2508–2519.
- Erguler, K., Pieri, M., & Deltas, C. (2013). A mathematical model of the unfolded protein stress response reveals the decision mechanism for recovery, adaptation and apoptosis. *BMC Systems Biology*, 7, 16.
- Escobedo, J. A., Navankasattusss, S., Kavanaugh, W. M., Milfay, D., Fried, V. A., & Williams, L. T. (1991). cDNA Cloning of a Novel 85 kd Protein That Has SH2 Domains and Regulates Binding of PI3-Kinase to the PDGF beta-Receptor. *Cell*, 65, 75–82.
- Eswaran, J., Patnaik, D., Filippakopoulos, P., Wang, F., Stein, R. L., Murray, J. W., ... Knapp, S. (2009). Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *PNAS*, 106(48), 20198–20203.
- Eyers, P. A. (2015). TRIBBLES : A Twist in the Pseudokinase Tail. *Structure*, 23(11), 1974–1976.

- Eyers, P. A., Keeshan, K., & Kannan, N. (2017). Tribbles in the 21st Century: The Evolving Roles of Tribbles Pseudokinases in Biology and Disease. *Trends in Cell Biology*, 27(4), 284–298.
- Eyers, P. A., & Murphy, J. M. (2013). Exploring Kinomes: Pseudokinases and Beyond Exploring Kinomes. Dawn of the dead: protein pseudokinases signal new adventures in cell biology. *Biochemical Society Transactions*, 41, 969–974.

## F

- Fabrias, G., Muñoz-olaya, J., Cingolani, F., Signorelli, P., Casas, J., Gagliostro, V., & Ghidoni, R. (2012). Dihydroceramide desaturase and dihydrosphingolipids: Debutant players in the sphingolipid arena. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 82–94.
- Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B., & Colombo, M. I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin : two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1793(12), 1901–1916.
- Fay, P., Rini, B. I., Kwiatkowski, D. J., Choueiri, T. K., Thorner, A. R., Velasco, G. De, ... Mcdermott, D. F. (2016). Mutations in TSC1 , TSC2 , and MTOR Are Associated with Response to Rapalogs in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 22(10), 2445–2453.
- Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Bartolomeo, S. Di, Nardacci, R., ... Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 447, 1121–1125.
- Fogarty, S., Hawley, S. A., Green, K. A., Saner, N., Mustard, K. J., & Hardie, D. G. (2010). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-  $\beta$  activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP. *Biochemical Journal*, 426, 109–118.
- Foster, F. M., Traer, C. J., Abraham, S. M., & Fry, J. (2003). The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *Journal of Cell Science*, 116(15), 3037–3040.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., & Cantley, L. C. (1997). PI3K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis. *Cell*, 88, 435–437.
- Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2006). mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Current Biology*, 16, 1865–1870.
- Fry, M. J. (2001). Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Research*, 3, 304–3012.
- Fujimoto, T., Onda, M., Nagai, H., Nagahata, T., & Ogawa, K. (2003). Upregulation and Overexpression of Human X-box Binding Protein 1 (hXBP-1) Gene in Primary Breast Cancers. *Breast Cancer*, 10(4), 301–306.
- Fukuda, K., Gupta, S., Chen, K., Wu, C., & Qin, J. (2009). The pseudo-active site of ILK is essential for its binding to alpha-parvin and localization to focal adhesion. *Molecular Cell*, 36(5), 819–830.
- Futerman, A. H., & Riezman, H. (2005). The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends in Cell Biology*, 15(6), 312–318.
- Futerman, H., Stieger, B., HubbardII, A. L., & Pagano, E. (1990). Sphingomyelin Synthesis in Rat Liver Occurs Predominantly at the cis and medial Cisternae of the Golgi Apparatus. *The Journal of Antibiotics*, 265(15), 8650–8657.



## BIBLIOGRAFIA

---

Futreal, P. A., Să, P., Marks, J. R., Iglehart, J. D., Cochran, C., Barrett, J. C., & Wiseman, R. W. (1992). Detection of Frequent Allelic Loss on Proximal Chromosome 17q in Sporadic Breast Carcinoma Using Microsatellite Length Polymorphisms. *Cancer Research*, *52*, 2624–2627.

## G

---

Gagliostro, V., Casas, J., Caretti, A., Abad, J. L., Tagliavacca, L., Ghidoni, R., ... Signorelli, P. (2012). Dihydroceramide delays cell cycle G1/S transition via activation of ER stress and induction of autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *44*(12), 2135–2143.

Gajate, C., Matos-da-Silva, M., Dakir, E., Fonteriz, R. I., Alvarez, J., & Mollinedo, F. (2012). Antitumor alkyllysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene*, *31*(21), 2627–2639.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaranson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2017). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, *25* (3), 486–541.

Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *The Journal of Antibiotics*, *284*(18), 12297–12305.

Gao, Y., Dai, Q., Wang, M., & Zhang, N. (2011). 3D model retrieval using weighted bipartite graph matching. *Signal Processing: Image Communication*, *26*(1), 39–47.

Garofalo, R. S., Orena, S. J., Rafidi, K., Torchia, A. J., Stock, J. L., Hildebrandt, A. L., ... Coleman, K. G. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB  $\beta$ . *The Journal of Clinical Investigation*, *112*(2), 197–208.

Geeraert, L., Mannaerts, G. P., & Veldhoven, P. P. V. A. N. (1997). Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochemical Journal*, *327*, 125–132.

Geng, J., & Klionsky, D. J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO Reports*, *9*(9), 859–864.

Gingras, A., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., ... Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes and Development*, *13*, 1422–1437.

Gingras, A., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, *68*, 913–963.

Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, *221*(1), 3–12.

Gopal, A. K., Kahl, B. S., de Vos, S., Wagner-johnston, N. D., Schuster, S. J., Flowers, C. R., ... Viardot, A. (2014). PI3K $\delta$  Inhibition by Idelalisib in Patients with Relapsed Indolent Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, *370*(11), 1008–1018.

Gouazé, V., Liu, Y., Prickett, C. S., Yu, J. Y., Giuliano, A. E., & Cabot, M. C. (2005). Glucosylceramide Synthase Blockade Down-Regulates P-Glycoprotein and Resensitizes Multidrug-Resistant Breast Cancer Cells to Anticancer Drugs. *Cancer Research*, *65*(9), 3861–3868.

Gozuacik, D., Bialik, S., Raveh, T., Mitou, G., Shohat, G., Sabanay, H., ... Kimchi, A. (2008). DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death and Differentiation*, *15*, 1875–1886.

- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., ... Douglas, F. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, *446*(7132), 153–158.
- Grobhans, J., & Wieschaus, E. (2000). A Genetic Link between Morphogenesis and Cell Division during Formation of the Ventral Furrow in *Drosophila*. *Cell*, *101*, 523–531.
- Guan, H., Shuaib, A., Leon, D. D. De, Angyal, A., Salazar, M., Velasco, G., ... Kiss-toth, E. (2016). Competition between members of the tribbles pseudokinase protein family shapes their interactions with mitogen activated protein kinase pathways. *Scientific Reports*, *6*, 32667.
- Guertin, D. A., & Sabatini, D. M. (2007). Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*, *12*(9–22).
- Guicciardi, M. E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S. F., Svingen, P. A., Peters, C., ... Gores, G. J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF- $\alpha$ -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest*, *106*(9), 1127–1137.
- Gump, J. M., & Thorburn, A. (2011). Autophagy and apoptosis- what's the connection? *Trends in Cell Biology*, *21*(7), 387–392.
- Guo, J. Y., Karsli-Uzunbas, G., Mathew, R., Aisner, S. C., Kamphorst, J. J., Strohecker, A. M., ... White, E. (2013). Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes and Development*, *27*, 1447–1461.
- Gupta, S., Ramjaun, A. R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P. H., Nicke, B., ... Downward, J. (2007). Binding of Ras to Phosphoinositide 3-Kinase p110 $\alpha$  Is Required for Ras-Driven Tumorigenesis in Mice. *Cell*, *129*, 957–968.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, *30*(2), 214–226.

## H

---

- Haar, E. Vander, Lee, S., Bandhakavi, S., Griffin, T. J., & Kim, D. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt / PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology*, *9*(3), 316–323. <https://doi.org/10.1038/ncb1547>
- Hailey, D. W., Kim, P. K., Satpute-krishnan, P., Rambold, A. S., Sougrat, R., & Lippincott-schwartz, J. (2010). mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, *141*(4), 656–667.
- Han, D., Lerner, A. G., Walle, L. Vande, Upton, J., Xu, W., Hagen, A., ... Ca, U. S. A. (2009). IRE1 $\alpha$  Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. *Cell*, *138*(3), 562–575.
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y., Gildersleeve, R., Shan, J., ... Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature Cell Biology*, *15*(5), 481–490.
- Hanada, K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *1632*, 16–30.
- Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., ... Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(52), 37298–37302.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674.
- Hanks, S.K., & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, *9* (8), 576-596.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q., Kozlowski, M. T., Belham, C., & Avruch, J. (1998). Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(23), 14484–14494.
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.-L., & Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, *181*(3), 497–510.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., & Ron, D. (2000). Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Molecular Cell*, *5*, 897–904.
- Harrington, L. S., Findlay, G. M., Gray, A., Tolkacheva, T., Rebholz, H., Barnett, J., ... Leslie, N. R. (2014). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of Cell Biology*, *166*(2), 213–223.
- Hawley, S. A., Ross, F. A., Gowans, G. J., Tibarewal, P., Leslie, N. R., & Hardie, D. G. (2014). Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- $\alpha$ 1 down-regulates its activation in tumour cells. *Biochemical Journal*, *459*, 275–287.
- Hayashi-nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., & Yoshimori, T. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature Cell Biology*, *11*(12), 1433–1437.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1999). Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology of the Cell*, *10*, 3787–3799.
- Hegedus, Z., Czibula, A., & Kiss-toth, E. (2006). Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cell Mol Life Sci*, *63*, 1632–1641.
- Hegedus, Z., Czibula, A., & Kiss-toth, E. (2007). Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cellular Signalling*, *19*, 238–250.
- Herman, P. K., & Emr, S. D. (1990). Characterization of VPS34, a Gene Required for Vacuolar Protein Sorting and Vacuole Segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(12), 6742–6754.
- Hernández-Tiedra, S., Fabriàs, G., Dávila, D., Salanueva, Í. J., Casas, J., Montes, L. R., ... Velasco, G. (2016). Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy*, *12*(11), 2213–2229.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Cell Biology*, *13*(2), 89–102.
- Hetz, C., Chevet, E., & Oakes, S. A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature Cell Biology*, *17*(7), 829–838.
- Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., & Glimcher, L. H. (2011). The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 $\alpha$ . *Physiol Rev*, *91*, 1219–1243.
- Hong, K., Luan, Q., Croft, A., Chen, C., Jin, L., Dong, X., & Tseng, H. (2014). Sustained IRE1 and ATF6 signaling is important for survival of melanoma cells undergoing ER stress. *Cellular Signalling*, *26*(2), 287–294.

- Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Woods, A., Schlattner, U., ... Rider, M. H. (2006). Insulin Antagonizes Ischemia-induced Thr172 Phosphorylation of AMP-activated Protein Kinase alpha-Subunits in Heart via Hierarchical Phosphorylation of Ser 485/491. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5335–5340.
- Hornbeck, P. V., Kornhauser, J. M., Tkachev, S., Zhang, B., Murray, B., Latham, V., ... Lane, T. (2012). PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Research*, 40, 261–270.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., ... Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1 – Atg13 – FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 1981–1991.
- Hoyer-Hansen, M., & Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death and Differentiation*, 14, 1576–1582.
- Hsieh, A., & Moasser, M. (2007). Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *British Journal of Cancer*, 97, 453–457.
- Hsu, P. P., Kang, S. A., Rameseder, J., Zhang, Y., Kathleen, A., Lim, D., ... Sabatini, D. M. (2011). The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*, 332(6035), 1317–1322.
- Hsu, S., Tseng, Y., Shrestha, S., Lin, Y., Khaleel, A., Chou, C., ... Ho, S. (2014). miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 42, 78–85.
- Hua, F., Mu, R., Liu, J., Xue, J., Wang, Z., Lin, H., ... Hu, Z. (2011). TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion. *Journal of Cell Science*, 124(19), 3235–3246.
- Huang, W., Chen, C., Lin, Y., & Lin, C. (2011). Apoptotic Sphingolipid Ceramide in Cancer Therapy. *Journal of Lipids*, 2011, 565316.
- Huber, A.-L., Lebeau, J., Guillaumot, P., Pétrilli, V., Malek, M., Kfoury, A., ... Manie, S. N. (2013). p85IPK-Mediated Attenuation of the Proapoptotic PERK-CHOP Pathway Allows Malignant Progression upon Low Glucose. *Molecular Cell*, 49, 1049–1059.
- Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., ... Motzer, R. J. (2007). Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 356(22), 2271–2281.
- Huitema, K., Van Den, J., & Holthuis, J. C. M. (2004). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *The EMBO Journal*, 23(1), 33–44.
- Humphrey, R. K., Ray, A., Gonuguntla, S., Hao, E., & Jhala, U. S. (2014). Loss of TRB3 Alters Dynamics of MLK3-JNK Signaling and Inhibits Cytokine-activated Pancreatic Beta Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(43), 29994–30004.
- Hyman, D. M., Smyth, L. M., Donoghue, M. T. A., Westin, S. N., Bedard, P. L., Emma, J., ... Taylor, B. S. (2017). AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 35(20), 2251–2259.

## BIBLIOGRAFIA

---

### I

---

- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., ... Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, *408*, 488–492.
- Idkowiak-baldys, J., Apraiz, A., Li, L., Rahmaniyan, M., Christopher, J., Kraveka, J. M., ... Hannun, Y. A. (2010). Dihydroceramide Desaturase Activity is Modulated by Oxidative Stress. *Biochemical Journal*, *427*(2), 265–274.
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., & Guan, K. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *The EMBO Journal*, *27*(14), 1919–1931.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, *4*, 648–657.
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell*, *115*, 577–590.
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell*, *19*, 5360–5372.
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, *6*(6), 764–776.
- Ito, H., Daido, S., Kanzawa, T., Kondo, S., & Kondo, Y. (2005). Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *International Journal of Oncology*, *26*, 1401–1410.
- Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T., & Fukuda, M. (2008). Golgi-resident Small GTPase Rab33B Interacts with Atg16L and Modulates Autophagosome Formation. *Molecular Biology of the Cell*, *19*, 2916–2925.
- Izrailit, J., Berman, H. K., Datti, A., Wrana, J. L., & Reedijk, M. (2013). High throughput kinase inhibitor screens reveal TRB3 and MAPK-ERK/TGF  $\beta$  pathways as fundamental Notch regulators in breast cancer. *PNAS*, *110*(5), 1714–1719.
- Izrailit, J., Jaiswal, A., Zheng, W., Moran, M. F., & Reedijk, M. (2016). Cellular stress induces TRB3/USP9x-dependent Notch activation in cancer. *Oncogene*, *36*(8), 1048–1057.

### J

---

- James, S. R., Downes, C. P., Gigg, R., Grove, S. J. A., Holmes, A. B., & Alessi, D. R. (1996). Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5- triphosphate without subsequent activation. *Biochemical Journal*, *315*, 709–713.
- J.Youle, R., & P.Narendra, D. (2016). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(1), 9–14.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rügge, M. A., Hall, A., & Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, *6*(11), 1122–1128.
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., & Saftig, P. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*, *117*(20), 4837–4848.

- Jain, B. P. (2017). An Overview of Unfolded Protein Response Signaling and Its Role in Cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 32(8), 275–281.
- Jaiswal, B. S., Janakiraman, V., Kljavin, N. M., Chaudhuri, S., Stern, H. M., Wang, W., ... Seshagiri, S. (2009). Article Somatic Mutations in p85 a Promote Tumorigenesis through Class IA PI3K Activation. *Cancer Cell*, 16(6), 463–474.
- Janku, F., Yap, T. A., & Meric-bernstam, F. (2018). Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(5), 273–291.
- Jeffries, T. R., Dove, S. K., Michell, R. H., & Parker, P. J. (2004). PtdIns-specific MPR Pathway Association of a Novel WD40 Repeat Protein, WIPI49. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 2652–2663.
- Jethwa, N., Chung, G. H. C., Lete, M. G., Alonso, A., Byrne, R. D., & Calleja, V. (2015). Endomembrane PtdIns (3, 4, 5) P3 activates the PI3K-Akt pathway. *Journal of Cell Science*, 128, 3456–3465.
- Jin, S. M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L. A., Narendra, D. P., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *Journal of Cell Biology*, 191(5), 933–942.
- Johnson, C. E., Hunt, D. K., Wiltshire, M., Herbert, T. P., Sampson, J. R., Errington, R. J., ... Tee, A. R. (2015). Endoplasmic reticulum stress and cell death in mTORC1-overactive cells is induced by nelfinavir and enhanced by chloroquine. *Molecular Oncology*, 9(3), 675–688.
- Johnson, D. A., Akamine, P., Radzio-andzelm, E., & Taylor, S. S. (2001). Dynamics of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Chem Rev*, 101, 2243–2270.
- Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F., & Hemmingst, B. A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *PNAS*, 88(10), 4171–4175.
- Jousse, C., Deval, C., Maurin, A., Parry, L., Che, Y., Lefloch, R., ... Fafournoux, P. (2007). TRB3 Inhibits the Transcriptional Activation of Stress-regulated Genes by a Negative Feedback on the ATF4 Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15851–15861.
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S., Kim, Y., Otto, N. M., Cao, J., ... Kim, D. (2009). ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 1992–2003.

## K

---

- Kabeya, Y., Kawamata, T., Suzuki, K., & Ohsumi, Y. (2007). Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356, 405–410.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., & Oshitani-okamoto, S. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2805–2812.
- Kagedal, K., Johansson, U., & Öllinger, K. (2001). The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *The FASEB Journal*, 15(9), 1592–1594.
- Kaidanovich-beilin, O., & Woodgett, J. R. (2011). GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4, 40.
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 392–401.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Kang, S., Denley, A., Vanhaesebroeck, B., & Vogt, P. K. (2006). Oncogenic transformation induced by the p110 beta , -gamma , and - delta isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase. *PNAS*, *103*(5), 1289–1294.
- Kanzawa, T., Germano, I. M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., & Kondo, S. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation*, *11*, 448–457.
- Kanzawa, T., Kondo, Y., Ito, H., Kondo, S., & Germano, I. (2003). Induction of Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells by Arsenic Trioxide. *Cancer Research*, *63*, 2103–2108.
- Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I. M., Kondo, Y., & Kondo, S. (2005). Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene*, *24*, 980–991.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., Timms, J., & Waterfield, M. D. (2001). Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *17*, 615–675.
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(8), 461–472. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm4024>
- Keeshan, K., Bailis, W., Dedhia, P. H., Vega, M. E., Shestova, O., Xu, L., ... Pear, W. S. (2010). Transformation by Tribbles homolog 2 (Trib2) requires both the Trib2 kinase domain and COP1 binding. *Blood*, *116*(23), 4948–4957.
- Keeshan, K., He, Y., Wouters, B. J., Shestova, O., Xu, L., Sai, H., ... Pear, W. S. (2006). Tribbles homolog 2 (Trib2) inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell*, *10*(5), 401–411.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001). Two Distinct Vps34 Phosphatidylinositol 3 – Kinase Complexes Function in Autophagy and Carboxypeptidase Y Sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, *152*(3), 519–530.
- Kilberg, M. S., Shan, J., & Su, N. (2009). ATF4-Dependent Transcription Mediates Signaling of Amino Acid Limitation. *Trends Endocrinol Metab*, *20*(9), 436–443.
- Kim, D., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V. P., Erdjument-bromage, H., ... Sabatini, D. M. (2003). GbetaL , a Positive Regulator of the Rapamycin- Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. *Molecular Cell*, *11*, 895–904.
- Kim, J., & Guan, K. (2011). Amino Acid Signaling in TOR Activation. *Annu Rev Biochem*, *80*, 1001–1032.
- Kim, K., Yu, S., Lee, S., Chun, S., Choi, Y., Park, Y., ... Ahn, S. (2011). Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *413*(1), 80–86.
- Kim, S., Hata, A., & Kang, H. (2014). Down-Regulation of miR-96 by Bone Morphogenetic Protein Signaling is Critical for Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Modulation. *J Cell Biochem*, *115*(5), 889–895.
- Kim, Y. C., & Guan, K. (2015). mTOR : a pharmacologic target for autophagy regulation. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(1), 25–32.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., ... Ohsumi, Y. (2000). The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8 / Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *The Journal of Cell Biology*, *151*(2), 263–275.
- Kirkin, V., Lamark, T., Johansen, T., & Dikic, I. (2009). NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy*, *5* (5), 732-733.

- Kiss-toth, E., Bagstaff, S. M., Sung, H. Y., Jozsa, V., Dempsey, C., Caunt, J. C., ... Dower, S. K. (2004). Human Tribbles , a Protein Family Controlling Mitogen-activated Protein Kinase Cascades. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42703–42708.
- Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 931–937.
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, J., Abeliovich, H., Bartolom, A., ... Bozhkov, P. V. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy ( 3rd edition ). *Autophagy*, 12(1), 1–222.
- Klionsky, D. J., & Ohsumi, Y. (1999). Vacuolar Import of Proteins and Organelles From the Cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 1–32.
- Klippel, A., Kavanaugh, W. M., Pot, D., & Williams, L. T. (1997). A Specific Product of Phosphatidylinositol 3-Kinase Directly Activates the Protein Kinase Akt through Its Pleckstrin Homology Domain. *Molecular and Cellular Biology*, 17(1), 338–344.
- Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. F. T. E. N., Ashford, V. A., Xuong, N., Taylor, S. S., & Sowadski, J. M. (1991). Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Science*, 253(5018), 407–414.
- Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. F. T. E. N., Xuong, N., Taylor, S. S., & Sowadski, J. M. (1991). Structure of a Peptide Inhibitor Bound to the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Science*, 253(5018), 414–420.
- Kok, K., Nock, G. E., Verrall, E. A. G., Mitchell, M. P., Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P., & Vanhaesebroeck, B. (2009). Regulation of p110delta PI 3-Kinase Gene Expression. *PLOS ONE*, 4(4), e5145.
- Kolesnick, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(1), 3–8.
- Kolter, T., & Sandhoff, K. (2005). Principles of Lysosomal Membrane Digestion: Stimulation of Sphingolipid Degradation by Sphingo-lipid Activator Proteins and Anionic Lysosomal Lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 81–103.
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., & Kondo, S. (2005). The Role of Autophagy in Cancer Development and Response to Therapy. *Nature Publishing Group*, 5, 726–734.
- Koo, S., Satoh, H., Herzig, S., Lee, C., Hedrick, S., Kulkarni, R., ... Montminy, M. (2004). PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-  $\alpha$  -dependent induction of TRB-3. *Nature Medicine*, 10(5), 530–535.
- Koong, A. C., Chauhan, V., Romero-ramirez, L., Koong, A. C., & Romero-ramirez, L. (2006). Targeting XBP-1 as a Novel Anti-Cancer Strategy. *Cancer Biol Ther*, 5(7), 756–759.
- Kovacina, K. S., Park, G. Y., Bae, S. S., Guzzetta, A. W., Schaefer, E., Birnbaum, M. J., & Roth, R. A. (2003). Identification of a Proline-rich Akt Substrate as a 14-3-3 Binding Partner. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10189–10195.
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., ... Matsuda, N. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, 510(7503), 162–166.
- Koybasi, S., Senkal, C. E., Sundararaj, K., Spassieva, S., Bielawski, J., Osta, W., ... Ogretmen, B. (2004). Defects in Cell Growth Regulation by C 18 : 0 -Ceramide and Longevity Assurance Gene 1 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44311–44319.



## BIBLIOGRAFIA

---

- Krick, R., Henke, S., Tolstrup, J., & Thumm, M. (2008). Dissecting the localization and function of Atg18, Atg21 and Ygr223c. *Autophagy*, 4(7), 896–910.
- Kroemer, G., & Jäätelä, M. (2005). Lysosomes and Autophagy in Cell Death Control. *Nature Publishing Group*, 5(11), 886–897.
- Kroemer, G., & Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 1004–1010.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2002). Formation of the 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 Multimeric Complex, Mediated by Apg16 Oligomerization, Is Essential for Autophagy in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18619–18625.
- Kumar, A., Fillmore, H. L., Kadian, R., Broaddus, W. C., Tye, G. W., & Meter, T. E. Van. (2009). The Alkylphospholipid Perifosine Induces Apoptosis and p21-Mediated Cell Cycle Arrest in Medulloblastoma. *Mol Cancer Res*, 7(11), 1813–1822.
- Kumar, C. C., & Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene*, 24(50), 7493–7501.
- Kunkel, M. T., Ni, Q., Tsien, R. Y., Zhang, J., & Newton, A. C. (2005). Spatio-temporal Dynamics of Protein Kinase B/Akt Signaling Revealed by a Genetically Encoded Fluorescent Reporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5581–5587.

## L

---

- Lahiri, S., & Futerman, A. H. (2007). The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci*, 64(17), 2270–2284. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7076-0>
- Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., Johansen, T., Lamark, T., Kirkin, V., ... Johansen, T. (2009). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle*, 8(13), 1986–1990.
- Lavie, Y., Cao, H., Bursten, S. L., Giuliano, A. E., & Cabot, M. C. (1996). Accumulation of Glucosylceramides in Multidrug-resistant Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19530–19536.
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Mermel, C. H., Garraway, L. A., Todd, R., Meyerson, M., ... Chase, C. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumor types. *Nature*, 505(7484), 495–501.
- Lazarou, M., Jin, S. M., Kane, L. A., & Youle, R. J. (2012). Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Developmental Cell*, 22(2), 320–333.
- Lee, A., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), 7448–7459.
- Lee, C. E., Kick, E. K., & Ellman, J. A. (1998). General Solid-Phase Synthesis Approach To Prepare Mechanism-Based Aspartyl Protease Inhibitor Libraries. Identification of Potent Cathepsin D Inhibitors. *J Am Chem Soc*, 120, 9735–9747.
- Lee, E., Nichols, P., Spicer, D., Groshen, S., Yu, M. C., & Lee, A. S. (2006). GRP78 as a Novel Predictor of Responsiveness to Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Research*, 66(16), 7849–7854.
- Lee, H., Rotolo, J. A., Mesicek, J., Penate-medina, T., Rimner, A., Yin, X., ... Kolesnick, R. (2011). Mitochondrial Ceramide-Rich Macrod domains Functionalize Bax upon Irradiation. *PLOS ONE*, 6(6), e19783.

- Lee, J., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y., ... Yao, T. (2010). HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO Journal*, *29*(5), 969–980.
- Lee, J., Yang, H., Georgescu, M., Cristofano, A. Di, Maehama, T., Shi, Y., ... Arbor, A. (1999). Crystal Structure of the PTEN Tumor Suppressor: Implications for Its Phosphoinositide Phosphatase Activity and Membrane Association. *Cell*, *99*, 323–334.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., ... Kaufman, R. J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes and Development*, *16*(4), 452–466.
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, *132*(1), 27–42.
- Levy, J. M. M., Towers, C. G., & Thorburn, A. (2017). Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *17*(9), 528–542. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.53>
- Li, A. C., & Palinski, W. (2006). PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS: How Their Effects on Macrophages Can Lead to the Development of a New Drug Therapy Against Atherosclerosis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *46*(1), 1–39.
- Li, J., Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., ... Parsons, R. (1997). PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science*, *275*(5308), 1943–1947.
- Li, T., Su, L., Zhong, N., Hao, X., Zhong, D., Singhal, S., & Liu, X. (2013). Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells. *Autophagy*, *9*(7), 1057–1068.
- Li, Y., Li, S., Qin, X., Hou, W., Dong, H., Yao, L., & Xiong, L. (2014). The pleiotropic roles of sphingolipid signaling in autophagy. *Cell Death and Disease*, *5*(5), e1245.
- Liang, C., Lee, J., Inn, K., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., ... Jung, J. U. (2008). Beclin 1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature Cell Biology*, *10*(7), 776–787.
- Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., ... Mills, G. B. (2007). The energy sensing LKB1 – AMPK pathway regulates p27 kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology*, *9*(2), 218–224.
- Liang, K. L., Connor, C. O., Veiga, J. P., McCarthy, T. V., & Keeshan, K. (2016). TRIB2 regulates normal and stress-induced thymocyte proliferation. *Cell Discovery*, *2*, 15050.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, *402*(6762), 672–676.
- Liew, C. W., Krolewski, A. S., Rohit, N., Liew, C. W., Bochenski, J., Kawamori, D., ... Leech, C. A. (2010). The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate insulin exocytosis in human and mouse b cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(8), 2876–2888.
- Liu, J., Wu, X., Franklin, J. L., Messina, J. L., Hill, H. S., Moellering, D. R., ... Garvey, W. T. (2010). Mammalian Tribbles homolog 3 impairs insulin action in skeletal muscle: role in glucose-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *298*(3), 565–576.
- Liu, J., Zhang, W., Chuang, G. C., Hill, H. S., Tian, L., Fu, Y., ... Physiol, A. J. (2012). Role of TRIB3 in regulation of insulin sensitivity and nutrient metabolism during short-term fasting and nutrient excess. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *303*(7), 908–917.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Liu, P., Gan, W., Chin, Y. R., Ogura, K., Guo, J., Wang, B., ... Wei, W. (2015). PtdIns(3,4,5)P3-dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov*, 5(11), 1194–1209.
- Lizcano, J. M., & Alessi, D. R. (2002). The insulin signalling pathway. *Current Biology*, 12(7), 236–238.
- Lizcano, J. M., Go, O., Deak, M., Morrice, N. A., Ma, T. P., & Alessi, D. R. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO Journal*, 23(4), 833–843.
- LLadó, V., Gutierrez, A., Martínez, J., Casas, J., Terés, S., Higuera, M., ... Escribá, P. V. (2010). Minerval induces apoptosis in Jurkat and other cancer cells. *J Cell Mol Med*, 14(3), 659–670.
- Lladó, V., Terés, S., Higuera, M., Álvarez, R., Noguera-Salva, M. A., Halver, J. E., ... Busquets, X. (2009). Pivotal role of dihydrofolate reductase knockdown in the anticancer activity of 2-hydroxyoleic acid. *PNAS*, 106(33), 13754–13758.
- Lock, R., Kenific, C. M., Leidal, A. M., Salas, E., & Debnath, J. (2014). Autophagy dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer Discov*, 4(4), 466–479.
- Lock, R., Roy, S., Kenifi, C. M., Su, J. S., Salas, E., Ronen, S. M., & Debnath, J. (2011). Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Molecular Biology of the Cell*, 22(2), 165–178.
- Lohan, F., & Keeshan, K. (2013). The functionally diverse roles of tribbles. *Biochemical Society Transactions*, 41(4), 1096–1100.
- Lu, Y., Muller, M., Smith, D., Dutta, B., Komurov, K., Iadevaia, S., ... Mills, G. B. (2011). Kinome siRNA-phosphoproteomic screen identifies networks regulating AKT signaling. *Oncogene*, 30(45), 4567–4577.
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (2005). Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell*, 120, 237–248.

## M

---

- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nature Reviews Cancer*, 4(12), 966–977.
- Maehama, T., & Dixon, J. E. (1998). The Tumor Suppressor , PTEN /MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13375–13378.
- Maggiora, G.M., & Shanmugasundaram, V. (2011). Molecular similarity measures. *Methods Mol Biol*, 672, 39-100.
- Mahadevan, N. R., Rodvold, J., Sepulveda, H., Rossi, S., Drew, A. F., & Zanetti, M. (2011). Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells. *PNAS*, 108(16), 6561–6566.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing : crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 741–752.
- Mann, M.J., & Hendershot, L.M. (2006). UPR activation alters chemosensitivity of tumor cells. *Cancer Biol Ther*, 5 (7), 736-740.
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274.

- Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J., & Cantley, L. C. (2002). Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase / Akt Pathway. *Molecular Cell*, *10*, 151–162.
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT / PKB Signaling : Navigating the Network. *Cell*, *169*(3), 381–405.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, *298*(5600), 1912–1934.
- Mao, Z., Sun, W., Xu, R., Novgorodov, S., Szulc, Z. M., Bielawski, J., ... Mao, C. (2010). Alkaline ceramidase 2 (ACER2) and its product dihydrosphingosine mediate the cytotoxicity of N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(38), 29078–29090.
- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., ... Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes and Development*, *18*, 3066–3077.
- Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D. J., & Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1005–1022.
- Mariño, G., Martins, I., & Kroemer, G. (2011). Autophagy in Ras-Induced Malignant Transformation : Fatal or Vital ? *Molecular Cell*, *42*(1), 1–3.
- Marone, R., Erhart, D., Mertz, A. C., Bohnacker, T., Schnell, C., Cmiljanovic, V., ... Wymann, M. P. (2009). Targeting Melanoma with Dual Phosphoinositide 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors. *Mol Cancer Res*, *7*(4), 601–614.
- Marqués, M., Kumar, A., Cortés, I., Gonzalez-García, A., Hernández, C., Moreno-Ortiz, M. C., & Carrera, A. C. (2008). Phosphoinositide 3-Kinases p110a and p110b Regulate Cell Cycle Entry , Exhibiting Distinct Activation Kinetics in G1 Phase. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(8), 2803–2814.
- Martin-berenjeno, I., & Vanhaesebroeck, B. (2009). PI3K Regulatory Subunits Lose Control in Cancer. *Cancer Cell*, *16*(6), 449–450.
- Martínez, J., Vögler, O., Casas, J., Barcel, F., Alemany, R., Prades, J., ... Escriba, P. V. (2005). Membrane Structure Modulation , Protein Kinase Ca Activation , and Anticancer Activity of Minerval. *Molecular Pharmacology*, *67*(2), 531–540.
- Mata, J., Curado, S., Ephrussi, A., & Rørth, P. (2000). Tribbles Coordinates Mitosis and Morphogenesis in Drosophila by Regulating String / CDC25 Proteolysis. *Cell*, *101*, 511–522.
- Mathew, R., Karp, C., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, H., Bray, K., ... White, E. (2009). Autophagy Suppresses Tumorigenesis Through Elimination of p62. *Cell*, *137*(6), 1062–1075.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C. M., Bray, K., Degenhardt, K., ... White, E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes and Development*, *21*, 1367–1381.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C. A., ... Hattori, N. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *Journal of Cell Biology*, *189*(2), 211–221.
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N. T., Isumi, T., ... Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *Journal of Cell Biology*, *190*(4), 511–521.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Matsushima, R., Harada, N., Webster, N. J. G., Tsutsumi, Y. M., & Nakaya, Y. (2006). Effect of TRB3 on Insulin and Nutrient-stimulated Hepatic p70 S6 Kinase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 29719–29729.
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., & Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 192, 245–250.
- Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q. L., Tsien, R. Y., & Reed, J. C. (2000). Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nature Cell Biology*, 2, 318–325.
- Mcquiston, A., & Diehl, J. A. (2017). Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum. *F1000Res*, 6, 1897.
- Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D. J., & Lemberg, M. K. (2011). The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *Journal of Neurochemistry*, 117, 856–867.
- Menaldino, D. S., Bushnev, A., Sun, A., Liotta, D. C., Symolon, H., Desai, K., ... Merrill, A. H. (2003). Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacological Research*, 47, 373–381.
- Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 320–328.
- Menon, S., Dibble, C. C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A. J., Takahashi, H., ... Manning, B. D. (2014). Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell*, 156(4), 771–785.
- Mercer, C. A., Kaliappan, A., & Dennis, P. B. (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, 5(5), 649–662.
- Mertins, P., Qiao, J. W., Patel, J., Udeshi, N. D., Clauser, K. R., Mani, D. R., ... Carr, S. A. (2013). Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nature Methods*, 10(7), 634–637.
- Michel, C., Echten-deckert, G. Van, Sandhoff, K., Wang, E., & Merrill, A. H. (1997). Characterization of Ceramide Synthesis: a dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22432–22437.
- Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7), 673–682.
- Miles, F. L., & Sikes, R. A. (2014). Insidious Changes in Stromal Matrix Fuel Cancer Progression. *Mol Cancer Res*, 12(3), 297–312.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Mimori, K., Takatsuno, Y., Kim, H., Hirose, H., ... Mori, M. (2009). Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis. *British Journal of Cancer*, 101(10), 1664–1670.
- Mizumura, K., Cloonan, S. M., Nakahira, K., Bhashyam, A. R., Cervo, M., Kitada, T., ... Choi, A. M. K. (2014). Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(9), 3987–4003.

- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell*, 147(4), 728–741.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., & Matsubae, M. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12- Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science*, 116(9), 1679–1688.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., & Kroemer, G. (2006). Apoptosis-inducing factor : vital and lethal. *Trends in Cell Biology*, 16(5), 264–272.
- Mothe-satney, I., Brunn, G. J., McMahon, L. P., Capaldo, C. T., Abraham, R. T., Lawrence, J. C., & Carolina, N. (2000). Mammalian Target of Rapamycin-dependent Phosphorylation of PHAS-I in Four (S/T)P Sites Detected by Phospho-specific Antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33836–33843.
- Mujcic, H., Nagelkerke, A., Rouschop, K. M. A., Chung, S., Chaudary, N., Span, P. N., ... Koritzinsky, M. (2013). Hypoxic Activation of the PERK/eIF2 $\alpha$  Arm of the Unfolded Protein Response Promotes Metastasis through Induction of LAMP3. *Clinical Cancer Research*, 19(22), 6126–6137.
- Muñoz-Olaya, J. M., Matabosch, X., Bedia, C., & Egidio-Gabás, M. (2008). Synthesis and Biological Activity of a Novel Inhibitor of Dihydroceramide Desaturase. *ChemMedChem*, 3, 946–953.
- Murphy, J. M., Nakatani, Y., Jamieson, S. A., Dai, W., Lucet, I. S., Mace, P. D., ... Mace, P. D. (2015). Molecular Mechanism of CCAAT-Enhancer Binding Protein Recruitment by the TRIB1 Pseudokinase. *Structure*, 23(11), 2111–2121.
- Murphy, J. M., Zhang, Q., Young, S. N., Reese, M. L., Bailey, F. P., Evers, P. A., ... Isabelle, S. (2014). A robust methodology to subclassify pseudokinases based on their nucleotide-binding properties. *Biochemical Journal*, 457(2), 323–334.
- Murray, M., Hraiki, A., Bebawy, M., Pazderka, C., & Rawling, T. (2015). Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. *Pharmacology and Therapeutics*, 150, 109–128.

## N

---

- Nair, U., Yen, W., Mari, M., Cao, Y., Xie, Z., Baba, M., ... Klionsky, D. J. (2012). A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 8(5), 780–793.
- Nakamura, S., & Yoshimori, T. (2017). New insights into autophagosome-lysosome fusion. *Journal of Cell Science*, 130, 1209–1216.
- Nam, H. Y., Han, M. W., Chang, H. W., Kim, S. Y., & Kim, S. W. (2013). Prolonged autophagy by MTOR inhibitor leads radioresistant cancer cells into senescence. *Autophagy*, 9(10), 1631–1632.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *Journal of Cell Biology*, 183(5), 795–803.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 220–228.
- Nieto-miguel, T., Fonteriz, R. I., Vay, L., Gajate, C., & Lo, S. (2007). Endoplasmic Reticulum Stress in the Proapoptotic Action of Edelfosine in Solid Tumor Cells. *Cancer Research*, 67(21), 10368–10379.
- Nikhil, K., Sharan, S., Singh, A. K., Chakraborty, A., & Roy, P. (2014). Anticancer Activities of Pterostilbene-Isothiocyanate Conjugate in Breast Cancer Cells: Involvement of PPAR $\gamma$ . *PLOS ONE*, 9(8), e104592.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Nilsson, C., Johansson, U., Johansson, A., Kägedal, K., & Öllinger, K. (2006). Cytosolic acidification and lysosomal alkalization during TNF-  $\alpha$  induced apoptosis in U937 cells. *Apoptosis*, *11*, 1149–1159.
- Noack, J., Choi, J., Richter, K., Kopp-Schneider, A., & Régnier-Vigouroux, A. (2014). A sphingosine kinase inhibitor combined with temozolomide induces glioblastoma cell death through accumulation of dihydrosphingosine and dihydroceramide, endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Death and Disease*, *5*, 1–12.
- Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., ... Thomas, G. (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *PNAS*, *102*(40), 14238–14243.
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., ... Yonezawa, K. (2003). The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Partner, Raptor, Binds the mTOR Substrates p70 S6 Kinase and 4E-BP1 through Their TOR Signaling ( TOS ) Motif. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(18), 15461–15464.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P., & Ron, D. (2001). Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34 -mediated Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *The Journal of Cell Biology*, *153*(5), 1011–1021.
- Novotny, C. J., Pollari, S., Park, J. H., Lemmon, M. A., Shen, W., & Shokat, K. M. (2016). Overcoming Resistance to HER2 Inhibitors Through State-Specific Kinase Binding. *Nat Chem Biol*, *12*(11), 923–930.

## O

---

- Oberkofler, H., Pfeifenberger, A., Soyal, S., Felder, T., & Hahne, P. (2010). Aberrant hepatic TRIB3 gene expression in insulin-resistant obese humans. *Diabetologia*, *58*(9), 1971–1975.
- Ocana, A., Vera-badillo, F., Seruga, B., Templeton, A., Pandiella, A., & Amir, E. (2013). HER3 Overexpression and Survival in Solid Tumors : A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, *105*(4), 266–273.
- Ogretmen, B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nature Reviews Cancer*, *18*(1), 33–50.
- Ogretmen, B., & Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Cancer*, *4*, 604–616.
- Ohoka, N., Sakai, S., Onozaki, K., Nakanishi, M., & Hayashi, H. (2010). Anaphase-promoting complex/cyclosome-cdh1 mediates the ubiquitination and degradation of TRB3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *392*(3), 289–294.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., & Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO Journal*, *24*(6), 1243–1255.
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*, 211–216.
- Okamoto, H., Latres, E., Liu, R., Thabet, K., Murphy, A., Valenzeula, D., ... Sleeman, M. W. (2007). Genetic Deletion of Trb3, the Mammalian Drosophila tribbles Homolog , Displays Normal Hepatic Insulin Signaling and Glucose Homeostasis. *Diabetes*, *56*, 1350–1356.
- Okkenhaug, K., Bilancio, A., Fargot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., ... Vanhaesebroeck, B. (2002). Impaired B and T Cell Antigen Receptor Signaling in p110 $\delta$  PI 3-Kinase Mutant Mice. *Science*, *297*(5583), 1031–1034.

- Omae, F., Miyazaki, M., Enomoto, A., Suzuki, M., Suzuki, Y., & Suzuki, A. (2004). DES2 protein is responsible for phytoceramide biosynthesis in the mouse small intestine. *Biochemical Journal*, *379*, 687–695.
- Onodera, J., & Ohsumi, Y. (2005). Autophagy Is Required for Maintenance of Amino Acid Levels and Protein Synthesis under Nitrogen Starvation. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(36), 31582–31586.
- Opipari, A. W., Tan, L., Boitano, A. E., Sorenson, D. R., Aurora, A., & Liu, J. R. (2004). Resveratrol-induced Autophagocytosis in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research*, *64*(2), 696–703.
- Örd, D., & Örd, T. (2005). Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *330*, 210–218.
- Örd, D. (2008). Studies on the stress-inducible pseudokinase TRB3, a novel inhibitor of transcription factor ATF4. Doctoral dissertation, Department of Molecular Biology, University of Tartu, Tartu, Estonia.
- Örd, T. (2016). *Functions and regulation of the mammalian pseudokinase TRIB3*. Doctoral dissertation, Department of Molecular Biology, University of Tartu, Tartu, Estonia.
- Örd, T., Innos, J., Lilleväli, K., Tekko, T., Sütt, S., Örd, D., ... Örd, T. (2014). Trib3 Is Developmentally and Nutritionally Regulated in the Brain but Is Dispensable for Spatial Memory , Fear Conditioning and Sensing of Amino Acid-Imbalanced Diet. *PLOS ONE*, *9*(4), e94691.
- Örd, T., & Örd, T. (2017). Mammalian Pseudokinase TRIB3 in Normal Physiology and Disease: Charting the Progress in Old and New Avenues. *Current Protein and Peptide Science*, *18*(8), 819–842.
- Orenstein, S. J., & Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol*, *21*(7), 719–726.
- Orimo, A., & Weinberg, R.A. (2007). Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. *Cancer Biol Ther*, *6* (4), 618-619.
- Osowski, C. M., & Urano, F. (2013). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in Enzymology*, *490*(508), 71–92.
- Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M. J., Ruiz-Iarrea, F., Panayotou, G., ... Waterfield, M. D. (1991). Characterization of Two 85 kd Proteins That Associate with Receptor Tyrosine Kinases , Middle-T / pp60c-src Complexes , and PI3-Kinase. *Cell*, *65*, 91–104.
- Overloop, H. Van, Gijsbers, S., & Veldhoven, P. P. Van. (2006). Further characterization of mammalian ceramide kinase : substrate delivery and (stereo) specificity , tissue distribution , and subcellular localization studies. *JLR*, *47*, 268–283.

## P

---

- Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., ... Yahalom, J. (2001). A Novel Response of Cancer Cells to Radiation Involves Autophagy and Formation of Acidic Vesicles. *Cancer Research*, *61*(2), 439–444.
- Parkhitko, A., Myachina, F., Morrison, T. A., Hindi, K. M., Auricchio, N., Karbowiczek, M., ... Henske, E. P. (2011). Tumorigenesis in tuberous sclerosis complex is autophagy and p62/sequestosome 1 (SQSTM1)-dependent. *PNAS*, *108*(30), 12455–12460.



## BIBLIOGRAFIA

---

- Parmar, J. H., Cook, K. L., Shajahan-haq, A. N., Clarke, P. A. G., Tavassoly, I., Clarke, R., ... Baumann, W. T. (2013). Modelling the effect of GRP78 on anti-oestrogen sensitivity and resistance in breast cancer. *Interface Focus*, 3(4), 20130012.
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473.
- Pasquale, E. B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 165–180.
- Pattingre, S., Bauvy, C., Carpentier, S., Levade, T., Levine, B., & Codogno, P. (2009). Role of JNK1-dependent Bcl-2 Phosphorylation in Ceramide-induced Macroautophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 2719–2728.
- Pearce, L. R., Huang, X., Boudeau, J., Pawlowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., ... Alessi, D. R. (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochemical Journal*, 405, 513–522.
- Pereira, E. R., Liao, N., Neale, G. A., & Hendershot, L. M. (2010). Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of Proangiogenic Factors by the Unfolded Protein Response. *PLOS ONE*, 5(9), e12521.
- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., ... Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR Inhibitor Whose Frequent Overexpression in Multiple Myeloma Cells Promotes their Survival. *Cell*, 137(5), 873–886.
- Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Seong, A., Balderas, E., ... Sabatini, D. M. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146(3), 408–420.
- Pewzner-Jung, Y., Ben-Dor, S., & Futerman, A. H. (2006). When Do Lasses (Longevity Assurance Genes) Become CerS (Ceramide Synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25001–25005.
- Plitzko, B., Ott, G., Reichmann, D., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Mendel, R., ... Havemeyer, A. (2013). The Involvement of Mitochondrial Amidoxime Reducing Components 1 and 2 and Mitochondrial Cytochrome b 5 in N-Reductive Metabolism in Human Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20228–20237.
- Polson, H. E. J., Lartigue, J. De, Rigden, D. J., Reedijk, M., Clague, M. J., Tooze, S. A., ... Clague, M. J. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, 6(4), 506–522.
- Ponnusamy, S., Meyers-needham, M., Senkal, C. E., Sahar, A., & Ogretmen, B. (2010). Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol*, 6(10), 1603–1624.
- Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., ... Schulze, A. (2008). SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth. *Cell Metabolism*, 8, 224–236.
- Prior, I. A., & Clague, M. J. (1999). Localization of a Class II Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3KC2a, to Clathrin-Coated Vesicles. *Molecular Cell Biology Research Communications*, 1(2), 162–166.
- Prudente, S., Sesti, G., Pandolfi, A., Andreozzi, F., Consoli, A., Trischitta, V., ... Nonsynonymous, B. (2012). Homeostasis, and Cardiovascular Diseases. *Endocrine Reviews*, 33(4), 1–21.
- Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N., & Luciano, F. (2010). Resveratrol Promotes Autophagic Cell Death in Chronic Myelogenous Leukemia Cells via JNK-Mediated p62/SQSTM1 Expression and AMPK Activation. *Cancer Research*, 70(3), 1042–1053.

## Q

- Qian, B., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141(1), 39–51.
- Qiao, Y., Zhang, Y., & Wang, J. (2013). Ubiquitin E3 ligase SCF b -TRCP regulates TRIB2 stability in liver cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(3), 555–559.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., ... Levine, B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1809–1820.

## R

- Rabinowitz, J. D., & White, E. (2010). Autophagy and Metabolism. *Science*, 330(6009), 1344–1348.
- Raftopoulou, M., Etienne-Manneville, S., Self, A., Nicholls, S., & Hall, A. (2004). Regulation of Cell Migration by the C2 Domain of the Tumor Suppressor PTEN. *Science*, 303, 1179–1181.
- Rameh, L. E., & Cantley, L. C. (1999). The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 8347–8350.
- Ranganathan, A. C., Zhang, L., Adam, A. P., & Aguirre-ghiso, J. A. (2006). Functional Coupling of p38-Induced Up-regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 66(3), 1702–1711.
- Rao, R. P., Vaidyanathan, N., Rengasamy, M., Oommen, A. M., Somaiya, N., & Jagannath, M. R. (2013). Sphingolipid Metabolic Pathway : An Overview of Major Roles Played in Human Diseases. *Journal of Lipids*, 2013, 178910.
- Rasmussen, K. D., Jia, G., Johansen, J. V., Pedersen, M. T., Rapin, N., Bagger, F. O., ... Helin, K. (2015). Loss of TET2 in hematopoietic cells leads to DNA hypermethylation of active enhancers and induction of leukemogenesis. *Genes and Development*, 29, 910–922.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., & David, C. (2010). Europe PMC Funders Group Plasma membrane contributes to the formation of pre- autophagosomal structures. *Nature Cell Biology*, 12(8), 747–757.
- Reddy, R. K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R. C., Kaufman, R. J., & Lee, A. S. (2003). Endoplasmic Reticulum Chaperone Protein GRP78 Protects Cells from Apoptosis Induced by Topoisomerase Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 20915–20924.
- Reggiori, F., Tucker, K. A., Stromhaug, P. E., Klionsky, D. J., & Arbor, A. (2004). The Atg1-Atg13 Complex Regulates Atg9 and Atg23 Retrieval Transport from the Pre-Autophagosomal Structure. *Developmental Cell*, 6, 79–90.
- Reiterer, V., Eysers, P. A., & Farhan, H. (2014). Day of the dead: pseudokinases and pseudophosphatases in physiology and disease. *Trends in Cell Biology*, 24(9), 489–505.
- Robitaille, A. M., Christen, S., Shimobayashi, M., Cornu, M., Fava, L. L., Moes, S., ... Hall, M. N. (2013). Quantitative Phosphoproteomics Reveal mTORC1 Activates de Novo Pyrimidine Synthesis. *Science*, 339, 1320–1324.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Rodon, J., Dienstmann, R., Serra, V., & Tabernero, J. (2013). Development of PI3K inhibitors : lessons learned from early clinical trials. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *10*(3), 143–153.
- Rodriguez-cuenca, S., Barbarroja, N., & Vidal-puig, A. (2015). *Biochimica et Biophysica Acta Dihydroceramide desaturase 1 , the gatekeeper of ceramide induced lipotoxicity* ☆. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.021>
- Rodriguez-Viciano, P., Sabatier, C., & McCormick, F. (2004). Signaling Specificity by Ras Family GTPases Is Determined by the Full Spectrum of Effectors They Regulate. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(11), 4943–4954.
- Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T., & Kirkin, V. (2014). Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy. *Molecular Cell*, *53*, 167–178.
- Röthlisberger, B., Heizmann, M., Bargetzi, M. J., & Huber, A. R. (2007). TRIB1 overexpression in acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *176*, 58–60.
- Rouschop, K. M. A., & Wouters, B. G. (2009). Regulation of Autophagy Through Multiple Independent Hypoxic Signaling Pathways. *Current Molecular Medicine*, *9*, 417–424.
- Rovito, D., Giordano, C., Vizza, D., Plastina, P., Barone, I., Casaburi, I., ... Andò, S. (2013). Omega-3 PUFA ethanalamides DHEA and EPEA induce autophagy through PPAR $\gamma$  activation in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, *228*(6), 1314–1322.
- Rubinstein, A. D., & Kimchi, A. (2012). Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Journal of Cell Science*, *125*, 5259–5268.
- Rutkowski, D. T., Arnold, S. M., Miller, C. N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K. M., ... Kaufman, R. J. (2006). Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins. *PLoS Biology*, *4*(11), 2024–2041.
- Ruvolo, P. P., Deng, X., Ito, T., Carr, B. K., May, W. S., Ruvolo, P. P. A., ... Chem, J. B. (1999). Ceramide Induces Bcl2 Dephosphorylation via a Mechanism Involving Mitochondrial PP2A. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(29), 20296–20300.
- Ryland, L. K., Fox, T. E., Liu, X., Loughran, T. P., Kester, M., Ryland, L. K., ... Kester, M. (2011). Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biology and Therapy*, *11*(2), 138–149.
- Rzymiski, T., Paantjens, A., Bod, J., & Harris, A. L. (2008). Multiple pathways are involved in the anoxia response of SKIP3 including HuR-regulated RNA stability , NF- $\kappa$ B and ATF4. *Oncogene*, *27*, 4532–4543.

## S

---

- Sabatini, D. M., Erdjument-bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994). RAFTI: A Mammalian Protein That Binds to FKBP12 in a Rapamycin-Dependent Fashion and Is Homologous to Yeast TORs. *Cell*, *78*, 35–43.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, Í. J., Hernández-tiedra, S., Egia, A., Lorente, M., ... Velasco, G. (2009). TRB3 links ER stress to autophagy in cannabinoid anti-tumoral action. *Autophagy*, *5*(7), 1048–1049.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, Í. J., Hernández-tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., ... Velasco, G. (2009). Cannabinoid action induces autophagy- mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(5), 1359–1372.

- Salazar, M., Lorente, M., García-taboada, E., Hernández-tiedra, S., Davila, D., Francis, S. E., ... Velasco, G. (2013). The pseudokinase tribbles homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *1831*(10), 1573–1578.
- Salazar, M., Lorente, M., García-Taboada, E., Pérez-Gómez, E., Dávila, D., Zúñiga-García, P., ... Rodríguez, A. (2015). Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation. *Cell Death and Differentiation*, *22*, 131–144.
- Samadder, P., & Arthur, G. (1999). Decreased Sensitivity to 1- O -Octadecyl-2- O -methyl-glycerophosphocholine in MCF-7 Cells Adapted for Serum-free Growth Correlates with Constitutive Association of Raf-1 with Cellular Membranes. *Cancer Research*, *59*, 4808–4815.
- Samsel, L., Zaidel, G., Drumgoole, H. M., Jelovac, D., Drachenberg, C., Rhee, J. G., ... Smyth, M. J. (2004). The Ceramide Analog , B13, Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cell Lines and Inhibits Tumor Growth in Prostate Cancer Xenografts. *The Prostate*, *58*, 382–393.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., ... Velculescu, V. E. (2004). High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*, *304*.
- Sancak, Y., Bar-peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., & Sabatini, D. M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, *141*(2), 290–303.
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., ... Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell*, *25*, 903–915.
- Sanden, M. H. M. Van der, Houweling, M., Golde, L. M. G. van, & Vaandrager, A. B. (2003). Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochemical Journal*, *369*, 643–650.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-bromage, H., ... Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. *Current Biology*, *14*, 1296–1302.
- Sarraf, S. A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M. E., Edward, L., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature Reviews Cancer*, *496*(7445), 372–376.
- Saucedo, L. J., Gao, X., Chiarelli, D. A., Li, L., Pan, D., & Edgar, B. A. (2003). Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nature Cell Biology*, *5*(6), 566–571.
- Savile, C. K., Fabria, G., & Buist, P. H. (2001). Dihydroceramide  $\Delta$  4 Desaturase Initiates Substrate Oxidation at C-4. *J Am Chem Soc*, *123*, 4382–4385.
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960–976.
- Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventrucci, A., Sala, G., Vandewalle, A., Ghidoni, R., & Codogno, P. (2004). Ceramide-mediated Macroautophagy Involves Inhibition of Protein Kinase B and Up-regulation of Beclin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 18384–18391.
- Schäfer, M., & Werner, S. (2008). Cancer as an overheating wound: an old hypothesis revisited. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*, 628–638.
- Scheeff, E. D., Eswaran, J., Bunkoczi, G., Knapp, S., & Manning, G. (2009). Structure of the Pseudokinase VRK3 Reveals a Degraded Catalytic Site , a Highly Conserved Kinase Fold, and a Putative Regulatory Binding Site. *Structure*, *17*, 128–138.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Schonthal, A. H. (2012). Targeting endoplasmic reticulum stress for cancer therapy. *Frontiers in Biosciences*, (1), 412–431.
- Schubert, K. M., Scheid, M. P., & Duronio, V. (2000). Ceramide Inhibits Protein Kinase B/Akt by Promoting Dephosphorylation of Serine 473. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13330–13335.
- Schulze, H., & Sandhoff, K. (2011). Lysosomal Lipid Storage Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(6).
- Ségui, B., Andrieu-abadie, N., Jaffrézou, J., Benoist, H., & Levade, T. (2006). Sphingolipids as modulators of cancer cell death: Potential therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1758, 2104–2120.
- Senchenkov, A., Litvak, D. A., & Cabot, M. C. (2001). Targeting Ceramide Metabolism - a Strategy for Overcoming Drug Resistance. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(5), 347–357.
- Sentelle, R. D., Senkal, C. E., Jiang, W., Ponnusamy, S., Lemasters, J. J., Szulc, Z. M., ... Ogretmen, B. (2012). Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat Chem Biol*, 8(10), 831–838.
- Shang, L., Chen, S., Du, F., Li, S., Zhao, L., & Wang, X. (2011). Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *PNAS*, 108(12), 4788–4793.
- Sharova, L. V., Sharov, A. A., Nedorezov, T., Iao, Yulan PShaik, N., & Minoru, S. H. K. (2009). Database for mRNA Half-Life of 19 977 Genes Obtained by DNA Microarray Analysis of Pluripotent and Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *DNA Research*, 16, 45–58.
- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., Depinho, R. A., & Cantley, L. C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *PNAS*, 101(10), 3329–3335.
- Shen, B., Chu, E. S. H., Zhao, G., Man, K., Wu, C. W., Cheng, J. T. Y., ... Yu, J. (2012). PPARgamma inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. *British Journal of Cancer*, 106(9), 1486–1494.
- Shen, R. R., Zhou, A. Y., Kim, E., Beroukhim, R., & Hahn, W. C. (2015). TRAF2 is an NF-kB activating oncogene in epithelial cancers. *Oncogene*, 34(2), 209–216.
- Shen, S., Kepp, O., Michaud, M., Martins, I., Minoux, H., Métivier, D., ... Kroemer, G. (2011). Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene*, 30, 4544–4556.
- Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., & Takahashi, H. (2015). Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers*, 7, 2443–2458.
- Shimizu, K., Takahama, S., Endo, Y., & Sawasaki, T. (2012). Stress-Inducible Caspase Substrate TRB3 Promotes Nuclear Translocation of Pro-caspase-3. *PLOS ONE*, 7(8), e42721.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-kobayashi, S., Thompson, C. B., & Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology*, 6(12), 1221–1228.
- Shlevkov, E., & Schwarz, T. L. (2014). For Parkin, it's not all or nothing. *The EMBO Journal*, 33(4), 277–279.
- Shuda, M., Kondoh, N., Imazeki, N., Tanaka, K., Okada, T., Mori, K., ... Yamamoto, M. (2003). Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology*, 38, 605–614.
- Shudler, M., & Niv, M. Y. (2009). BlockMaster : Partitioning Protein Kinase Structures Using Normal-Mode Analysis. *J Phys Chem*, 113, 7528–7534.

- Siddique, M. M., Bikman, B. T., Wang, L., Ying, L., Reinhardt, E., Shui, G., ... Summers, S. A. (2012). Ablation of Dihydroceramide Desaturase Confers Resistance to Etoposide-Induced Apoptosis In Vitro. *PLOS ONE*, 7(9), e44042.
- Siddique, M. M., Li, Y., Chaurasia, B., Kaddai, V. A., & Summers, S. A. (2015). Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(25), 15371–15379.
- Siddique, M. M., Li, Y., Wang, L., Ching, J., Mal, M., Ilkayeva, O., ... Bay, H. (2013). Ablation of Dihydroceramide Desaturase 1, a Therapeutic Target for the Treatment of Metabolic Diseases, Simultaneously Stimulates Anabolic and Catabolic Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 33(11), 2353–2369.
- Signorelli, P., Munoz-olaya, J. M., Gagliostro, V., Casas, J., Ghidoni, R., & Fabriàs, G. (2009). Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells. *Cancer Letters*, 282(2), 238–243.
- Sithanandam, G., & Anderson, L. (2008). The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 15(7), 413–448.
- Skolnik, E. Y., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fischer, R., Drepps, A., & Schlessinger, J. (1991). Cloning of PI3 Kinase-Associated p85 Utilizing a Novel Method for Expression/Cloning of Target Proteins for Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, 65, 83–90.
- Slessareva, J. E., Routt, S. M., Temple, B., Bankaitis, V. A., & Dohlman, H. G. (2006). Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Vps34 by a G Protein alpha Subunit at the Endosome. *Cell*, 126, 191–203.
- Smith, J. R., Moreno, L., Heaton, S. P., Chesler, L., Pearson, A. D. J., & Garrett, M. D. (2016). Novel pharmacodynamic biomarkers for MYCN protein and PI3K/AKT/mTOR pathway signaling in children with neuroblastoma. *Molecular Oncology*, 10(4), 538–552.
- Smith, M., & Wilkinson, S. (2017). ER homeostasis and autophagy. *Essays Biochem*, 61, 625–635.
- Smith, S. M., Moran, A. P., Duggan, S. P., Ahmed, S. E., Mohamed, A. S., Henry, J., ... Kelleher, D. P. (2011). Tribbles 3: A Novel Regulator of TLR2-Mediated Signaling in Response to Helicobacter pylori Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 186(4), 2462–2471.
- Smorenburg, C. H., Seynaeve, C., Bontenbal, M., Planting, A., Sindermann, H., & Verweij, J. (2000). Clinical report Phase II study of miltefosine 6 % solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anti-Cancer Drugs*, 11, 825–828.
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C. M., & Ellisen, L. W. (2005). Regulation of mTOR and Cell Growth in Response to Energy Stress by REDD1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 5834–5845.
- Song, M. S., Salmena, L., & Pandolfi, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), 283–296.
- Spiegel, S., & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 397–407.
- Sprong, H., Kruihof, B., Leijendekker, R., Slot, J. W., Meer, G. Van, & Sluijs, P. Van Der. (1998). UDP-Galactose:Ceramide Galactosyltransferase Is a Class I Integral Membrane Protein of the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25880–25888.
- Stambolic, V., Suzuki, A., Pompa, L. De, Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., ... Penninger, J. M. (1998). Negative Regulation of PKB/Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN. *Cell*, 95, 29–39.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Steck, A. P., A.Pershouse, M., A.Jasser, S., Yung, W. K. A., Lin, H., H.Ligon, A., ... V.Tavtigian, S. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Publishing Group*, 15, 356–362.
- Steichen, J. M., Iyer, G. H., Li, S., Saldanha, S. A., Deal, M. S., Woods, V. L., & Taylor, S. S. (2010). Global Consequences of Activation Loop Phosphorylation on Protein Kinase A. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 3825–3832.
- Stiban, J., Fistere, D., & Colombini, M. (2006). Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. *Apoptosis*, 11(5), 773–780.
- Stocker, H., Radimerski, T., Schindelholz, B., Wittwer, F., Belawat, P., Daram, P., ... Hafen, E. (2003). Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nature Cell Biology*, 5(6), 559–565.
- Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R. J., Reese, C. B., Painter, G. F., ... Hawkins, P. T. (1997). Dual Role of Phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate in the Activation of Protein Kinase B. *Science*, 277(5325), 567–570.
- Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology*, 16(6), 495–501.
- Stuelten, C. H., Byfield, S. D., Arany, P. R., Karpova, T. S., Stetler-stevenson, W. G., & Roberts, A. B. (2005). Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . *Journal of Cell Science*, 118(10), 2143–2153.
- Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W., & Kalluri, R. (2006). Identification of Fibroblast Heterogeneity in the Tumor Microenvironment. *Cancer Biology and Therapy*, 5(12), 1640–1646.
- Suire, S., Condliffe, A. M., Ferguson, G. J., Ellson, C. D., Guillou, H., Davidson, K., ... Stephens, L. (2006). G $\beta$  $\gamma$ s and the Ras binding domain of p110 $\gamma$  are both important regulators of PI(3)K $\gamma$  signalling in neutrophils. *Nature Cell Biology*, 8(11), 1303–1309.

## T

---

- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sato, Y., Liang, C., ... Wang, H. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1142–1151.
- Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T. E., Kester, M., ... Wang, H. (2011). Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*, 7(1), 61–73.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in Yeast Demonstrated with Proteinase-deficient Mutants and Conditions for its Induction. *The Journal of Cell Biology*, 119(2), 301–311.
- Tang, B., Wu, W., Zhang, Q., Sun, Y., Cui, Y., Wu, F., & Wei, X. (2015). Inhibition of tribbles protein-1 attenuates radioresistance in human glioma cells. *Scientific Reports*, 5, 15961.
- Tani, M., Iida, H., & Ito, M. (2003). O -Glycosylation of Mucin-like Domain Retains the Neutral Ceramidase on the Plasma Membranes as a Type II Integral Membrane Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10523–10530.

- Tardy, C., Codogno, P., Autefage, H., Levade, T., & Andrieu-abadie, N. (2006). Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1765, 101–125.
- Taylor, S. S., Keshwani, M. M., Steichen, J. M., & Alexandr, P. (2012). Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 367, 2517–2528.
- Tenen, D. G. (2003). DISRUPTION OF DIFFERENTIATION IN HUMAN CANCER : AML SHOWS. *Nature Publishing Group*, 3, 89–101.
- Terés, S., Lladó, V., Higuera, M., Barceló-Coblijn, G., Martin, M. L., Noguera-Salva, M. A., ... Escriba, P. V. (2012). 2-Hydroxyoleate, a nontoxic membrane binding anticancer drug, induces glioma cell differentiation and autophagy. *PNAS*, 109(22), 8489–8494.
- Terman, A., Gustafsson, B., & Brunk, U. T. (2006). The lysosomal – mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. *Chemico-Biological Interactions*, 163, 29–37.
- Terwogt, J. M. M., Mandjes, I. A. M., Sindermann, H., Beijnen, J. H., & Huinink, B. (1999). Phase II trial of topically applied miltefosine solution in patients with skin-metastasized breast cancer. *British Journal of Cancer*, 79(7/8), 1158–1161.
- Testai, F. D., Kilkus, J. P., Berdyshev, E., Gorshkova, I., & Dawson, G. (2015). Multiple sphingolipid abnormalities following cerebral microendothelial hypoxia. *J Neurochem*, 131(4), 530–540.
- Tettamanti, G., Bassi, R., Viani, P., & Riboni, L. (2003). Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie*, 85, 423–437.
- Thomas, G. S., Zhang, L., Blackwell, K., & Habelhah, H. (2010). Phosphorylation of TRAF2 within its RING domain inhibits stress-induced cell death by promoting IKK and suppressing JNK activation. *Cancer Research*, 69(8), 3665–3672.
- Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., & Kaufman, R. J. (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes and Development*, 14, 2725–2736. <https://doi.org/10.1101/gad.839400.transcriptional>
- Tirasophon, W., Welihinda, A. A., & Kaufman, R. J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase / endoribonuclease ( Ire1p ) in mammalian cells. *Genes and Development*, 12, 1812–1824.
- Triola, G., Fabria, G., & Llebaria, A. (2003). Synthesis of a Cyclopropene Analogue of Ceramide , a Potent Inhibitor. *J. Org. Chem.*, 68(26), 9924–9932.
- Tsaytler, P., Harding, H. P., Ron, D., & Bertolotti, A. (2011). Selective Inhibition of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Restores Proteostasis. *Science*, 332, 91–95.
- Tschopp, O., Yang, Z., Brodbeck, D., Dummler, B. A., Hemmings-mieszczak, M., Watanabe, T., ... Hemmings, B. A. (2005). Essential role of protein kinase By (PKBy/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*, 132, 2943–2954.
- Tsigelny, I., Greenberg, J. P., Cox, S., Nichols, W. L., Taylor, S. S., & Eyck, L. F. Ten. (1999). 600 ps Molecular Dynamics Reveals Stable Substructures and Flexible Hinge Points in cAMP Dependent Protein. *Biopolymers*, 50, 513–524.
- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 333(1), 169–174.



## BIBLIOGRAFIA

---

- Turk, B., G.Bieth, J., Björk, I., Dolenc, I., Turk, D., Cimerman, N., ... Turk, V. (1995). Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and / or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins. *Biol. Chem.*, 376, 225–230.
- Turk, B., & Turk, V. (2009). Lysosomes as “ Suicide Bags ” in Cell Death : Myth or Reality ? *The Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 21783–21787.

## U

---

- Uppala, J. K., Gani, A. R., & Ramaiah, K. V. A. (2017). Chemical chaperone , TUDCA unlike PBA , mitigates protein aggregation efficiently and resists ER and non-ER stress induced HepG2 cell death. *Scientific Reports*, 1, 1–13.
- Upton, J., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., ... Oakes, S. A. (2013). IRE1alpha Cleaves Select microRNAs During ER Stress to Derepress Translation of Proapoptotic Caspase-2. *Science*, 338(6108), 818–822.
- Urra, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-rivera, D., & Hetz, C. (2013). When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833, 3507–3517.

## V

---

- Vandewynckel, Y., Laukens, D., Geerts, A., Bogaerts, E., Paridaens, A., Verhelst, X., ... Vlierberghe, H. V. A. N. (2013). The Paradox of the Unfolded Protein Response in Cancer. *Anticancer Research*, 33, 4683–4694.
- Vang, S., Longley, K., Steer, C. J., & Low, W. C. (2014). The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Global Advances in Helath and Medicine*, 3(3), 58–69.
- Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B., & Foukas, L. C. (2005). Signalling by PI3K isoforms : insights from gene-targeted mice. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(4), 194–204.
- Vanhaesebroeck, B., Guibert, J. G., & Graupera, M. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 329–341.
- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., & Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3), 195–203.
- Verfaillie, T., Salazar, M., Velasco, G., & Agostinis, P. (2010). Linking ER Stress to Autophagy : Potential Implications for Cancer Therapy. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 19 pages.
- Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R. A., Laporte, J., & Deretic, V. (2009). Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy. *The EMBO Journal*, 28(15), 2244–2258.
- Vink, S. R., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., Sindermann, H., Dubbelman, R., Moppi, G., ... Verheij, M. (2006). Phase I and pharmacokinetic study of combined treatment with perifosine and radiation in patients with advanced solid tumours. *Clinical Radiobiology*, 80, 207–213.
- Visioli, F., Wang, Y., Alam, G. N., Ning, Y., Rados, P. V, No, J. E., & Polverini, P. J. (2014). Glucose-Regulated Protein 78 ( Grp78 ) Confers Chemoresistance to Tumor Endothelial Cells under Acidic Stress. *PLOS ONE*, 9(6), 1–9.

- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2, 489–501.
- Vos, K. E. Van Der, & Coffey, P. J. (2011). The Extending Network of FOXO. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(4), 579–592.

## W

---

- Walter, P., & Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response : *Science*, 334, 1081–1086.
- Wang, H., Maurer, B. J., Liu, Y.-Y., Wang, E., Allegood, J. C., Kelly, S., ... Cabot, M. C. (2008). N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide increases dihydroceramide and synergizes with dimethylsphingosine to enhance cancer cell killing. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9), 2967–2976.
- Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A., & Lawrence, J. C. (2007). PRAS40 Regulates mTORC1 Kinase Activity by Functioning as a Direct Inhibitor of Substrate Binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 20036–20044.
- Webber, J. L., & Tooze, S. A. (2010). Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *The EMBO Journal*, 29(1), 27–40. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.321>
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., & Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16 / GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*, 29(11), 1792–1802.
- Wek, R. C., Jiang, H., & Anthony, T. G. (2006). Coping with stress : eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*, 34(1), 7–11.
- Wennemers, M., Bussink, J., Beucken, T. Van Den, Sweep, F. C. G. J., & Span, P. N. (2012). Regulation of TRIB3 mRNA and Protein in Breast Cancer. *PLOS ONE*, 7(11), 1–9.
- Wennemers, M., Bussink, J., Grebenchtchikov, N., Sweep, F. C. G. J., & Span, P. N. (2011). TRIB3 protein denotes a good prognosis in breast cancer patients and is associated with hypoxia sensitivity. *Radiotherapy and Oncology*, 101, 198–202.
- Wennemers, M., Bussink, J., Scheijen, B., Nagtegaal, I. D., & Laarhoven, H. W. M. Van. (2011). Tribbles homolog 3 denotes a poor prognosis in breast cancer and is involved in hypoxia response Tribbles homolog 3 denotes a poor prognosis in breast cancer and is involved in hypoxia response. *Breast Cancer Research*, 13(4), R82.
- Wu, M., Xu, L., Zhai, Z., & Shu, H. (2003). SINK Is a p53-interacting Negative Regulator of NF- $\kappa$ B-dependent Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 27072–27079.
- Wu, X., Xin, Z., Zhang, W., Zheng, S., Wu, J., Chen, K., ... Liu, Y. (2014). A missense polymorphism in ATF6 gene is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma probably by altering ATF6 level. *International Journal of Cancer*, 135, 61–68.
- Wymann, M. P., Calvez, R., Barbier, M., & Laffargue, M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  : a key modulator in inflammation and allergy. *Annu Rev Immunol*, 31, 275–280.

### X

---

- Xie, T., Lim, S. M., Westover, K. D., Dodge, M. E., Ercan, D., Ficarro, S. B., ... Crews, C. M. (2015). Pharmacological Targeting of the Pseudokinase Her3. *Nat Chem Biol*, *10*(12), 1006–1012.
- Xie, Z., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2008). Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Molecular Biology of the Cell*, *19*, 3290–3298.
- Xu, R., Jin, J., Hu, W., Sun, W., Bielawski, J., Szulc, Z., ... Mao, C. (2018). Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *The FASEB Journal*, *20*, 1813–1825.

### Y

---

- Yadav, R. K., Chae, S., Kim, H., & Chae, H. J. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, *19*(2), 75–88.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., ... Mori, K. (2007). Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6alpha and XBP1. *Developmental Cell*, *13*, 365–376.
- Yamamura, Y., Asai, N., Enomoto, A., Kato, T., Mii, S., Kondo, Y., ... Ichihara, S. (2015). Akt – Girdin Signaling in Cancer-Associated Fibroblasts Contributes to Tumor Progression. *Cancer Research*, *75*(5), 813–824.
- Yamaoka, S., Miyaji, M., Kitano, T., Umehara, H., & Okazaki, T. (2004). Expression Cloning of a Human cDNA Restoring Sphingomyelin Synthesis and Cell Growth in Sphingomyelin Synthase-defective Lymphoid Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 18688–18693.
- Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., Pavletich, N. P., & Program, B. (2015). mTOR kinase structure, mechanism and regulation by the rapamycin-binding domain. *Nature*, *497*(7448), 217–223.
- Yao, X.-H., & Nyomba, B. L. G. (2008). Hepatic insulin resistance induced by prenatal alcohol exposure is associated with reduced PTEN and TRB3 acetylation in adult rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Physiol*, *294*(6), R1797-806.
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer : signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer*, *37*, S3–S8.
- Yokoyama, T., Kanno, Y., Yamazaki, Y., Takahara, T., Miyata, S., & Nakamura, T. (2018). Trib1 links the MEK1 / ERK pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood*, *116*, 2768–2776.
- Yokoyama, T., & Nakamura, T. (2011). Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *JCA*, *102*(6), 1115–1122.
- Yonekawa, T., & Thorburn, A. (2014). Autophagy and Cell Death. *Essays Biochem*, *55*, 105–117.
- Yoshida-moriguchi, T., Willer, T., Anderson, M. E., Venzke, D., Muntoni, F., Lee, H., ... Campbell, K. P. (2013). SGK196 Is a Glycosylation-Specific O-Mannose Kinase Required for Dystroglycan Function. *Science*, *341*(6148), 896–899.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell*, *107*, 881–891.

- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., & Mori, K. (2000). ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y ( CBF ) Directly to the cis -Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), 6755–6767.
- Young, A. R. J., Chan, E. Y. W., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S., ... Tooze, S. A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, 119, 3888–3900.
- Yu, J. S. L., & Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*, 143, 3050–3060.
- Yu, Z., Persson, H. L., W.Eaton, J., & T.Brunck, U. (2003). Intralysosomal Iron: a Major Determinant of Oxidant-Induced Cell Death. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(10), 1243–1252.
- Yuan, X., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., & Brunk, U. T. (2002). Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *PNAS*, 99(9), 6286–6291.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., & Heintz, N. (2003). Beclin 1 , an autophagy gene essential for early embryonic development , is a haploinsufficient tumor suppressor. *PNAS*, 100(25), 15077–15082.

## Z

---

- Zeng, X., Overmeyer, J. H., & Maltese, W. A. (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *Journal of Cell Science*, 119(2), 259–270.
- Zequiraj, E., & Aalten, D. M. F. Van. (2010). Pseudokinases-remnants of evolution or key allosteric regulators ? *Current Opinion in Structural Biology*, 20, 772–781.
- Zequiraj, E., Filippi, B. M., Deak, M., Alessi, D. R., & van Aalten, D. M. F. (2009). Europe PMC Funders Group Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science*, 326(5960), 1707–1711.
- Zequiraj, E., Filippi, B. M., Goldie, S., Navratilova, I., Alessi, D. R., & van Aalten, D. M. F. (2009). ATP and MO25 a Regulate the Conformational State of the STRAD a Pseudokinase and Activation of the LKB1 Tumour Suppressor. *PLoS Biology*, 7(6), e1000126.
- Zhang, S., Mukherjee, S., Fan, X., Salameh, A., & Mujoo, K. (2016). Novel association of DJ-1 with HER3 potentiates HER3 activation and signaling in cancer. *Oncotarget*, 7(40), 65758–65769.
- Zhao, L., & K.Vogt, P. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*, 27(41), 5486–5496.
- Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., ... Merrill, A. H. (2006). Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease : Lipidomic analysis , metabolism and roles in membrane structure , dynamics , signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1758, 1864–1884.
- Zheng, Y., Cao, Z.-G., Hu, X., & Shao, Z.-M. (2014). The endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 145, 349–358.
- Zheng, Y. T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., & Brumell, J. H. (2009). The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *J Immunol*, 183(9), 5909–5916.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

- Zhou, H., Palma, S. Di, Preisinger, C., Polat, A. N., Heck, A. J. R., & Mohammed, S. (2013). Towards a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J of Proteome Res*, 12(1), 260–271.
- Zou, C., Cao, X., Zhao, Y., Gao, S., Li, S., Liu, X.-Y., ... Zhang, K.-Q. (2009). The Molecular Mechanism of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in PC-12 Neuronal Cells : The Protective Effect of Insulin-Like Growth Factor I. *Endocrinology*, 150(1), 277–285.
- Zvelebil, M. J., Macdougall, L., Leever, S., Volinia, S., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., ... Waterfield, M. (1996). Structural and Functional Diversity of Phosphoinositide 3-Kinases [ and Discussion ]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 351(1336), 217–223.

# **ANNEXOS**



Cers	Control 1 h			ABTL0812 1 h			Control 6h			ABTL0812 6 h			Control 24 h			ABTL0812 24h		
C14:0	6,9	7,5	7,1	6,2	6,6	6,9	6,8	8,0	7,6	9,6	8,6	4,3	7,4	5,5	7,9	19,4	22,1	16,5
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0	172,4	169,1	155,7	131,9	134,6	135,9	157,9	173,9	180,7	133,7	150,7	114,8	183,5	159,3	186,5	241,3	264,0	208,7
C16:1	9,6	12,8	11,7	9,0	9,7	9,0	9,3	14,0	12,0	6,8	7,5	6,1	9,9	6,9	10,4	14,6	16,2	13,7
C18:0	27,6	24,5	22,4	17,6	19,3	19,8	20,9	25,1	25,6	17,0	15,2	12,7	15,9	16,5	15,6	18,2	20,9	16,1
C18:1	6,9	8,0	7,1	5,6	5,8	5,5	6,1	7,7	7,4	5,7	5,5	4,8	5,6	3,7	5,0	8,3	9,4	6,7
C20:0	6,1	4,1	3,3	2,9	3,3	3,9	3,2	3,6	4,1	2,9	2,8	2,2	1,9	2,8	1,7	2,8	2,9	2,2
C20:1	1,2	1,3	1,1	0,8	1,2	0,9	0,9	1,3	1,0	1,7	1,2	1,4	0,9	1,0	1,0	2,1	2,8	1,4
C22:0	40,4	31,7	23,1	25,7	28,9	23,8	22,7	28,3	24,2	27,4	15,9	19,5	8,9	14,8	9,8	21,4	29,5	25,6
C22:1	30,1	20,2	16,1	16,2	18,2	17,0	16,0	19,0	16,7	23,7	21,5	22,0	11,0	15,6	11,2	31,5	40,6	30,3
C24:0	198,4	152,3	92,3	95,3	118,1	90,0	77,7	137,4	98,2	87,6	96,5	154,5	77,4	185,6	92,5	126,6	193,7	204,9
C24:1 a	346,1	277,8	214,8	212,6	243,0	200,8	225,8	283,8	241,2	240,2	281,7	330,3	236,0	330,7	238,4	419,4	536,5	469,9
C24:1 b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:2	88,7	65,5	48,6	45,6	46,0	40,5	55,0	59,3	55,1	36,6	32,9	33,1	46,2	70,4	46,2	78,9	92,4	85,3
<b>Total:</b>	<b>934,5</b>	<b>774,8</b>	<b>603,4</b>	<b>569,4</b>	<b>634,6</b>	<b>554,1</b>	<b>602,3</b>	<b>761,6</b>	<b>673,8</b>	<b>593,0</b>	<b>639,8</b>	<b>705,6</b>	<b>604,7</b>	<b>812,8</b>	<b>626,3</b>	<b>984,4</b>	<b>1231,0</b>	<b>1081,4</b>
<b>Mean</b>	<b>770,9</b>			<b>586,0</b>			<b>679,2</b>			<b>646,1</b>			<b>681,3</b>			<b>1099,0</b>		
<b>SD</b>	<b>165,6</b>			<b>42,7</b>			<b>79,8</b>			<b>56,5</b>			<b>114,4</b>			<b>124,2</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>21,5</b>			<b>7,3</b>			<b>11,7</b>			<b>8,7</b>			<b>16,8</b>			<b>11,3</b>		

dhCers	Control 1 h			ABTL0812 1 h			Control 6h			ABTL0812 6 h			Control 24 h			ABTL0812 24h		
C14:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0	7,6	8,2	7,5	15,4	15,5	15,0	8,2	9,4	8,9	33,1	28,5	25,4	8,0	6,5	8,1	41,2	61,7	30,3
C18:0	2,6	1,6	1,2	1,7	1,9	1,8	1,3	1,9	1,4	2,9	3,1	3,4	0,8	2,0	0,9	3,1	4,7	2,9
C20:0	2,7	1,2	0,6	0,5	0,7	0,9	0,5	1,2	0,9	1,7	1,1	1,0	0,3	1,8	0,6	0,9	1,4	1,1
C22:0	6,1	4,2	2,7	5,1	6,3	4,5	2,2	3,8	2,7	7,6	5,4	6,8	1,5	2,8	1,6	5,3	8,7	6,3
C22:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:0	12,3	8,4	3,7	9,0	13,4	7,3	3,9	6,8	4,0	12,0	9,9	13,9	2,3	6,1	2,8	12,0	27,8	24,4
C24:1	25,3	16,4	11,7	28,0	36,2	26,1	12,2	18,0	12,6	41,3	41,6	52,2	10,4	20,8	11,8	57,2	107,1	77,9
<b>Total</b>	<b>56,7</b>	<b>40,2</b>	<b>27,3</b>	<b>59,7</b>	<b>74,0</b>	<b>55,6</b>	<b>28,2</b>	<b>41,1</b>	<b>30,5</b>	<b>98,6</b>	<b>89,6</b>	<b>102,7</b>	<b>23,2</b>	<b>40,0</b>	<b>25,8</b>	<b>119,6</b>	<b>211,3</b>	<b>142,9</b>
<b>Mean</b>	<b>41,4</b>			<b>63,1</b>			<b>33,3</b>			<b>96,9</b>			<b>29,7</b>			<b>158,0</b>		
<b>SD</b>	<b>14,7</b>			<b>9,7</b>			<b>6,8</b>			<b>6,7</b>			<b>9,0</b>			<b>47,6</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>35,6</b>			<b>15,3</b>			<b>20,5</b>			<b>6,9</b>			<b>30,5</b>			<b>30,2</b>		

**Annex 1:** Quantificació de les espècies indicades de Ceramides (Cers) i Dihidroceramides (dhCers) per espectrometria de masses en cèl·lules MiaPaca2 tractades 1, 6 i 24 hores amb ABTL0812 100 µM. Les dades estan expressades en pmol d'esfingolipid per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada condició va ser avaluada per triplicat.



SMs	Control 1 h			ABTL0812 1 h			Control 6h			ABTL0812 6 h			Control 24 h			ABTL0812 24h		
C14:0	157,7	144,5	136,8	120,7	140,8	127,5	201,9	142,0	154,1	141,6	157,9	123,5	178,5	200,9	197,9	208,4	201,5	195,9
C14:1	11,4	10,0	9,5	9,4	10,2	9,1	13,2	10,4	11,0	9,7	2,2	4,1	9,2	12,0	10,7	9,6	9,2	8,6
C16:0	1864,3	1544,4	1529,9	1333,0	1480,6	1281,1	2294,6	1620,0	1667,3	1436,3	1649,9	1375,2	1519,0	1934,1	1731,1	1553,9	1560,9	1490,9
C16:1	170,3	171,0	164,0	152,1	157,2	148,4	185,9	169,1	180,8	143,3	161,6	126,4	159,9	212,1	178,4	149,4	141,0	147,1
C18:0	345,9	337,5	334,8	285,3	323,7	284,2	391,8	368,1	364,8	295,4	381,6	306,9	350,8	468,4	399,7	323,0	304,8	301,6
C18:1	120,2	111,6	102,2	91,1	107,8	92,6	139,9	112,0	116,5	92,8	104,6	82,8	88,7	117,7	98,2	81,2	80,6	80,2
C20:0	66,3	47,1	40,9	36,9	42,6	39,1	48,1	45,1	45,7	40,0	32,6	25,9	24,3	55,0	28,3	28,1	28,2	29,5
C20:1	18,1	15,9	14,3	13,2	15,3	14,1	19,4	15,7	16,0	15,9	14,6	12,6	11,5	15,8	12,1	14,6	15,2	13,9
C22:0	198,2	159,5	131,3	129,5	149,5	129,8	179,6	166,5	150,8	140,2	166,5	150,6	118,5	225,3	136,5	164,7	178,7	196,5
C22:1a	211,1	184,8	146,7	142,9	162,1	142,0	185,3	176,1	171,8	197,8	231,0	193,9	151,9	283,4	175,7	274,1	270,3	276,9
C22:1b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:0	761,4	633,1	525,7	490,1	596,7	463,9	701,8	642,7	585,6	483,9	577,5	547,9	500,2	861,9	551,9	523,2	591,7	638,0
C24:1	1666,7	1307,0	1183,1	1086,2	1212,9	1014,9	1723,7	1355,0	1322,8	1248,7	1435,0	1298,6	1295,4	1959,4	1447,1	1374,4	1461,0	1440,9
C24:2	525,0	412,6	358,3	332,0	378,4	332,3	480,1	411,3	413,5	338,8	380,8	298,9	375,3	644,9	426,6	342,8	348,8	353,6
C24:3	23,3	18,5	15,6	16,2	18,2	15,5	17,9	18,2	18,6	16,4	14,6	11,3	11,4	21,1	13,1	12,9	12,8	12,8
<b>Total</b>	<b>6139,7</b>	<b>0,0</b>	<b>4693,3</b>	<b>4238,4</b>	<b>4796,1</b>	<b>4094,4</b>	<b>6583,1</b>	<b>5252,1</b>	<b>5219,2</b>	<b>4600,9</b>	<b>5310,3</b>	<b>4558,5</b>	<b>4794,6</b>	<b>7012,0</b>	<b>5407,3</b>	<b>5060,3</b>	<b>5204,6</b>	<b>5186,5</b>
<b>Mean</b>	<b>5310,2</b>			<b>4376,3</b>			<b>5684,8</b>			<b>4823,3</b>			<b>5738,0</b>			<b>5150,5</b>		
<b>SD</b>	<b>746,3</b>			<b>370,6</b>			<b>778,1</b>			<b>422,3</b>			<b>1145,1</b>			<b>78,6</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>14,1</b>			<b>8,5</b>			<b>13,7</b>			<b>8,8</b>			<b>20,0</b>			<b>1,5</b>		

dhSMs	Control 1 h			ABTL0812 1 h			Control 6h			ABTL0812 6 h			Control 24 h			ABTL0812 24h		
C14:0	3,7	3,9	3,9	3,6	3,9	3,6	4,4	4,6	3,3	16,0	7,3	9,2	4,2	5,3	5,1	18,6	17,9	18,2
C16:0	93,6	82,9	81,7	84,7	97,1	93,5	133,7	98,2	104,7	220,3	282,2	221,1	122,4	159,4	137,9	358,0	364,1	342,6
C18:0	9,0	7,2	6,7	6,4	7,6	7,4	10,1	7,9	8,3	11,1	9,4	8,3	5,8	7,9	6,3	12,6	12,5	13,3
C20:0	5,1	3,6	2,4	2,2	2,7	2,3	2,7	2,9	2,8	3,9	2,7	2,3	1,1	2,3	1,4	3,2	3,5	3,7
C22:0	16,1	13,2	10,1	10,4	12,1	10,4	12,6	12,4	11,3	21,0	11,1	10,1	3,4	5,7	4,3	17,6	17,8	18,8
C24:0	20,1	17,4	9,1	11,5	14,9	11,2	13,3	16,0	12,3	16,1	10,3	10,5	6,3	15,2	8,2	18,1	25,1	29,7
C24:1	74,3	64,0	52,9	63,8	68,2	59,9	79,1	85,3	79,9	128,4	161,3	145,8	77,0	139,4	100,0	220,8	252,3	254,7
<b>Total</b>	<b>221,9</b>	<b>192,3</b>	<b>166,8</b>	<b>182,6</b>	<b>206,5</b>	<b>188,2</b>	<b>255,9</b>	<b>227,2</b>	<b>222,7</b>	<b>416,9</b>	<b>484,3</b>	<b>407,3</b>	<b>220,3</b>	<b>335,3</b>	<b>263,1</b>	<b>648,9</b>	<b>693,1</b>	<b>680,9</b>
<b>Mean</b>	<b>193,7</b>			<b>192,4</b>			<b>235,3</b>			<b>436,1</b>			<b>272,9</b>			<b>674,3</b>		
<b>SD</b>	<b>27,6</b>			<b>12,5</b>			<b>18,0</b>			<b>42,0</b>			<b>58,1</b>			<b>22,8</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>14,2</b>			<b>6,5</b>			<b>7,7</b>			<b>9,6</b>			<b>21,3</b>			<b>3,4</b>		

**Annex 2:** Quantificació de les espècies indicades d'Esfingomielines (SMs) i Dihidroesfingomielines (dhSMs) per espectrometria de masses en cèl·lules MiaPaca2 tractades 1, 6 i 24 hores amb ABTL0812 100 µM. Les dades estan expressades en pmol d'esfingolípids per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada condició va ser avaluada per triplicat.

GCers	Control 1 h			ABTL0812 1 h			Control 6h			ABTL0812 6 h			Control 24 h			ABTL0812 24h		
C14:0	5,4	7,3	7,0	7,7	7,3	6,5	7,2	7,1	6,4	7,2	7,8	0,0	8,5	4,2	8,0	4,3	5,0	5,8
C16:0	56,0	72,0	66,7	74,3	71,9	58,8	71,4	67,0	64,1	52,9	58,1	49,9	71,0	39,9	75,8	45,6	49,7	64,6
C18:0	11,4	14,2	14,6	14,6	13,5	11,7	15,7	14,1	11,8	9,4	12,0	9,8	13,0	6,7	13,5	5,2	5,1	6,7
C20:0	4,4	2,8	1,8	2,2	2,2	2,1	1,6	2,2	2,0	1,8	2,0	1,9	2,0	2,3	2,3	1,2	1,3	1,9
C22:0	75,0	51,4	29,9	31,4	38,5	27,4	27,5	33,7	25,7	25,6	20,7	21,5	17,2	25,2	19,3	15,7	21,1	30,7
C22:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:0	226,5	241,8	125,6	148,2	175,6	111,2	112,0	170,1	105,9	93,9	95,2	169,8	96,9	193,2	162,8	39,3	79,0	136,5
C24:1	366,2	307,2	186,0	214,2	247,0	171,2	194,4	235,1	173,7	149,6	172,7	216,3	249,5	345,4	301,1	108,3	145,1	218,4
C24:2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total	744,8	696,6	431,7	492,7	556,0	388,9	430,0	529,3	389,5	340,3	368,4	469,1	458,2	617,0	582,9	219,7	306,3	464,5
Mean	624,4			479,2			449,6			392,6			552,7			330,2		
SD	168,6			84,4			71,9			67,8			83,6			124,1		
RSD (%)	27,0			17,6			16,0			17,3			15,1			37,6		

LacCers	Control 1 h			ABTL0812 1 h			Control 6h			ABTL0812 6 h			Control 24 h			ABTL0812 24h		
C14:0	8,1	10,0	9,6	10,7	11,0	7,5	10,7	8,2	8,5	7,5	7,7	2,4	9,3	5,1	8,8	6,2	7,5	7,0
C16:0	61,2	77,1	72,7	78,5	77,8	63,3	74,6	66,6	60,6	50,2	39,9	41,8	57,9	33,8	64,7	30,4	38,4	33,7
C18:0	12,4	15,1	13,9	14,8	15,8	12,3	13,9	12,8	13,0	9,4	10,6	8,0	10,4	6,2	11,1	4,7	6,9	5,4
C20:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0	51,7	32,4	20,2	21,5	24,3	17,3	16,9	19,0	16,4	14,8	10,7	10,5	8,8	15,4	11,5	7,5	11,5	11,4
C24:0	170,4	149,4	86,9	113,3	124,0	74,4	85,1	115,2	73,6	71,1	65,7	89,4	60,2	115,3	90,5	44,2	79,7	75,0
C24:1	276,1	197,0	137,3	157,8	172,9	113,8	135,9	144,3	120,8	99,6	83,7	88,9	93,8	222,5	139,1	61,9	102,6	115,2
Total	579,9	481,0	340,6	396,6	425,7	288,6	337,1	366,1	292,9	252,6	218,2	241,0	240,4	398,2	325,7	154,9	246,7	247,7
Mean	467,2			370,3			332,0			237,2			321,5			216,4		
SD	120,2			72,2			36,8			17,5			79,0			53,3		
RSD (%)	25,7			19,5			11,1			7,4			24,6			24,6		

**Annex 3:** Quantificació de les espècies indicades de Glucosilceramides (GCers) i Lactosilceramides (LacCers) per espectrometria de masses en cèl·lules MiaPaca2 tractades 1, 6 i 24 hores amb ABTL0812 100 µM. Les dades estan expressades en pmol d'esfingolípids per 10<sup>6</sup> cèl·lules. Cada condició va ser avaluada per triplicat.

### Articles publicats

1. Erazo T, Lorente M, López-Plana A, **Muñoz-Guardiola P**, Fernández-Nogueira P, García-Martínez JA, Bragado P, Fuster G, Salazar M, Espadaler J, Hernández-Losa J, Bayascas JR, Cortal M, Vidal L, Gascón P, Gómez-Ferrera M, Alfón J, Velasco G, Domènech C, Lizcano JM. The New Antitumor Drug ABTL0812 Inhibits the Akt/mTORC1 Axis by Upregulating Tribbles-3 Pseudokinase. *Clin Cancer Res*. 2016 May 15; 22(10):2508-19.
2. Wang J, Erazo T, Ferguson FM, Buckley DL, Gomez N, **Muñoz-Guardiola P**, Diéguez-Martínez N, Deng X, Hao M, Masefski W, Fedorov O, Offei-Addo NK, Park PM, Dai L, DiBona A, Becht K, Kim ND, McKeown MR, Roberts JM, Zhang J, Sim T, Alessi DR, Bradner JE, Lizcano JM, Blacklow SC, Qi J, Xu X, Gray NS. Structural and atropisomeric factors governing the selectivity of pyrimido-benzodiazepinones as inhibitors of kinases and bromodomains. *ACS Chem Biol*. 2018 Aug 13.

### Articles en revisió

3. Felip I, Moiola C, Megino-Luque C, Lopez-Gil C, Cabrera S, Solé-Sánchez S, **Muñoz-Guardiola P**, Megias-Roda E, Perez-Montoyo H, Alfón J, Yeste-Velasco M, Santacana M, Dolcet X, Garcia-Jimenez A, Oaknin A, Rodríguez-Freixinos V, Lizcano JM, Domènech C, Gil-Moreno A, Colas E, Eritja N, Matias-Guiu X. Preclinical evidence of the therapeutic potential of ABTL0812, a novel small-molecule inhibitor of PI3K/AKT/mTOR axis, in endometrial cancer. *Clin Cancer Res*.

### Articles en preparació

4. **Muñoz-Guardiola P**, Megias-Roda E, Casas F, Solé-Sánchez S, Fabrias G, Erazo T, Dalfo E, Segura MF, Cortal M, Yeste M, Alfón J, Perez-Montoyo H, Domènech C, Velasco G, Lizcano JM. The antitumoral drug ABTL0812 induces ER stress, long-chain dihydroceramide accumulation and autophagy-mediated cancer cell death. Evidences showing that dihydroceramides synergize with mTORC1 inhibition to promote cell cytotoxicity.



