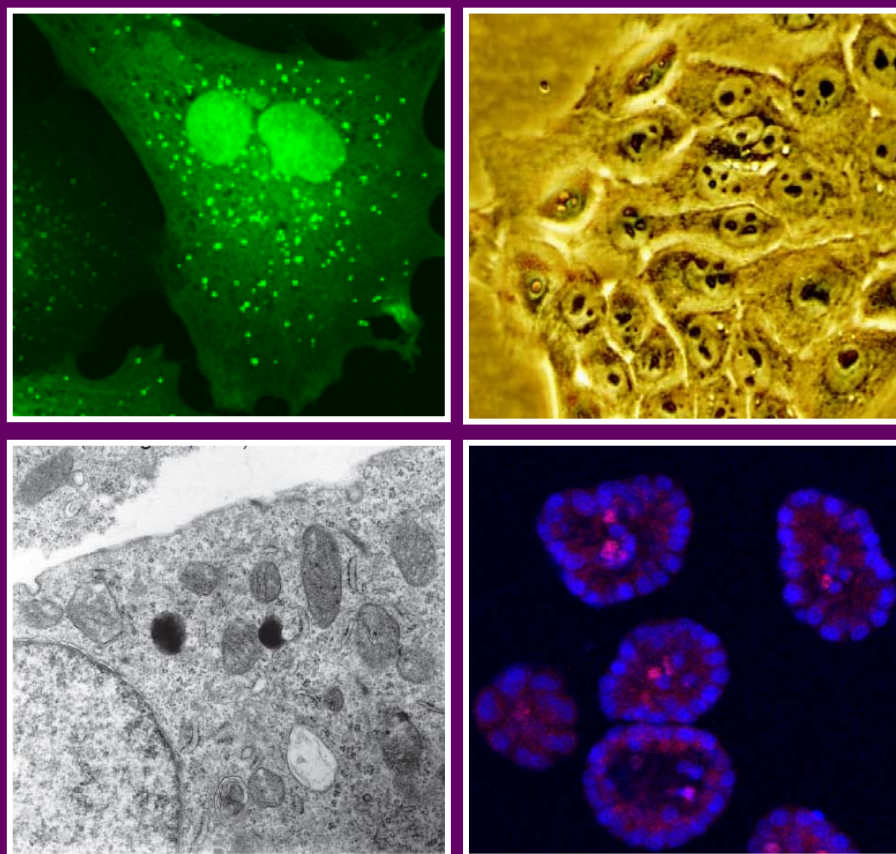


Tesis Doctoral

**MECANISMOS MOLECULARES DE INDUCCIÓN DE
AUTOFAGIA POR TRAIL EN CÉLULAS EPITELIALES
DE MAMA Y SU RELACIÓN CON APOPTOSIS Y
TRANSFORMACIÓN ONCOGÉNICA**



Griselda Herrero Martín

Octubre de 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Griselda Herrero Martín
D.L.: GR. 2353-2008
ISBN: 978-84-691-7260-5

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos moleculares de inducción de
autofagia por TRAIL en células epiteliales de
mama y su relación con apoptosis y
transformación oncogénica.**

Griselda Herrero Martín

2008

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Figuras de portada. La imagen superior izquierda muestra células MCF10A con traslocación de GFP-LC3 (verde) tras el tratamiento con TRAIL. A su derecha, una fotografía de las mismas células en contraste de fase. La imagen inferior izquierda representa las células MCF10A tratadas con TRAIL, en las que se observa la presencia de autofagosomas y autolisosomas, mediante microscopía electrónica. A su derecha, se observan los acinos que forman las MCF10A cuando se siembran en matrigel, teñidos con DAPI (azul) y caspasa-3 (rojo). La imagen está tomada con un microscopio confocal.

Dr. Abelardo López Rivas, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y miembro del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER-CSIC),

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado ***“Mecanismos moleculares de inducción de autofagia por TRAIL en células epiteliales de mama y su relación con apoptosis y transformación oncogénica”*** presentado por **Doña Griselda Herrero Martín**, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada, ha sido realizado bajo su supervisión en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea defendido ante el tribunal correspondiente.

Y, para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 19 de Septiembre de 2008.

Fdo: Dr. Abelardo López Rivas

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| I. ABREVIATURAS | 1 |
| II. RESUMEN | 11 |
| III. INTRODUCCIÓN | 17 |
| 1. <u>APOPTOSIS</u> | 19 |
| 1.1. <u>Introducción</u> | 19 |
| 1.1.1. Muerte celular programada | 19 |
| 1.1.2. Apoptosis | 21 |
| 1.1.3. Necrosis | 23 |
| 1.1.4. Mecanismos alternativos | 24 |
| 1.2. <u>Caspasas</u> | 25 |
| 1.2.1. Características generales | 25 |
| 1.2.2. Inhibidores de caspasas: IAPs y FLIP | 30 |
| 1.3. <u>Mecanismos de inducción de apoptosis</u> | 33 |
| 1.3.1. <u>Introducción</u> | 33 |
| 1.3.2. <u>Ruta intrínseca o mitocondrial</u> | 36 |
| 1.3.2.1. <u>La mitocondria</u> | 37 |
| 1.3.2.2. <u>La familia de proteínas Bcl-2</u> | 39 |
| 1.3.3. <u>Ruta extrínseca o de receptores de muerte</u> | 43 |
| 1.3.3.1. <u>Receptores de muerte: Fas y TNF</u> | 43 |
| 1.3.3.2. <u>Apo2L/TRAIL</u> | 50 |
| 1.4. <u>Papel fisiológico de TRAIL</u> | 55 |
| 1.4.1. <u>TRAIL, apoptosis y cáncer</u> | 56 |
| 1.4.2. <u>Apoptosis en el desarrollo de la glándula mamaria</u> | 59 |
| 2. <u>AUTOFAGIA</u> | 62 |
| 2.1. <u>Introducción y generalidades</u> | 62 |
| 2.2. <u>Mecanismos moleculares de la autofagia</u> | 64 |
| 2.2.1. <u>Genes relacionados con autofagia (Atg's)</u> | 66 |
| 2.2.2. <u>Señalización de la maquinaria de autofagia</u> | 67 |
| 2.2.3. <u>AMPK y mTOR en la regulación de autofagia</u> | 76 |
| 2.2.3.1. <u>Regulación de AMPK: LKB1, CaMKKβ y TAK1</u> | 84 |
| 2.2.4. <u>Regulación de la autofagia: Bcl-2 y Atg5</u> | 89 |
| 2.3. <u>Relación entre apoptosis y autofagia</u> | 92 |
| 2.4. <u>TRAIL y autofagia</u> | 94 |
| 2.5. <u>Papel fisiológico de la autofagia</u> | 95 |
| 2.5.1. <u>Autofagia como mecanismo de muerte y de supervivencia</u> | 95 |

| | |
|--|------------|
| 2.5.2. Autofagia en la supresión y progresión de tumores..... | 98 |
| 3. ONCOGENICIDAD | 101 |
| 3.1. Introducción | 101 |
| 3.2. El oncogén Src | 102 |
| 3.3. El oncogén Ras | 103 |
| IV. OBJETIVOS | 107 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 111 |
| 1. MATERIALES | 113 |
| 1.1. Cultivos Celulares | 113 |
| 1.1.1. MCF10A..... | 113 |
| 1.1.2. MCF7..... | 113 |
| 1.1.3. RPE1..... | 113 |
| 1.1.4. MEFs..... | 114 |
| 1.1.5. HEK293..... | 114 |
| 1.2. Reactivos | 114 |
| 1.1.1. Medios de cultivo..... | 114 |
| 1.1.2. Ligandos de muerte..... | 115 |
| 1.1.3. Drogas e Inhibidores..... | 115 |
| 1.2. Anticuerpos | 115 |
| 1.2.1. Anticuerpos primarios..... | 115 |
| 1.2.1.1. Monoclonales de ratón..... | 116 |
| 1.2.1.2. Policlonales de conejo..... | 116 |
| 1.2.1.3. Anticuerpos de cabra..... | 116 |
| 1.2.2. Anticuerpos secundarios..... | 116 |
| 1.2.3. Reactivo quimioluminiscente..... | 116 |
| 1.2.4. Anticuerpos frente a receptores de TRAIL..... | 116 |
| 1.3. RNAs de Interferencia | 117 |
| 1.4. Cebadores para RT-PCR | 117 |
| 1.5. Soluciones Comunes | 118 |
| 2. METODOLOGÍA | 119 |
| 2.1. Cuantificación de la viabilidad celular (SYTOX) | 119 |
| 2.2. Cuantificación de Apoptosis | 119 |
| 2.3. Liberación de LDH | 120 |
| 2.4. Análisis de receptores de TRAIL en la superficie celular | 120 |
| 2.5. Aislamiento del DISC de TRAIL | 120 |
| 2.6. Inmunodetección de proteínas por Western Blot | 121 |
| 2.7. Medida de la concentración de proteína | 123 |

| | |
|--|-----|
| 2.8. <u>Fragmentación de la cromatina</u> | 124 |
| 2.9. <u>Inmunocitoquímica para detección de Ras</u> | 124 |
| 2.10. <u>Detección de autofagia</u> | 125 |
| 2.10.1. <u>Traslocación de GFP-LC3 a la membrana del autofagosoma</u> | 125 |
| 2.10.2. <u>Detección de autofagosomas por Microscopía Electrónica</u> | 126 |
| 2.10.3. <u>Degradación de proteínas de vida media larga</u> | 126 |
| 2.10.4. <u>Detección de LC3-I y LC3-II por Western Blot</u> | 127 |
| 2.11. <u>Transfecciones transitorias</u> | 128 |
| 2.11.1. <u>Transfección por Dharmafect para silenciamiento de proteínas</u> | 129 |
| 2.11.2. <u>Transfección por Lipofectamina en RPE1 para expresión de GFP-LC3</u> | 129 |
| 2.11.3. <u>Transfección por Fosfato Cálculo en 293T para producción de lentivirus</u> | 129 |
| 2.12. <u>RT-PCR</u> | 131 |
| 2.13. <u>Infecciones virales</u> | 132 |
| 2.13.1. <u>Infección Retroviral: MCF10A-GFP-LC3, MCF10A-Ras, MCF10A-Src, MCF10A-Ras-Mutantes</u> | 132 |
| 2.13.2. <u>Infección Lentiviral: MCF10A-shBeclina1, MCF10A-shTAK1, MCF10A-shScrambled</u> | 134 |
| 2.14. <u>Estudios de morfogénesis</u> | 137 |
| 2.14.1. <u>Cultivos tridimensionales de células epiteliales</u> | 137 |
| 2.14.1.1. <u>Siembra de células en matrigel</u> | 137 |
| <u>Cambio de medio de los acinos</u> | 137 |
| 2.14.2. <u>Inmunofluorescencia en 3D</u> | 137 |
| 2.14.3. <u>Análisis de las muestras</u> | 138 |
| 2.14.4. <u>Medios de cultivo y Soluciones utilizados</u> | 139 |
| 2.14.4.1. <u>Medios de cultivo</u> | 139 |
| 2.14.4.2. <u>Soluciones</u> | 139 |
| 2.15. <u>Análisis estadístico</u> | 140 |
| 2.16. <u>Cuantificación de Western Blots</u> | 140 |

VI. RESULTADOS..... **141**

| | |
|---|-----|
| <u>Parte-I: TRAIL induce autofagia en células epiteliales de mama</u> | 143 |
| 1. <u>TRAIL induce autofagia funcional en células epiteliales de mama</u> | 143 |
| 2. <u>La autofagia inducida por TRAIL depende de la activación de AMPK y de la inhibición de mTORC1</u> | 146 |
| 3. <u>TAK1 media la activación de AMPK y la autofagia inducidas por TRAIL</u> | 148 |
| 4. <u>La inducción de autofagia mediada por TRAIL requiere de los componentes del DISC</u> | 154 |

| | |
|---|------------|
| 5. Una ruta alternativa: la vía de JNK..... | 158 |
| 6. La autofagia juega un papel en la formación del lumen de células epiteliales de mama..... | 162 |
| Parte-II: La transformación oncogénica bloquea la autofagia inducida por TRAIL..... | 166 |
| 1. La transformación oncogénica bloquea la señal de autofagia y sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL..... | 166 |
| 2. En células transformadas por Ras, el bloqueo de la señalización de autofagia se encuentra entre AMPK y mTOR..... | 170 |
| 3. Las rutas PI3K/Akt y ERK están implicadas en la inhibición de autofagia por TRAIL en células transformadas..... | 172 |
| Parte-III: Apoptosis vs. Autofagia en células de mama..... | 175 |
| 1. La autofagia inducida por TRAIL en células epiteliales de mama es un mecanismo de supervivencia..... | 175 |
| 2. La inhibición de autofagia sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por TRAIL..... | 176 |
| 3. La autofagia está bloqueando la apoptosis con posterioridad a la formación del DISC..... | 179 |
| 4. Relación autofagia-apoptosis en células normales y transformadas de mama..... | 181 |
| VII. DISCUSIÓN..... | 183 |
| 1. Inducción de autofagia mediada por TRAIL en células epiteliales de mama..... | 185 |
| 2. Inhibición de la autofagia por transformación oncogénica..... | 194 |
| 3. Relación entre autofagia y apoptosis en células normales y tumorales de mama..... | 198 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 205 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA..... | 209 |
| X. ANEXO: Publicaciones..... | 247 |
| 1. Artículo relacionado con la Tesis..... | 249 |
| 2. Otro artículo publicado..... | 281 |

I. ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------|--|
| 3D | Tridimensional |
| 3-MA | 3-Metiladenina [<i>del inglés</i> , 3-Methyladenine] |
| ACC | Acetil-Coenzima A-carboxilasa [<i>del inglés</i> , Acetyl-CoenzymeA-carboxylase] |
| AD5 | Adenovirus humano tipo 5 |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico [<i>del inglés</i> , DNA] |
| AICAR | 5-amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleósido [<i>del inglés</i> , 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside] |
| AMBRA1 | Molécula activada en autofagia regulada por Beclina1 [<i>del inglés</i> , Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy] |
| AMP | Adenosina monofosfato [<i>del inglés</i> , Adenosine monophosphate] |
| AMPK | Quinasa activada por AMP [<i>del inglés</i> , AMP-activated protein Kinase] |
| APAF-1 | Factor 1 activado por proteasas apoptóticas [<i>del inglés</i> , Apoptotic protease-activating factor-1] |
| APS | Persulfato de amonio [<i>del inglés</i> , Amonium Persulfate] |
| ARN | Ácido Ribonucleico [<i>del inglés</i> , RNA] |
| ARNm | Ácido Ribonucleico mensajero [<i>del inglés</i> , mRNA] |
| ARNsh | Ácido Ribonucleico de bucle pequeño [<i>del inglés</i> , shRNA] |
| ARNsi | Ácido Ribonucleico de interferencia [<i>del inglés</i> , siRNA] |
| Atg | Genes relacionados con autofagia [<i>del inglés</i> , Autophagy-related genes] |
| ATP | Adenosín trifosfato [<i>del inglés</i> , Adenosine triphosphate] |
| Bak | Proteína de muerte antagonista homóloga de Bcl-2 [<i>del inglés</i> , Bcl-2 homologous antagonist killer] |
| Bax | Proteína X asociada a Bcl-2 [<i>del inglés</i> , Bcl-2-associated X protein] |
| Bcl-2 | [<i>del inglés</i> , B-cell lymphoma/leukaemia 2] |
| Bcl-X_L | [<i>del inglés</i> , Bcl-X long] |
| BH | Dominio de homología a Bcl-2 [<i>del inglés</i> , Bcl-2 homology domain] |
| tBid | Bid truncado [<i>del inglés</i> , Truncated Bid] |
| Bif-1 | Endofilina-1 |
| BIR | [<i>del inglés</i> , Baculoviral IAP repeat] |
| BMP | Proteína morfogenética del hueso [<i>del inglés</i> , Bone morphogenetic protein] |
| BNIP3 | Proteína de interacción con Bcl-2 [<i>del inglés</i> , Bcl-2/adenovirus E1B 19kd-interacting protein 3] |
| BSA | Albúmina sérica bovina [<i>del inglés</i> , Bovine serum albumin] |

| | |
|--------------------------------|--|
| CaMKKβ | Calcio calmodulina quinasa quinasa-beta [<i>del inglés, Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase-β</i>] |
| CARD | Dominios de reclutamiento y activación de caspasas [<i>del inglés, Caspase activation and recruitment domain</i>] |
| CHX | Cicloheximida [<i>del inglés, Cycloheximide</i>] |
| ConA | Concanamicina-A [<i>del inglés, Concanamycin A</i>] |
| CRD | Dominio rico en cisteínas [<i>del inglés, Cysteine-rich domain</i>] |
| CRG | Genes de cooperación [<i>del inglés, Cooperation response genes</i>] |
| DAPI | Diaminofenilindol [<i>del inglés, 4',6-diamidino-2-phenylindole</i>] |
| DAPK | Proteína quinasa asociada a muerte [<i>del inglés, Death associated protein kinase</i>] |
| DcR | Receptor señuelo [<i>del inglés, Decoy Receptor</i>] |
| DD | Dominio de muerte [<i>del inglés, Death domain</i>] |
| DED | Dominio efector de muerte [<i>del inglés, Death effector domain</i>] |
| DIABLO | Inhibidor directo de apoptosis [<i>del inglés, Direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI</i>] |
| DISC | Complejo inductor de muerte [<i>del inglés, Death-inducing signaling complex</i>] |
| DMEM | [<i>del inglés, Dubelco's modified Eagle's medium</i>] |
| DMSO | Dimetilsulfóxido [<i>del inglés, Dimethyl sulfoxide</i>] |
| DNA | ADN [<i>del inglés, Deoxyribonucleic acid</i>] |
| DRAM | Modulador de autofagia regulado por daño [<i>del inglés, Damage-regulated autophagy modulator</i>] |
| DTT | Ditiotreitol [<i>del inglés, Dithiothreitol</i>] |
| ECL | Reactivo quimioluminiscente [<i>del inglés, Enhanced chemiluminescence</i>] |
| EDTA | Etilendiaminotetraacetato [<i>del inglés, Etilendiaminotetraacetate</i>] |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico [<i>del inglés, Epidermal growth factor</i>] |
| EGFP | Proteína fluorescente verde [<i>del inglés, Enhanced green fluorescent protein</i>] |
| EGFR | Receptor de EGF [<i>del inglés, Epidermal growth factor receptor</i>] |
| EGTA | Etilenglicol-bis(β -aminoetiléter)-N-N-N'-N-tetraacético [<i>del inglés, Ethylene glycol tetraacetic acid</i>] |
| EM | Microscopía electrónica [<i>del inglés, Electron microscopy</i>] |
| ERK | Quinasa regulada por señales extracelulares [<i>del inglés, Extracellular signal-regulated kinase</i>] |

| | |
|-----------------------------|---|
| FACS | Citometría de flujo [<i>del inglés, Fluorescence activated cell sorting</i>] |
| FADD | Dominio de muerte asociado a Fas [<i>del inglés, Fas-associated death domain</i>] |
| FBS | Suero bovino fetal [<i>del inglés, Foetal bovine serum</i>] |
| FITC | Isotiacianato de fluoresceína [<i>del inglés, Fluorescein isothiocyanate</i>] |
| FKBP12 | Rapamicina |
| FLICE | Enzima convertidora parecida a FADD [<i>del inglés, FADD-like IL-1β-converting enzyme</i>] |
| FLIP | Proteína inhibidora de Caspasa-8 [<i>del inglés, FLICE-caspase-8 inhibitory protein</i>] |
| GAP | Proteína activadora de GTPasa [<i>del inglés, GTPase activating protein</i>] |
| GAPDH | Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa [<i>del inglés, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>] |
| GβL | [<i>del inglés, G protein-β-subunit like</i>] |
| GEF | Factor de intercambio de nucleótidos de guanina [<i>del inglés, Guanine-nucleotide-exchange factor</i>] |
| GGT | Gamma glutamil transpeptidasa [<i>del inglés, Gamma glutamyl transpeptidase</i>] |
| GTP | Guanosín trifosfato [<i>del inglés, Guanosine triphosphate</i>] |
| HBS | Solución salina de Hepes [<i>del inglés, Hepes buffered saline</i>] |
| HBSS | [<i>del inglés, Hank's balanced salt solution</i>] |
| HEK | Fibroblastos embrionarios humanos [<i>del inglés, Human embryonic fibroblasts</i>] |
| HRP | Peroxidasa de rábano [<i>del inglés, Horseradish peroxidase</i>] |
| HS | Suero de caballo [<i>del inglés, Horse serum</i>] |
| HSV | Virus herpes simple [<i>del inglés, Herpes simplex viridae</i>] |
| hTERT | Transcriptasa reversa de la telomerasa humana [<i>del inglés, Human telomerase reverse transcriptase</i>] |
| IAP | Proteína inhibidora de apoptosis [<i>del inglés, Inhibitor of apoptosis protein</i>] |
| IF | Inmunofluorescencia [<i>del inglés, Immunofluorescence</i>] |
| IFN | Interferón |
| IRAK | Quinasa asociada al receptor de IL-1 [<i>del inglés, IL-1 receptor associated kinase</i>] |
| JNK | Quinasa N-terminal de c-Jun [<i>del inglés, c-Jun N-terminal kinase</i>] |

| | |
|---------------|--|
| KDa | Quilodaltons |
| LAMP | Proteína de membrana asociada al lisosoma [<i>del inglés, L</i> isosomal- <i>a</i> ssociated <i>m</i> embrane <i>p</i> rotein]. También conocido como CD107b [<i>del inglés, C</i> luster of <i>d</i> ifferentiation <i>107b</i>] |
| LC3 | [<i>del inglés, M</i> icrotubule-associated protein- <i>l</i> ight <i>c</i> hain <i>3</i>] |
| LDH | Lactato deshidrogenasa [<i>del inglés, L</i> actate <i>d</i> ehydrogenase] |
| LPC | Lisofosfatidilcolina [<i>del inglés, L</i> ysophosphatidil <i>c</i> holine] |
| LST8 | [<i>del inglés, L</i> etal with <i>s</i> ec <i>t</i> hirteen <i>8</i>] |
| mA | Miliamperios |
| MALTI | Tejido linfoide asociado a mucosa [<i>del inglés, M</i> ucose- <i>a</i> ssociated <i>l</i> ymphoid <i>t</i> issue] |
| MAPK | Proteína quinasa activada por mitógeno [<i>del inglés, M</i> itogen- <i>a</i> ctivated <i>p</i> rotein <i>k</i> inase] |
| MAPKKK | Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno [<i>del inglés, M</i> itogen- <i>a</i> ctivated <i>p</i> rotein <i>k</i> inase <i>k</i> inase <i>k</i> inase] |
| MEFs | Fibroblastos embrionarios de ratón [<i>del inglés, M</i> urine <i>e</i> mbrionic <i>f</i> ibroblasts] |
| MEK | Quinasa de MAPK/ERK [<i>del inglés, M</i> APK/ <i>E</i> RK <i>k</i> inase] |
| mg | Miligramo |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MMP9 | Metaloproteinasa 9 [<i>del inglés, M</i> atrix <i>m</i> etaloproteinase <i>9</i>] |
| MO25 | Proteína de ratón 25 [<i>del inglés, M</i> ouse protein <i>25</i>] |
| MOI | Multiplicidad de infección [<i>del inglés, M</i> ultiplicity <i>o</i> f <i>i</i> nfection] |
| MPT | Transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial [<i>del inglés, M</i> itochondrial <i>m</i> embrane <i>p</i> ermeability <i>t</i> ransition] |
| mTOR | Diana de rapamicina en mamíferos [<i>del inglés, M</i> ammalian <i>t</i> arget <i>o</i> f <i>r</i> apamycin] |
| mTORC | Complejo de mTOR [<i>del inglés, M</i> ammalian <i>t</i> arget <i>o</i> f <i>r</i> apamycin <i>c</i> omplex] |
| NF1 | Neurofibromina 1 [<i>del inglés, N</i> eurofibromin <i>1</i>] |
| NF-κB | Factor nuclear kappa B [<i>del inglés, N</i> uclear <i>f</i> actor <i>K</i> appa <i>B</i>] |
| NGF | Factor de crecimiento neuronal [<i>del inglés, N</i> euronal <i>g</i> rowth <i>f</i> actor] |
| NIK | Quinasa inductora de NF-κB [<i>del inglés, N</i> F-κB- <i>i</i> nducing <i>k</i> inase] |
| NK | [<i>del inglés, N</i> atural <i>k</i> iller] |

| | |
|-------------------------|--|
| ng | <u>N</u> anogramo |
| nm | <u>N</u> anometros |
| nM | <u>N</u> anomolar |
| OPG | Osteoprotegerina |
| p70^{SK} | Quinasa de la proteína ribosomal S6 [<i>del inglés, 70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1</i>] |
| PARP | Poli-ADP-ribosa polimerasa [<i>del inglés, Poly-ADP-ribose polymerase</i>] |
| PAS | Estructura preautofagosomal o sitio de ensamblaje del fagóforo [<i>del inglés, Pre-autophagosomal structure or Phagophore assembly site</i>] |
| PCD | Muerte celular programada [<i>del inglés, Programmed cell death</i>] |
| PBS | Solución salina fosfato [<i>del inglés, Phosphate-buffered saline</i>] |
| PE | Fosfatidiletanolamina [<i>del inglés, Phosphatidylethanolamine</i>] |
| pH | log ₁₀ [H ⁺] |
| PHAS-I | [<i>del inglés, Phosphorylated, heat and acid stable-regulated by Insulin</i>] |
| PI | Ioduro de propidio [<i>del inglés, Propidium iodide</i>] |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-quinasa [<i>del inglés, Phosphatidylinositol 3-kinase</i>] |
| PIST | [<i>del inglés, PDZ domain protein interacting specifically with IC10</i>] |
| PKB | Proteína quinasa B [<i>del inglés, Protein Kinase B</i>] |
| PLAD | Dominio de ensamblaje en ausencia de ligando [<i>del inglés, Pre-ligand-binding assembly domain</i>] |
| PMM | Potencial de membrana mitocondrial |
| PMME | Potencial de membrana mitocondrial externa |
| PMSF | Fenilmetil sulfonil fluoruro [<i>del inglés, Phenylmethyl sulphonyl fluoride</i>] |
| POD | Dominio oncogénico Pml [<i>del inglés, Pml oncogenic domain</i>] |
| PPi | Pirofosfato [<i>del inglés, Pyrophosphate</i>] |
| PS | Fosfatidilserina [<i>del inglés, Phosphatidylserine</i>] |
| PTEN | [<i>del inglés, Phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10</i>] |
| PTP | Poro transitorio de permeabilidad |
| PUMA | Modulador de apoptosis regulado por p53 [<i>del inglés, p53-upregulated modulator of apoptosis</i>] |
| PVDF | [<i>del inglés, Polyvinylidene difluoride</i>] |
| RANKL | Receptor del ligando activador de NFκB [<i>del inglés, Receptor activator of nuclear factor-κappaB ligand</i>] |
| RBD | Dominio de unión a Ras [<i>del inglés, Ras-binding domain</i>] |

| | |
|---------------|--|
| RE | Retículo endoplásmico o endoplasmático |
| RHEB | [del inglés, <u>R</u> as <u>h</u> omologue <u>e</u> nriched in <u>b</u> rain] |
| RING | [del inglés, <u>R</u> eally <u>i</u> nteresting <u>n</u> ew <u>g</u> ene] |
| RIP1 | Proteína de interacción con el receptor [del inglés, <u>R</u> eceptor <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein <u>1</u>] |
| RNA | ARN [del inglés, <u>R</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid] |
| RNase | Ribonucleasa [del inglés, <u>R</u> ibo <u>n</u> uclease] |
| RPE | Epitelio pigmentado de retina [del inglés, <u>R</u> etinal <u>p</u> igmental <u>e</u> pithelium] |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RSK | Quinasa de la proteína ribosomal S6 [del inglés, <u>R</u> ibosomal <u>p</u> rotein <u>S</u> 6 <u>k</u> inase] |
| RT-PCR | Transcripción reversa de ARN y amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa [del inglés, <u>R</u> everse <u>t</u> ranscriptase- <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction] |
| SDS | [del inglés, <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate] |
| shRNA | [del inglés, <u>S</u> hort <u>h</u> airpin <u>R</u> NA] |
| siRNA | ARN de interferencia [del inglés, <u>S</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA] |
| Smac | Activador de caspasas derivado de mitocondria [del inglés, <u>S</u> econd <u>m</u> itochondria-derived <u>a</u> ctivator of <u>c</u> aspases] |
| SODD | Silenciador del dominio de muerte [del inglés, <u>S</u> ilencer of <u>d</u> eath <u>d</u> omain] |
| STAT | Transductores de señal y activadores de transcripción [del inglés, <u>S</u> ignal <u>t</u> ransducers and <u>a</u> ctivators of <u>t</u> ranscription] |
| STRAD | [del inglés, <u>S</u> TE20-related <u>a</u> daptor <u>p</u> rotein] |
| SV40 | [del inglés, <u>S</u> imian <u>v</u> acuolating <u>v</u> irus <u>40</u>] |
| TA | Temperatura ambiente |
| TAB | Proteína de unión a TAK1 [del inglés, <u>T</u> AK1- <u>b</u> inding <u>p</u> rotein] |
| TAE | Tris acetato EDTA [del inglés, <u>T</u> ris <u>a</u> cetate- <u>E</u> DTA] |
| TAK1 | Quinasa activada por TGF- β [del inglés, <u>T</u> GF- β <u>a</u> ctivating <u>k</u> inase <u>1</u>] |
| TBS | Solución salina de Tris [del inglés, <u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline] |
| TCA | Ácido tricloroacético [del inglés, <u>T</u> richloroacetic <u>a</u> cid] |
| TCR | Receptor de células T [del inglés, <u>T</u> - <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor] |
| TE | Tris EDTA [del inglés, <u>T</u> ris <u>E</u> DTA] |
| TEMED | Tetrametiletileno diamina [del inglés, N-N-N'-N'- <u>T</u> etramethylethylene <u>d</u> iamine] |

| | |
|--------------------------------|---|
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante [<i>del inglés, Transforming growth factor β</i>] |
| THD | Dominio de homología a TNF [<i>del inglés, TNF homology domain</i>] |
| Tiam1 | [<i>del inglés, T-cell lymphoma invasión and metastasis</i>] |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral [<i>del inglés, Tumor necrosis factor α</i>] |
| TRADD | Dominio de muerte asociado al receptor de TNF [<i>del inglés, TNF receptor-associated death domain</i>] |
| TRAF | Factor asociado al receptor de TNF [<i>del inglés, TNF receptor-associated factor</i>] |
| TRAIL | Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF [<i>del inglés, TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>] |
| TRAIL-R | Receptor de TRAIL [<i>del inglés, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>] |
| TRIS | [<i>del inglés, Trishydroxymethylaminomethane</i>] |
| TSC1 o 2 | Complejo de tuberoesclerosis [<i>del inglés, Tuberous sclerosis complex</i>] |
| U | Unidades |
| μg | microgramo |
| μl | microlitro |
| μM | micromolar |
| UPR | Respuesta a proteínas mal plegadas [<i>del inglés, Unfolded protein response</i>] |
| UVRAG | Gen asociado a la resistencia a la irradiación ultravioleta [<i>del inglés, Ultraviolet irradiation resistance-associated gene</i>] |
| V | Voltios |
| VDAC | Canal de aniones dependiente de voltaje [<i>del inglés, Voltaje-dependent anion channel</i>] |
| Vps | [<i>del inglés, vacuolar protein sorting</i>] |
| XIAP | [<i>del inglés, X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein</i>] |
| z-VAD-fmk | [<i>del inglés, Z-Val-Ala-Ala-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone</i>] |

II. RESUMEN

La autofagia es un proceso por el que las células degradan organelas, citoplasma y proteínas de vida media larga para reciclar nutrientes. Así, la autofagia actúa como una respuesta de supervivencia frente a condiciones de falta de nutrientes o cuando las células presentan organelas dañadas. Sin embargo, el aumento de la autofagia o bien una autofagia prolongada pueden contribuir a la muerte celular. El destino final de la célula va a depender del tipo de estímulo, del tipo celular o del nivel de autofagia inducida.

En esta tesis, se muestra que el ligando de la súperfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) que induce apoptosis (TRAIL), produce un aumento de la degradación de proteínas de vida media larga e induce la formación de vesículas autofágicas (autolisosomas y autofagosomas) en células epiteliales de mama MCF10A. La inhibición de la autofagia inducida por TRAIL mediante cotratamiento con 3-Metiladenina (un inhibidor de la PI3K clase-III) reduce la autofagia y sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por TRAIL. Además, la depleción de proteínas de autofagia (Beclina1 y Atg7) mediante ARNs de interferencia (siRNAs) bloquean la formación de vesículas autofágicas y sensibilizan a las células a la apoptosis mediada por TRAIL. El mecanismo por el cual TRAIL es capaz de inducir autofagia en MCF10A implica la activación de la quinasa activada por TGF- β (TAK1), que a su vez activa a otra quinasa reguladora del estado energético de la célula (AMPK), dando lugar a la inhibición de mTOR. mTOR bloquea la señalización de autofagia, por lo que su inhibición permite la formación de autofagosomas en la célula. Para que este proceso se lleve a cabo, la célula necesita que TRAIL, tras unirse a su receptor TRAIL-R2, reclute las proteínas del complejo inductor de muerte (DISC): Caspasa-8, FADD, FLIP y RIP. Además, Caspasa-8 y FADD son requeridos para la activación de la ruta TAK1-AMPK-mTOR. Por otro lado, TRAIL también activa a la quinasa de c-Jun (JNK), para

lo cual necesita la presencia de FADD y RIP1. La activación de JNK por TRAIL induce la formación de vesículas autofágicas en células epiteliales de mama. Ambas rutas parecen ser suficientes para que tenga lugar la autofagia.

En otros modelos epiteliales como las células humanas pigmentadas de retina (RPE1) o fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), TRAIL activa a AMPK de forma dependiente de TAK1. Además, en células RPE1, TRAIL es capaz de inducir autofagia mediante la activación de TAK1.

Por otro lado, en esta tesis se demuestra que la transformación oncogénica, bien utilizando modelos tumorales de mama (MCF7) o bien transformando las células epiteliales MCF10A con los oncogenes Ras y Src, bloquea la autofagia inducida por TRAIL. Además, se aportan datos que muestran que la transformación por Ras actúa entre AMPK y mTOR, ya que TRAIL es capaz de activar a AMPK pero no de inhibir a mTOR en MCF10A-Ras. Adicionalmente, se describe que las rutas PI3K/Akt y MEK/Erk están implicadas en la inhibición de la autofagia mediada por TRAIL en células transformadas con Ras.

Finalmente, se ha realizado un estudio de la relación entre apoptosis y autofagia inducidas por TRAIL en células normales y tumorales de mama, demostrando que TRAIL induce autofagia pero no apoptosis en células epiteliales de mama, e induce apoptosis pero no autofagia en células tumorales o transformadas de mama. Además, cuando se bloquea la ruta de inducción de autofagia mediada por TRAIL en MCF10A o RPE1, las células se sensibilizan a la apoptosis. De modo inverso, al bloquear la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF10A-Ras, éstas son capaces de inducir la formación de vacuolas autofágicas. Así, ambos mecanismos están interconectados, y nuestros datos sugieren que la autofagia está bloqueando la

apoptosis por debajo de la formación del DISC de TRAIL. Sin embargo, aún faltan muchos estudios por hacer para determinar qué hace que una célula decida ir a autofagia o a apoptosis y cómo se interconectan ambas rutas de señalización.

III. INTRODUCCIÓN

1. APOPTOSIS

1.1. Introducción

Durante la evolución los organismos multicelulares han desarrollado mecanismos genéticamente controlados para mantener la homeostasis de los tejidos (Prindull 1995) y eliminar las células innecesarias o dañadas (Strasser, O'Connor et al. 2000). Este proceso de muerte celular programada conocido como apoptosis (Kerr, Wyllie et al. 1972), es esencial para mantener el turnover celular durante el desarrollo embrionario (Meier, Finch et al. 2000), para conservar un sistema inmunitario efectivo, así como para la eliminación de células extrañas para el organismo (Raff, Barres et al. 1993; Vaux and Korsmeyer 1999; Strasser, O'Connor et al. 2000). Así pues, la apoptosis es un proceso fisiológico que está muy bien controlado, ya que defectos en su regulación bien por exceso o por defecto, pueden dar lugar a numerosos procesos patológicos como enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, autoinmunes o cáncer (Thompson 1995; Cory, Huang et al. 2003). En el caso de las patologías tumorales, un defecto en la apoptosis impide que las células neoplásicas entren en el programa de muerte celular, dando lugar a una población de células con defectos genéticos que proliferan incontroladamente, aumentando así la invasividad en la progresión tumoral (Reed 1999; Ionov, Yamamoto et al. 2000; Frisch and Screatton 2001; Green and Evan 2002).

1.1.1. Muerte celular programada

La muerte celular programada (PCD, del inglés Programmed Cell Death) es un proceso activo definido como muerte celular dependiente de señales o actividades que tienen lugar en la célula destinada a morir (Leist and Jaattela 2001). Las células tienen diversos procesos de suicidio controlados que, en contraste con la necrosis, evitan la

pérdida de restos celulares que daría lugar a inflamación. La PCD se ha definido según la morfología de las células agonizantes en varios tipos: 1) Apoptosis (Muerte celular Tipo 1), 2) Muerte celular autofágica (Muerte celular Tipo 2), y 3) Muerte celular no lisosomal (Muerte celular Tipo 3) (Figura 1) (Schweichel and Merker 1973; Clarke 1990).

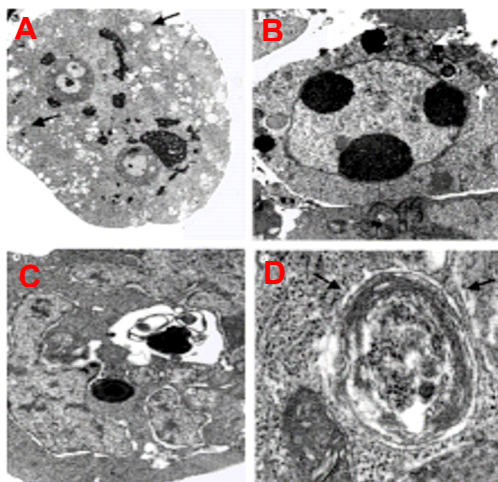


Figura 1. Morfología de la muerte celular programada por microscopía electrónica.

(A) Células epiteliales humanas en necrosis por estrés oxidativo. Se observa ruptura de la membrana plasmática, hinchazón de las organelas y pérdida de la estructura mitocondrial. (B) Células epiteliales humanas en apoptosis inducida por radiación. Se observa condensación de la cromatina e integridad de la mitocondria. (C) Células epiteliales humanas en autofagia tras el tratamiento con Tamoxifeno. Se observa una morfología normal del núcleo y la formación de vesículas autofágicas con contenido citoplásmico. (D) Amplificación de (C), donde se observa la típica doble membrana característica de las vacuolas de autofagia. (Kroemer, El-Deiry et al. 2005)

Las células apoptóticas (PCD tipo 1) sufren una serie de cambios morfológicos (Wyllie, Kerr et al. 1980): muestran un tamaño menor aunque mantienen la membrana plasmática intacta, se condensa el citoplasma y se fragmenta la cromatina y, eventualmente, se forman los llamados “cuerpos apoptóticos”, que son señales de reconocimiento para las células fagocíticas (macrófagos) u otras células para evitar que el contenido intracelular sea expuesto al sistema inmunitario y tenga lugar una respuesta inflamatoria.

Cuando una célula entra en autofagia (PCD tipo 2), muestra acumulación de vacuolas autofágicas, compuestas por organelas y material citoplásmico, pero no se observa condensación de la cromatina (Levine and Klionsky 2004).

Las células que se destruyen mediante el tipo 3 de PCD, muestran una cierta hinchazón de las organelas y formación de espacios vacíos en el citosol, sin

condensación de la cromatina, lo cual origina la lisis de la membrana plasmática, liberándose el contenido intracelular y dando lugar a una respuesta inflamatoria.

1.1.2. Apoptosis

En 1972, Kerr, Wyllie y Currie, describieron en detalle los cambios ultraestructurales característicos de células en proceso de muerte, acuñando el término de Apoptosis para describir dicho proceso (Kerr, Wyllie et al. 1972; Wyllie, Kerr et al. 1972). A partir de ese momento, se inició un profundo y amplio estudio sobre los tipos de muerte celular (Kerr, Wyllie et al. 1972). La apoptosis es el mecanismo principal por el que las células son eliminadas fisiológicamente del organismo, tras sufrir una serie de cambios morfológicos y bioquímicos. El proceso que tiene lugar en una célula en apoptosis puede dividirse en tres fases secuenciales (Figura 2): 1) *Fase de Inducción*, en la que se condensa la cromatina (picnosis) y el citoplasma se contrae. 2) *Fase de Ejecución*, donde el ADN es fragmentado por la acción de las endonucleasas (cariorexias), originando una serie de fragmentos oligonucleosomales múltiples de la unidad básica de 180-200 pares de bases (Cohen, Sun et al. 1994). En esta fase también se produce el procesamiento de sustratos intracelulares por proteólisis (Martin and Green 1995) y la externalización a la superficie de la célula del fosfolípido fosfatidilserina, que es un marcador para la acción de fagocitos (Martin, Reutelingsperger et al. 1995; Hengartner 2000). Además, el retículo endoplásmico (RE) se dilata, dando lugar a la formación de vesículas que se unen a la membrana plasmática formando una especie de burbujas alrededor de la célula (proceso conocido como zeiosis). Finalmente, la célula se fragmenta, originando los cuerpos apoptóticos. 3) *Fase de Reconocimiento y Fagocitosis*. Como consecuencia de todos estos cambios en la célula, los cuerpos apoptóticos son reconocidos por los macrófagos, que los fagocitan (Savill and Fadok 2000).

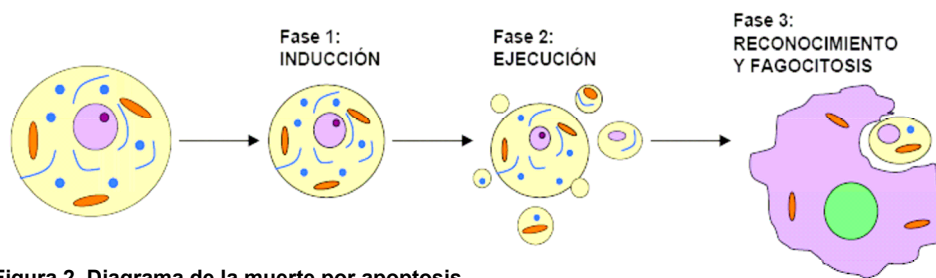


Figura 2. Diagrama de la muerte por apoptosis.

El proceso de apoptosis puede inducirse por estímulos que afectan a varios compartimentos subcelulares. Por ejemplo, puede iniciarse en la membrana plasmática externa tras la estimulación de receptores por ligandos de muerte (TNF, CD95L, TRAIL) o ausencia de señalización por integrinas (anoikis), en el núcleo tras daño al DNA (irradiación, quimioterapia), en los lisosomas (detergentes o fotosensibilizadores) o en el retículo endoplásmico tras la acumulación de proteínas mal plegadas (tunicamicina, brefeldina A) o tras la interrupción de señales mediadas por calcio (tapsigargina) (Figura 3) (Ferri and Kroemer 2001). Todos estos estímulos dan lugar a la activación de miembros de la familia de proteínas llamadas “BH3-only”, que pertenecen a las proteínas de la familia de Bcl-2, pero que sólo contienen el dominio BH3, siendo suficiente para inducir apoptosis. Cuando se activan estas proteínas, son capaces de trasladarse a la mitocondria y unirse a proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, permitiendo así que otras proteínas propaoptóticas como Bax se trasloquen a la membrana mitocondrial, liberándose factores apoptogénicos que darán lugar a la activación de caspasas y a la apoptosis (Huang and Strasser 2000; Puthalakath and Strasser 2002).

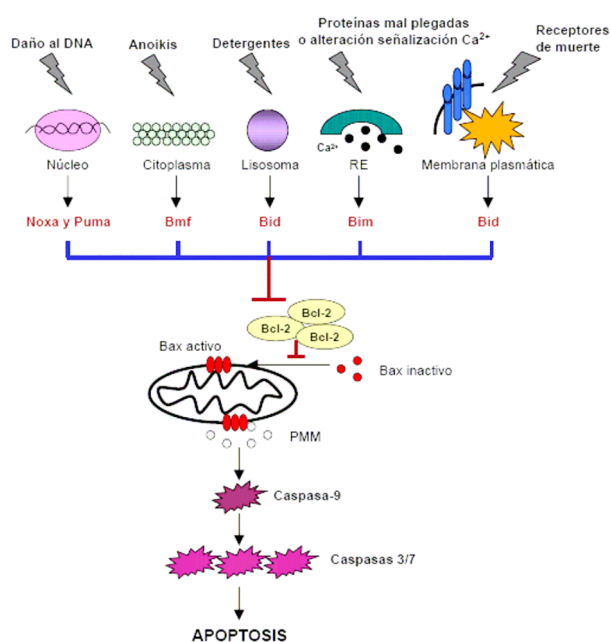


Figura 3. Estímulos que inducen apoptosis.

La apoptosis puede inducirse por varios estímulos que inducen estrés a las organelas celulares como el núcleo, el citoplasma, los lisosomas, el retículo endoplásmico (RE) o la membrana plasmática. Cada tipo de estrés activa específicamente a un miembro de la familia de proteínas “BH3-only”, que se trasloca a la mitocondria y se une a miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 (ejemplo: Bcl-2). Esto permite la activación de miembros proapoptóticos (ejemplo: Bax), que se trasloca a la mitocondria y promueve el potencial de membrana mitocondrial (PMM), liberándose factores apoptogénicos. Como consecuencia, se activa la cascada de caspasas, dando lugar a los cambios morfológicos que se observan durante la apoptosis.

1.1.3. Necrosis

La necrosis es un proceso de muerte celular con características distintas a la apoptosis y la autofagia, e inicialmente considerado como un proceso de muerte no controlado en el que se produce la disrupción de la membrana plasmática, dando lugar a la liberación de proteínas intracelulares que activan la respuesta del sistema inmunitario (Zeh and Lotze 2005). Sin embargo, muchos estudios han sugerido que la necrosis podría ser un evento regulado que contribuye al desarrollo y mantenimiento de la homeostasis tisular. De esta forma, se han utilizado diversos términos para manifestar aspectos del suicidio celular programado, tales como autolisis, oncosis (Majno and Joris 1995), piroptosis (Cookson and Brennan 2001), necrapoptosis (Lemasters 1999) y necroptosis (Degterev, Huang et al. 2005). La característica principal que distingue a la necrosis de la apoptosis es la rápida pérdida de los potenciales de membrana celular. La incapacidad de mantener estos potenciales electroquímicos tienen como consecuencia la hinchazón del citoplasma, la ruptura de

la membrana plasmática y la lisis de la célula. Esta pérdida del potencial de membrana puede deberse al daño de lípidos de membrana, a la pérdida de la función de los canales iónicos de membrana o a la depleción de la energía de la célula (Zong and Thompson 2006).

La necrosis confiere a la célula la capacidad de reclutar una respuesta reparativa o de defensa ante un daño o invasión, pudiendo ser la consecuencia de una señalización extracelular o bien iniciarse como una forma de suicidio celular en respuesta a alteraciones intracelulares. Como otros tipos de muerte celular programada, la necrosis juega un papel en numerosos procesos, como enfermedades neurodegenerativas, infecciones, enfermedades inflamatorias, exposición a toxinas o cáncer (Majno and Joris 1995; Proskuryakov, Gabai et al. 2002; Yuan, Lipinski et al. 2003).

1.1.4. Mecanismos alternativos

Además de los procesos de muerte celular anteriormente descritos, existen otros tipos de muerte celular que pueden cursar con características morfológicas similares a las de la apoptosis o la necrosis, incluso en ausencia de activación de caspasas.

1) Muerte celular programada parecida a apoptosis (“apoptosis-like”).

En este tipo de muerte celular, se producen fenómenos de apoptosis aunque en menor grado. Por ejemplo, se puede observar gran condensación citoplásmica junto a una alteración morfológica de la membrana, pero sin formarse las burbujas típicas de la apoptosis. Sin embargo, estas formas de muerte se diferencian de la apoptosis en que la mayoría de ellas son independientes de la actividad de las caspasas (Leist and Jaattela 2001).

2) Muerte celular programada parecida a necrosis (“necrosis-like”).

Las características morfológicas que tienen lugar en estos procesos se basan en una ausencia de la condensación de la cromatina, independientemente de la actividad caspasa (Leist and Jaattela 2001).

3) “Segunda necrosis” o “necrosis apoptótica”.

Se ha demostrado que numerosos estímulos pueden inducir apoptosis a bajas dosis y necrosis a dosis mayores. Incluso pueden coexistir características de apoptosis y necrosis en la misma célula en respuesta a determinadas dosis de agentes que inducen muerte. Además, si la célula no es fagocitada por las células vecinas o por los macrófagos, en los últimos estadios de la apoptosis puede presentar rasgos típicos de necrosis debido a la pérdida de la energía celular y de la integridad de la membrana plasmática (Majno and Joris 1995).

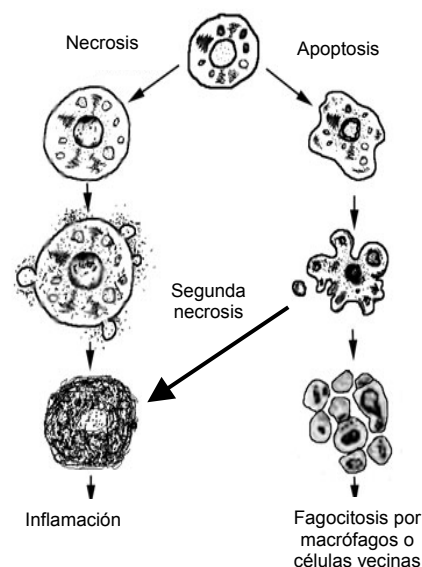


Figura 4. Célula en apoptosis, necrosis o necrosis secundaria.

1.2. Caspasas

1.2.1. Características generales

Los procesos de muerte celular apoptótica están orquestados por una familia de proteasas denominadas caspasas (cysteine aspartyl-specific proteases) (Thornberry 1997; Cryns and Yuan 1998; Thornberry and Lazebnik 1998). Las caspasas están constitutivamente sintetizadas en la célula como zimógenos inactivos enzimáticamente (procaspasas). Estos zimógenos están formados por tres dominios:

un prodominio en el extremo aminoterminal y los dominios p20 (subunidad larga) y p10 (subunidad corta), que se encuentran en la enzima activa (Hengartner 2000). En todos los casos conocidos, las caspasas activas están compuestas por heterotetrámeros, que contienen dos heterodímeros p20/p10 y dos sitios activos de catálisis (Earnshaw, Martins et al. 1999). Sin embargo, es posible que pueda haber caspasas en forma de monómeros activos bajo determinadas condiciones. Una vez activas, las caspasas son capaces de cortar gran variedad de sustratos celulares.

Los mecanismos generales por los que se pueden activar las caspasas son tres (Figura 5) (Hengartner 2000):

1) Mediante proteólisis por otra caspasa (Figura 5a). Primero se produce una proteólisis entre los dominios p20 y p10, quedando el dominio p20 unido al prodominio. Posteriormente, se produce otro corte entre el prodominio y el dominio p20, quedando libres los dominios p10 y p20. Estos tres sitios de corte tienen lugar en residuos de aspártico (Asp-X), lo que sugiere la posibilidad de una activación autocatalítica (Thornberry, Rano et al. 1997). Este tipo de activación de caspasas es un método para amplificar e integrar las señales proapoptóticas, pero no explica cómo se produce la activación de la primera caspasa.

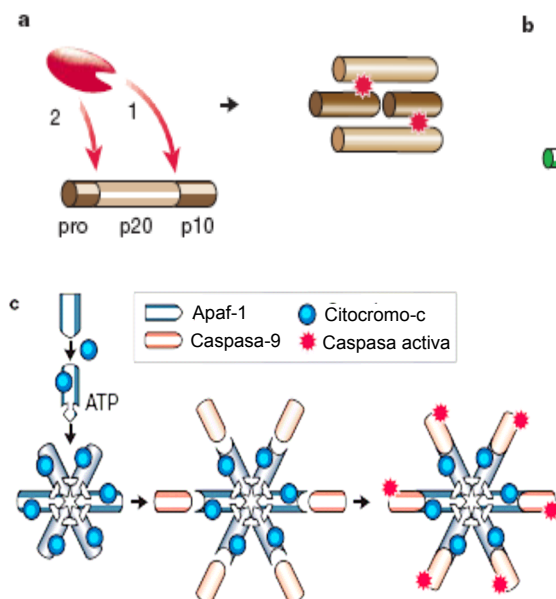


Figura 5. Mecanismos de activación de caspasas.

a) Mediante proteólisis por otra caspasa; b) Mediante proximidad; y c) Mediante asociación con una subunidad reguladora. (Adaptada de (Hengartner 2000)).

2) Por proximidad (Figura 5b). Se produce la agregación de múltiples moléculas de procaspasas (ejemplo: procaspasa-8). La proximidad con otra caspasa resulta, de alguna forma, en una activación cruzada. Un mecanismo similar parece ser el responsable de mediar la activación de otras caspasas como la caspasa-2 y la caspasa de nematodos (CED-3) (Yang, Chang et al. 1998).

3) Por asociación con una subunidad reguladora (Figura 5c). Es el mecanismo de activación más complejo y el que se produce para que se active caspasa-9. En este caso, se forma un complejo entre el citocromo-c y Apaf-1, permitiendo el reclutamiento de la procaspasa-9, lo que da lugar al apoptosoma. La activación de caspasa-9 está mediada por cambios conformacionales, no por proteólisis.

En los últimos años se ha propuesto otro modelo de activación, conocido como “modelo unificado”, que propone que la homodimerización de los zimógenos monoméricos de las caspasas es necesaria y suficiente para la activación de las caspasas iniciadoras (Boatright, Renatus et al. 2003; Donepudi, Mac Sweeney et al. 2003). Esta dimerización permite una reorganización estructural de forma que el sitio catalítico adquiere una conformación activa, independientemente de cualquier corte proteolítico (Riedl and Shi 2004).

Hasta este momento se han descrito 11 caspasas en humanos, con sus homólogos en otros organismos: caspasa-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10 y -14 (Alnemri, Livingston et al. 1996; Pistrutto, Jost et al. 2002). La primera caspasa clonada en mamíferos fue la caspasa-1, llamada inicialmente *interleukin-1 β -converting enzyme*, constituyendo la primera caspasa proinflamatoria (Martinon and Tschopp 2007). Como enzimas que participan en la maduración de citoquinas se incluyen las caspasas-1, -4 y -5 en humanos y -1, -11 y -12 en ratones (Martinon and Tschopp 2004). La caspasa-2 es la única que se localiza en el núcleo y puede activarse directamente por

daño al ADN (Zhivotovsky and Orrenius 2005). Algunos datos apuntan a que esta caspasa puede estar involucrada en la reparación del ADN. La caspasa denominada inicialmente como caspasa-13 fue posteriormente identificada como un homólogo bovino de la caspasa-4 humana (Koenig, Eckhart et al. 2001).

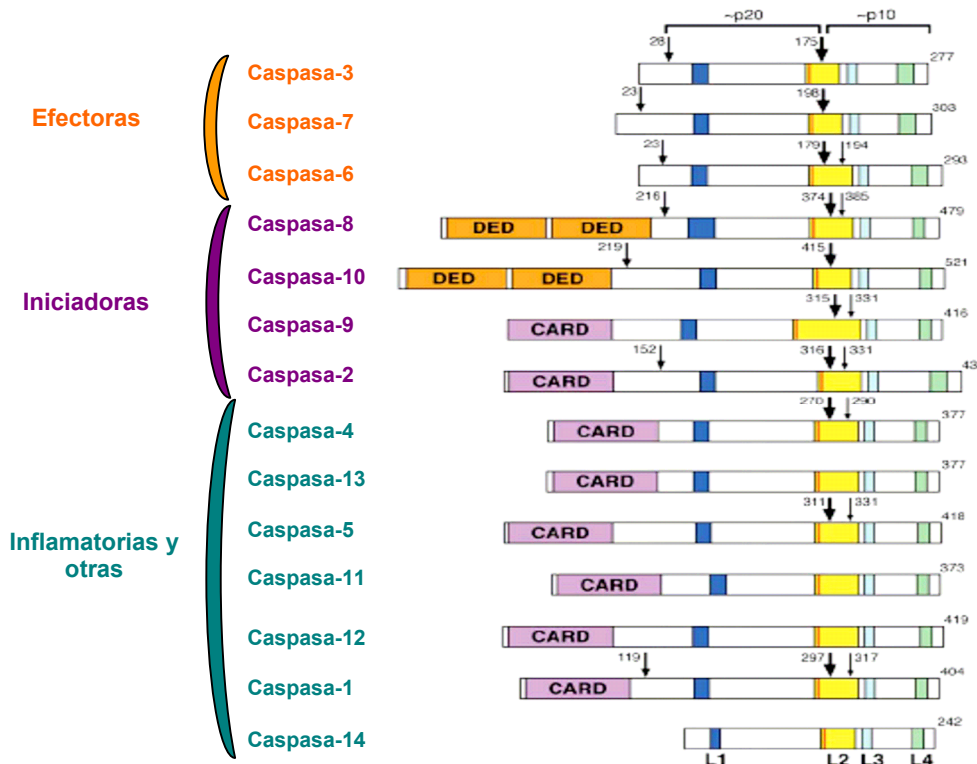


Figura 6. Diagrama esquemático de la estructura de las caspasas en mamíferos.

Excepto las caspasas-11 y -12 (ratón) y la -13 (bovina), todas las demás son humanas. La flecha ancha indica la posición del sitio de corte de la primera activación (entre las subunidades larga y corta). Las flechas medianas y más finas representan sitios adicionales de corte. El residuo de Cys responsable de la catálisis se indica con una línea roja. Los segmentos de colores representan las regiones que corresponden a los bucles que constituyen la cavidad catalítica. (Adaptada de (Shi 2002)).

Durante mucho tiempo las caspasas se han clasificado según su función dentro de la cascada apoptótica (Degterev, Boyce et al. 2003) como iniciadoras o efectoras del proceso de apoptosis (Figura 6) (Shi 2002). Sin embargo, las funciones de las caspasas son mucho más amplias que su contribución a la muerte celular (Tabla 1) (Galluzzi, Joza et al. 2008).

| Caspasa | Función en apoptosis | Otras funciones |
|------------|---|--|
| Caspasa-1 | Piroptosis (inflammasoma) | Maduración de IL-1 β , IL-18 |
| Caspasa-2 | Iniciadora/Ejecutora tras daño al ADN y durante catástrofe mitótica | Reparación ADN |
| Caspasa-3 | Ejecutora | Proliferación, Diferenciación y maduración |
| Caspasa-6 | Ejecutora | No conocida |
| Caspasa-7 | Ejecutora | No conocida |
| Caspasa-8 | Iniciadora en ruta extrínseca | Control ciclo celular, diferenciación macrofágica, proliferación células T, supervivencia por NFkB |
| Caspasa-9 | Iniciadora en ruta intrínseca | Procesos de diferenciación donde se implica caspasa-3 |
| Caspasa-10 | Iniciadora ruta extrínseca | Activación NFkB/supervivencia |
| Caspasa-11 | Muerte neuronal por MPTP | Producción de IL |
| Caspasa-12 | Iniciadora en apoptosis por estrés del RE | Atenúa inflamación; respuesta inmune innata |
| Caspasa-14 | No conocida | Diferenciación queratinocitos |

Tabla 1. Funciones de las caspasas.

Abreviaturas: IL, Interleucina; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; RE, retículo endoplásmico. (Adaptada de (Galluzzi, Joza et al. 2008)).

1) Caspasas iniciadoras. Son aquellas que se activan en primer lugar tras el estímulo de apoptosis, mediante autocatálisis por proximidad. Estas caspasas contienen prodominios largos con motivos de interacción proteína-proteína: dominios de activación y reclutamiento de caspasas (CARD) y dominios efectores de muerte (DED). Así, pueden interactuar con proteínas adaptadoras. En este grupo de caspasas se incluyen la caspasa-1, -2, -4, -5,-8, -9 y -10. Las caspasas -1, -4 y -5 forman a su vez un subgrupo, ya que están implicadas en apoptosis y en el control de la respuesta inflamatoria (Figura 6).

2) Caspasas efectoras o ejecutoras. Son aquellas que cortan múltiples sustratos celulares necesarios para la supervivencia de la célula, como proteínas del citoesqueleto (actina, fodrina, plectina), proteínas que regulan la reparación del ADN (PARP), proteínas del ciclo celular (MDM2), etc. Estas caspasas poseen un prodominio corto, pero no poseen los dominios CARD o DED. Normalmente se procesan y activan por las caspasas iniciadoras. Dentro de este grupo nos encontramos con las caspasas-3, -6 y -7 (Figura 6).

En resumen, las caspasas efectoras se activan normalmente por proteólisis mientras que las caspasas iniciadoras se activan por interacción proteína-proteína (Hengartner 2000).

1.2.2. Inhibidores de caspasas: IAPs y FLIP

La regulación de las caspasas es crítica para el desarrollo y supervivencia de un organismo. De hecho, la activación inadecuada de estas enzimas puede dar lugar al desarrollo de enfermedades. Así, la sobreactivación de las caspasas está implicada en desórdenes neurodegenerativos, mientras que la supresión inapropiada de las caspasas está relacionada con el desarrollo de muchos tumores (Hunter, LaCasse et al. 2007). Aunque las caspasas pueden regularse de forma transcripcional y post-traducciona (Earnshaw, Martins et al. 1999), una vez activadas existen diversos mecanismos de regulación mediante ubiquitinación (Huang, Joazeiro et al. 2000) o bien mediante proteínas que inhiben su actividad.

1) **IAPs**. Son una familia de proteínas celulares que se han identificado como inhibidores específicos de caspasas, siendo las únicas proteínas endógenas capaces de regular la actividad de las caspasas efectoras e iniciadoras. Se identificaron por primera vez en *baculovirus*, que usaban los IAPs para permitir la propagación viral previniendo una respuesta apoptótica defensiva en la célula huésped infectada (Harvey, Soliman et al. 1997; Deveraux and Reed 1999). Estas proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) funcionan como reguladoras de la cascada de apoptosis. Entre los IAPs identificados en mamíferos, se encuentran XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP, Survivina, Livina y BRUCE.

Los IAPs se caracterizan por tener un dominio denominado BIR (Baculoviral IAP Repeat) de unos 70-80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de zinc, formando una estructura globular que consiste en cuatro o cinco hélices- α y un

número variable de hojas- β plegadas antiparalelas (Hinds, Norton et al. 1999). Como se resume en la Figura 7, los IAPs también contienen dominios RING (Really Interesting New Gene), cuya estructura es en dedos de zinc, y actúan como ubiquitin-ligasas regulando directamente la degradación de proteínas y la propia ubiquitinación (Yang, Fang et al. 2000). Es el caso de XIAP, c-IAP1 y c-IAP2. Únicamente c-IAP1 y c-IAP2 poseen un dominio CARD. Aunque la función de estos dominios en los IAPs no se conoce muy bien, probablemente permitan la interacción proteína-proteína, tal vez con Apaf-1 o con algunas proteínas que contengan DED o DD (Martin 2001).

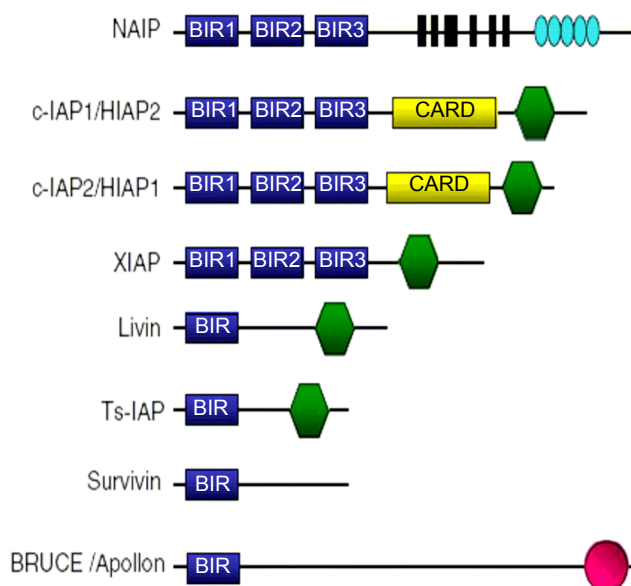


Figura 7. Esquema de la familia de proteínas IAPs y su estructura.

Diversas proteínas inhibidoras de apoptosis con sus respectivos dominios estructurales. Los hexágonos verdes representan los dominios RING; las barras negras indican un sitio de unión para nucleótidos; los óvalos celestes indican dominios ricos en leucina; y el círculo rosa representa un dominio UBC (ubiquitin-conjugation). Adaptada de (Srinivasula and Ashwell 2008) y (Hunter, LaCasse et al. 2007).

Tanto c-IAP1 como c-IAP2 se identificaron por su capacidad de interacción física con factores asociados al receptor de TNF (TRAF2) (Rothe, Wong et al. 1994; Rothe, Pan et al. 1995). Estudios más recientes muestran que el dominio BIR se fusiona con la proteína MALTI (Mucose-associated lymphoid tissue), un mediador de la activación de NF κ B, independientemente de TNF (Varfolomeev, Wayson et al. 2006). Estos datos sugieren que antagonistas de IAPs podrían unirse al dominio BIR, dando lugar a una autoubiquitinación y rápida degradación proteosomal de los c-IAPs, que conlleva a la muerte celular dependiente de la señalización de TNF y de la biosíntesis

de nuevas proteínas. Adicionalmente, se observó que los IAPs funcionaban como reguladores de NFκB, además de promover la degradación proteosomal de NIK (NFκB-inducing kinase), implicada en la ruta no canónica de NFκB. Así, los antagonistas de los IAPs inducen la activación de las rutas canónica y no canónica de NFκB (Varfolomeev, Blankenship et al. 2007).

2) cFLIP. Es una proteína inhibidora que se expresa predominantemente en tejido muscular y linfoide, estando implicada en la homeostasis de los tejidos como importante reguladora en apoptosis (Irmeler, Thome et al. 1997). Esta proteína inhibe la activación de caspasa-8 y -10 a nivel del complejo asociado al receptor (Bertin, Armstrong et al. 1997; Hu, Vincenz et al. 1997; Thome, Schneider et al. 1997). Existen varias formas de cFLIP a nivel de ARNm, pero sólo dos de ellas se han detectado a nivel de proteína, como son la forma larga (FLIP_L) y la forma corta (FLIP_S) (Hu, Vincenz et al. 1997; Scaffidi, Schmitz et al. 1999). Recientemente se ha descrito una tercera isoforma de cFLIP (FLIP_R), presente en células T y B y células primarias humanas T (Golks, Brenner et al. 2005). La forma corta FLIP_S contiene dos dominios efectores de muerte (DED), similares a los de los prodominios de las caspasas-8 y -10, y está estructuralmente relacionado con el inhibidor de apoptosis viral v-FLIP (Thome, Schneider et al. 1997). De forma similar a FLIP_S, la isoforma FLIP_R también contiene dos dominios DED en tándem, pero no los dominios similares a caspasas. Esta isoforma se clonó en células Raji, y tiene funciones similares a las de FLIP_S en la apoptosis mediada por receptores de muerte (Golks, Brenner et al. 2005). Por otro lado, FLIP_L contiene dos dominios efectores de muerte y un dominio idéntico en tamaño al de caspasa-8, pero el residuo Cys del centro activo está sustituido por un residuo Tyr, de manera que es inactivo (Rasper, Vaillancourt et al. 1998). FLIP_L y FLIP_S interaccionan con la molécula adaptadora FADD y la procaspasa-8 (Muzio, Chinnaiyan et al. 1996) en el complejo de receptores conocido como DISC, inhibiendo

la apoptosis inducida por los receptores de muerte conocidos. FLIP_L es cortado por la caspasa-8, pero como el inhibidor no tiene capacidad catalítica, no puede cortar a dicha caspasa, produciéndose una inhibición de la activación de la misma, y bloqueando así la señalización hacia apoptosis (Krueger, Schmitz et al. 2001). Por tanto, parece que FLIP_L actúa solamente como inhibidor de la apoptosis, impidiendo la activación de caspasa-8 en el DISC. No obstante, se ha observado que FLIP_L se expresa en los tejidos celulares independientemente de su sensibilidad a la apoptosis inducida por receptores de muerte. Además, la relación 1:100 que suele haber entre FLIP_L y caspasa-8 en las células no parece correlacionar con el hecho de que FLIP_L actúe como inhibidor de caspasa-8. Por otro lado, recientemente se ha descrito que la ausencia de FLIP sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por receptores de muerte, de forma dependiente de caspasa-8 y de FADD e independiente de ligando, indicando que FLIP inhibe la muerte espontánea independiente de ligando y la apoptosis mediada por receptores de muerte (Wilson, McLaughlin et al. 2007). Y finalmente, se ha descrito que en función de la concentración intracelular de la proteína, FLIP_L puede actuar como activador de las caspasas-8 y -10 (Chang, Xing et al. 2002; Micheau, Thome et al. 2002; Boatright, Deis et al. 2004). Todos estos datos apuntan a que FLIP_L puede tener diversas funciones. Sin embargo, de FLIP_S sólo se conoce la función inhibidora de la apoptosis.

1.3. Mecanismos de inducción de apoptosis

1.3.1. Introducción

Se han caracterizado dos rutas de activación de caspasas (Green 2000; Wang 2001): **1) La ruta mitocondrial o ruta intrínseca**, inducida por diversos estímulos de estrés celular, y **2) La ruta de los receptores de muerte o ruta extrínseca**, iniciada por

la unión de ligandos a receptores de muerte transmembrana (ejemplos: CD95, TNFR, TRAIL-R). Según el mecanismo de activación de la apoptosis, las células se han clasificado en dos tipos: Tipo 1, en las que la activación de la ruta extrínseca es suficiente para la ejecución de la apoptosis; y Tipo 2, que requiere la activación de la vía mitocondrial para inducir una completa apoptosis (Ozoren and El-Deiry 2002). Ambas rutas dan lugar a la formación de un complejo de proteínas inicial donde se van a reclutar caspasas iniciadoras, que se activarán por proximidad (Figura 8).

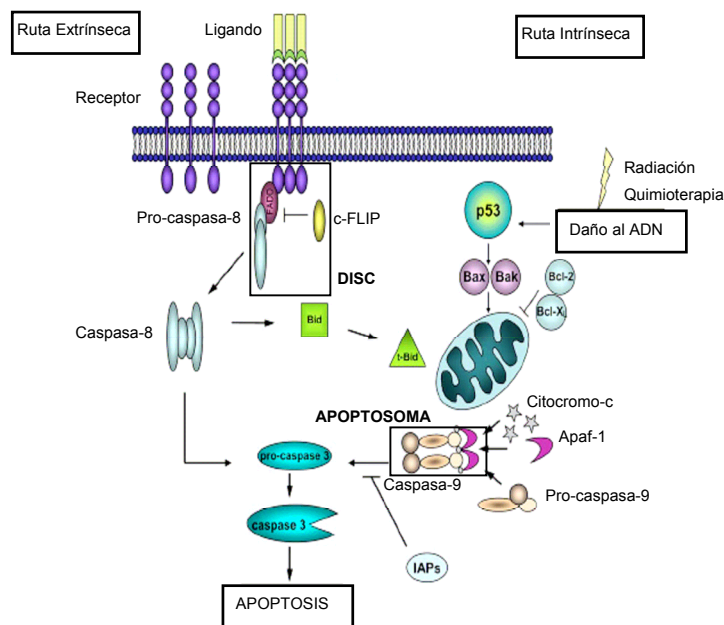


Figura 8. Esquema de las rutas extrínseca e intrínseca de apoptosis. (Adaptado de (Duiker, Mom et al.

Además, puede haber interacciones entre la ruta intrínseca y la extrínseca, de forma que caspasa-8 puede activar proteolíticamente a Bid, que facilita la liberación de citocromo-c de la mitocondria (Green 2000). Esto amplifica la señal apoptótica tras la activación por receptores de muerte, pudiendo haber diferencias entre la dependencia de esta amplificación en diversos tipos celulares (Fulda, Meyer et al. 2001).

Existen otras vías no canónicas de activación de apoptosis: **3) Vía de activación de caspasas específica de células T y NK** (natural killer), en la que dichas

células inducen la exocitosis de gránulos, que contienen granzimas, para eliminar las células infectadas por virus (Ko, Park et al. 2007). Las granzimas son capaces de cortar sustratos en residuos de aspártico (ejemplo: caspasas). **4) Vía nuclear de regulación de apoptosis basada en los denominados “cuerpos nucleares” o PODs** (Dominios oncogénicos PMLs), en los que se localizan proteínas que pueden promover apoptosis (ejemplo: Daaz, Zip, Par4). Se ha observado una relación entre los defectos en el ensamblaje de estas estructuras nucleares y diversos cánceres (Salomoni and Pandolfi 2002; Kawai, Akira et al. 2003). **5) Vía de activación de caspasas por estrés del retículo endoplásmico.** La acumulación de proteínas mal plegadas estresa al retículo endoplásmico, dando lugar a una respuesta (conocida como UPR), en las que se induce muerte celular por activación del multidominio formado por Bax y Bak en la membrana mitocondrial externa. El estrés del retículo induce la activación proteolítica de Bid, siendo la caspasa-2 la proteasa premitocondrial que corta a Bid (Upton, Austgen et al. 2008). Los eventos de la señalización que conectan el retículo endoplásmico con la maquinaria de apoptosis no están claros, aunque la inhibición de esta ruta contribuye a la pérdida celular en muchas enfermedades degenerativas humanas. **6)** Se ha descrito una *vía de apoptosis inusual* inducida por un producto esteroideo natural (cephalostatina), que proviene del gusano marino *Cephalodiscus cilchristi* (Pettit, Xu et al. 1994). Este compuesto induce selectivamente a Smac/DIABLO, pero no produce liberación de citocromo-c de la mitocondria. Sin embargo, se requiere caspasa-9 para la apoptosis, que se activa sin la participación del apoptosoma (Dirsch, Muller et al. 2003; Lopez-Anton, Rudy et al. 2006). Por otro lado, se ha visto que el estrés del retículo endoplásmico asociado a la caspasa-4 contribuye a la activación de caspasa-9 mediada por cephalostatina (Rudy, Lopez-Anton et al. 2008).

Además de las caspasas, existen otras proteasas que parecen tener importancia en diversos mecanismos de muerte, como son las catepsinas B, D y L, las calpaínas y las granzimas A y B (Johnson 2000; Leist and Jaattela 2001). Las catepsinas están implicadas en la muerte celular dependiente o independiente de caspasas (Foghsgaard, Wissing et al. 2001), liberándose de los lisosomas al citosol o al núcleo, lo que da lugar a la aparición de cambios morfológicos similares a la apoptosis. El mecanismo por el cual las catepsinas se traslocan desde los lisosomas así como la señalización que lleva a su activación está aún por determinar. Las calpaínas son proteasas citosólicas dependientes de calcio, cuya actividad está principalmente regulada por los niveles de calcio libre en el citosol y por su inhibidor endógeno (calpastatina). Estas proteasas pueden cooperar con las caspasas para inducir apoptosis (Wood and Newcomb 1999; Li, Kondo et al. 2000) y mediar la muerte celular programada independiente de caspasas.

Según el contexto y el tipo celular, el daño o estrés pueden inducir uno u otro mecanismo o bien la combinación de varios de ellos.

1.3.2. Ruta intrínseca o mitocondrial

La ruta intrínseca de inducción de apoptosis está mediada por la pérdida de señales de factores de crecimiento en tejidos embrionarios o por un gran estrés para la célula en tejidos adultos (ejemplo: daño al ADN, que a su vez puede inducirse por radiación o drogas quimioterápicas) (Coultas and Strasser 2003; Letai 2005; Fulda and Debatin 2006). Esta ruta está controlada por interacciones entre proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia de proteínas Bcl-2. De esta forma, los miembros pro-apoptóticos pueden causar permeabilización de la membrana mitocondrial externa y aumentar la liberación de moléculas solubles como citocromo-c y Smac/DIABLO al citoplasma. La salida de citocromo-c estimula la formación del

apoptosoma, complejo proteico que comprende Apaf-1, dATP, citocromo-c y caspasa-9. Una vez en el apoptosoma, la caspasa-9 se activa, activando como consecuencia a otras caspasas efectoras como las caspasas-3, -6 y -7 (Figura 8). Por otro lado, Smac/DIABLO se une a los IAPs para evitar su función inhibitoria sobre las caspasas (Henry-Mowatt, Dive et al. 2004).

La proteína supresora de tumores, p53, es un punto de regulación crítica en la ruta intrínseca. Responde a estímulos de estrés celular induciendo una parada en el ciclo celular, mediada por la expresión de genes como p21. En los casos en los que el daño al ADN es tal que la célula no es capaz de repararlo, p53 induce apoptosis promoviendo la expresión de otros genes (ejemplo: Puma, Noxa, Bax, Apaf-1, Fas, DR5) (Vousden and Lu 2002), o bien inhibiendo la expresión de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL) (Wu, Mehew et al. 2001).

1.3.2.1. La mitocondria

El papel de la mitocondria en la ruta intrínseca de apoptosis es crucial. A partir de su activación por moléculas de señalización o estímulos patológicos, se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, que da lugar a la liberación de proteínas del espacio intermembrana al citosol. Entre estas proteínas se incluyen moléculas apoptogénicas como citocromo-c, Smac/DIABLO, HtrA2 (Omi), AIF y DNAsaG (Wang 2001; Green and Evan 2002). El incremento en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa es muy importante en la señalización hacia apoptosis, y está directamente regulada por miembros de la familia de proteínas de Bcl-2 (Desagher and Martinou 2000; Tsujimoto 2003). El modelo que se describió inicialmente para explicar el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial se basó en la hipótesis de la permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial (MPT) (Zoratti and Szabo 1995). El modelo más aceptado para explicar el

mecanismo de la MPT, describe que la MPT ocurre una vez que se abre el llamado poro de permeabilidad transitoria (PTP) para permitir el paso de agua y moléculas de hasta 1'5 KDa. Este poro consiste en un canal de aniones voltaje dependiente (VDAC) en la membrana externa, en un transportador de nucleótidos de adenina (ANT) en la membrana interna, en ciclofilina-D (Cyp D), y posiblemente en otras moléculas (Crompton 2003). Hay algunas evidencias que muestran que el poro PTP puede formarse en ausencia de ANT (Kokoszka, Waymire et al. 2004).

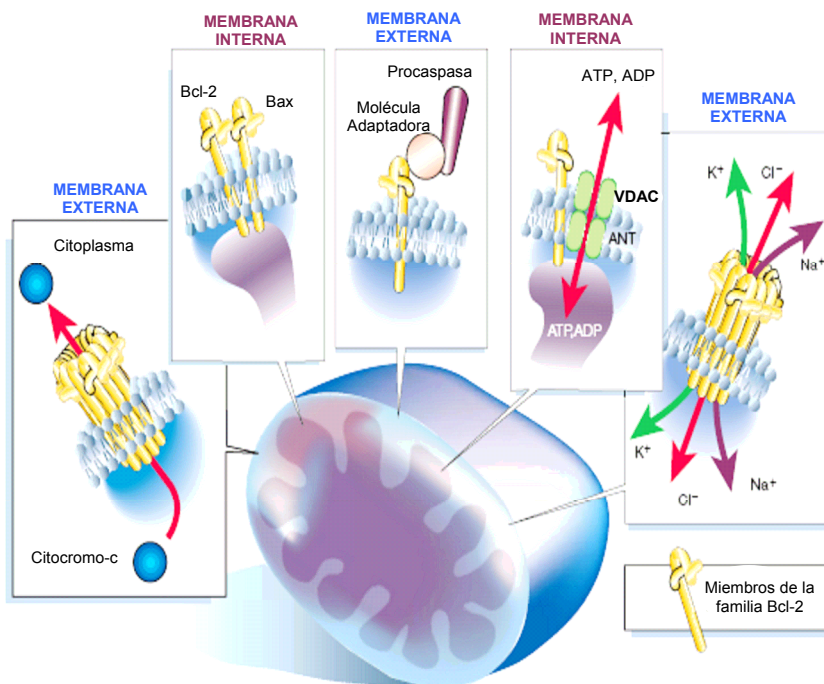


Figura 9. Mecanismos de acción de la mitocondria.

La figura muestra los mecanismos en los que está implicada la membrana externa (azul) e interna (morado) de la mitocondria. En primer lugar, se forma un poro por el cual citocromo-c y otras proteínas escapan al citosol. Por otro lado, se producen heterodimerizaciones entre proteínas pro y anti-apoptóticas, formando moléculas asimétricas. Las caspases también pueden regular a la mitocondria a través de moléculas adaptadoras, como se ha descrito en *C.elegans*. Se puede producir una interacción con otras proteínas mitocondriales como VDAC y ANT, generándose un poro para la salida de citocromo-c o para modular la homeostasis mitocondrial (mediante la apertura del PTP). Finalmente, miembros de la familia de Bcl-2 pueden oligomerizarse para formar un canal de iones selectivo. (Adaptada de (Hengartner 2000)).

La apertura del poro PTP puede producirse por varios estímulos, dando lugar a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, ya que a través de esta membrana se produce el equilibrio iónico; al hinchamiento de la matriz mitocondrial debido a la

entrada de agua, produciéndose la ruptura de la membrana mitocondrial externa. En la Figura 9 se muestran los mecanismos de acción que tienen lugar en la mitocondria.

Hay otro tipo de mecanismo en el que ni el PTP ni la membrana mitocondrial interna juegan un papel importante. En este caso, son las proteínas de la familia Bcl-2 las que están implicadas, actuando directamente sobre la membrana mitocondrial externa. De esta forma, las proteínas anti-apoptóticas bloquearían la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, mientras que las proteínas pro-apoptóticas la promoverían.

Una vez que se permeabiliza la membrana mitocondrial externa, se desencadenan una serie de procesos que llevan a la muerte celular: desbaratamiento de la cadena de transporte de electrones, de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP (Eguchi, Shimizu et al. 1997; Bossy-Wetzler, Newmeyer et al. 1998); alteración del potencial redox (reducción-oxidación) de la célula (Bredesen 1995) y liberación de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria. Todo este proceso lleva finalmente a la muerte de la célula.

1.3.2.2. La familia de proteínas Bcl-2

Los miembros de la familia de Bcl-2 (B leukemia/lymphoma2) lo componen unas 20 proteínas homólogas en mamíferos, que incluyen proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas que forman una compleja red para regular el destino de la célula (Cory and Adams 2002; Danial and Korsmeyer 2004). La disrupción entre el balance impuesto por las proteínas Bcl-2 puede dar lugar a la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Raff, Whitmore et al. 2002) o a cáncer (Baliga and Kumar 2002). Las proteínas Bcl-2 se definen por su estructura y función (Figura 10), caracterizándose porque poseen al menos uno de los dominios de homología de Bcl-2, conocidos como dominios BH. Se pueden clasificar en tres tipos:

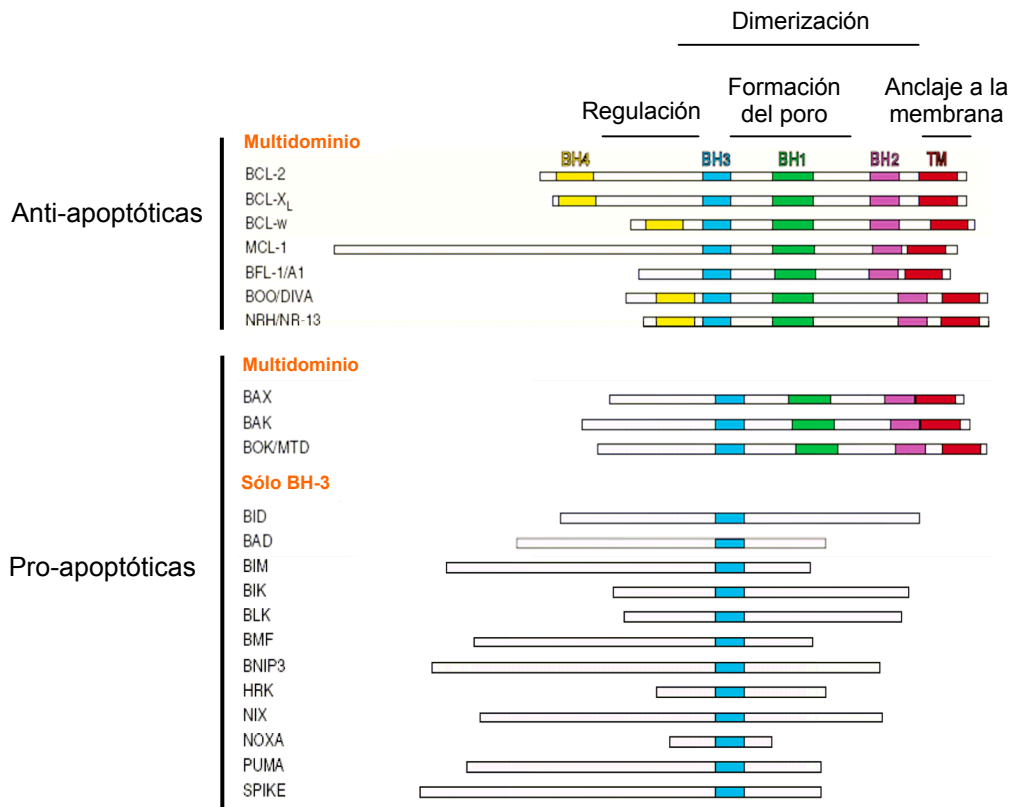


Figura 10. Estructura de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2. TM: Transmembrana. Adaptada de (Walensky 2006).

1) **Miembros anti-apoptóticos.** Poseen al menos tres de los cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH1-4). Estos dominios BH1-BH4 intervienen en las interacciones con otras proteínas de la familia y con moléculas de la cara interna de las membranas intracelulares (mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo). Los dominios BH1-BH3 forman un surco hidrofóbico, mientras que el dominio BH4 (extremo aminoterminal) es el encargado de estabilizar dicha estructura (Petros, Medek et al. 2001). El surco hidrofóbico puede unir la hélice- α del dominio BH3 de otra proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 (Sattler, Liang et al. 1997). Pero para que esto ocurra, es necesario que los miembros pro-apoptóticos expongan su dominio BH3 tras una modificación post-traduccional o un cambio conformacional (Conus, Kaufmann et al. 2000).

Por otro lado, los miembros anti-apoptóticos pueden convertirse en proteínas pro-apoptóticas mediante la eliminación del dominio BH4 aminoterminal por proteólisis (Lindenboim, Yuan et al. 2000) o bien tras un cambio conformacional provocado al unirse a otras proteínas (Lin, Kolluri et al. 2004). Además, la proteína Bcl-2 puede tener otras funciones, como reguladora de la caspasa-2 (Cory and Adams 2002) o de la proteína de autofagia beclina-1 (Pattingre, Tassa et al. 2005).

2) Miembros pro-apoptóticos Multidominio (tipo Bax). Este grupo tiene un importante papel en la señalización de la apoptosis. En su estructura, contienen los dominios BH1, BH2 y BH3, pero no el BH4. Son exclusivamente pro-apoptóticos, y entre ellos se encuentran Bax, Bak y Bok/Mtd. Los dos primeros son esenciales para la apoptosis en muchos tipos celulares (Zong, Lindsten et al. 2001), mientras que la expresión de Bok parece estar restringida a tejidos reproductores (Hsu, Kaipia et al. 1997). También se ha visto que tanto Bax como Bak pueden estar implicadas en la regulación de la homeostasis del calcio en el retículo endoplásmico, mediando la apoptosis inducida por agentes movilizadores de calcio (Scorrano, Oakes et al. 2003). No podemos olvidar el papel que juegan los miembros pro-apoptóticos en la apoptosis mediada por receptores, principalmente por TRAIL, donde inducen la liberación de citocromo-c y Smac/DIABLO de la mitocondria (Kandasamy, Srinivasula et al. 2003). Respecto al mecanismo de acción de este grupo, se sabe que la cola carboxiterminal de Bax se encuentra plegada en el surco hidrofóbico, evitando que Bax se inserte en membranas. La retracción de esta cola carboxiterminal da lugar a la traslocación de Bax a la mitocondria (Nechushtan, Smith et al. 1999). Una vez adheridos en la membrana mitocondrial, sufren un cambio conformacional que los activa y los lleva a insertarse de manera estable en la membrana y oligomerizarse, provocando la permeabilización de dicha membrana (Borner 2003)

3) Miembros pro-apoptóticos sólo BH3. Este grupo de proteínas tan sólo comparte el dominio BH3. Se han identificado unos 10 miembros, dentro de los cuales se encuentran Bid, Bad, Bim, Bmf y Bik (Huang and Strasser 2000). En los últimos años, se han descrito nuevas proteínas “sólo BH3” con funciones reguladoras de otras rutas de señalización. Es el caso de Beclina1, que contiene un dominio BH3 conservado necesario y suficiente para su interacción con Bcl-X_L. Esto implica que Beclina1 podría tener un papel en la señalización inicial de apoptosis, que podría estar relacionada con la capacidad de beclina 1 de suprimir la formación de tumores (Oberstein, Jeffrey et al. 2007).

Estas proteínas actúan por encima de los miembros pro-apoptóticos Bax y Bak, ya que sin su presencia no son capaces de inducir muerte celular (Zong, Lindsten et al. 2001). Su función es la de sensar y mediar la apoptosis inducida por distintas señales de muerte, específicas de cada tipo. Así, Bim está implicado en la muerte de linfocitos tras la privación de citoquinas (Bouillet, Metcalf et al. 1999), Bmf es necesario en anoikis (Puthalakath, Villunger et al. 2001), y Noxa y Puma median la apoptosis inducida por p53 tras el daño al ADN (Oda, Ohki et al. 2000; Nakano and Vousden 2001). Recientemente, se han descrito nuevas funciones para algunos de ellos. Por ejemplo, Bim y Bmf están implicados en el vaciamiento de los acinos de células epiteliales de mama durante la morfogénesis de la glándula mamaria (Reginato, Mills et al. 2005; Mailloux, Overholtzer et al. 2007; Schmelzle, Mailloux et al. 2007).

Parece que el mecanismo de acción de la mayoría de ellos, excepto en el caso de Bid y Bim, es unirse a los miembros anti-apoptóticos de Bcl-2 (Cory and Adams 2002), neutralizándolos. Por su parte, Bid puede además activar directamente a Bax y Bak para la liberación de citocromo-c (Wei, Lindsten et al. 2000; Grinberg, Sarig et al. 2002).

1.3.3. Ruta extrínseca o de receptores de muerte

A diferencia de la ruta intrínseca, en la que el estímulo de apoptosis actúa directa o indirectamente sobre la mitocondria, en la ruta extrínseca participan receptores de membrana que se denominan Receptores de Muerte y la vía de señalización de apoptosis implica la activación en cascada de caspasas iniciadoras y efectoras.

1.3.3.1. Receptores de muerte

Los receptores de muerte son miembros de la familia de los receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Son proteínas transmembrana tipo-I (extremo aminoterminal expuesto en la cara externa para su unión al ligando) y se caracterizan por contener entre dos y cuatro dominios extracelulares ricos en cisteínas (CRD), para la unión de los ligandos, y un dominio intracelular de muerte de unos 80 aminoácidos (DD), que sirve para reclutar proteínas adaptadoras como TRADD o FADD (Ashkenazi and Dixit 1998). La homotrimerización de los receptores en la membrana se produce por la unión de ligandos específicos de la familia de TNF, que son proteínas de membrana tipo-II homotriméricas, que tienen el extremo carboxiterminal en el espacio extracelular. Se unen a los receptores a través de una región de 150 aminoácidos en el extremo carboxiterminal, denominado Dominio de homología a TNF (THD) (Bodmer, Schneider et al. 2002).

Hay varias formas de regular la activación de los receptores de muerte. Por ejemplo, el estatus del ligando es crítico para la activación de receptores de Fas o de TRAIL. De esta forma, cuando el ligando pasa de estar en su forma de unión a membrana (ejemplo: FasL) a ser soluble (sFasL), no se afecta su capacidad de unirse al receptor, pero disminuye drásticamente su actividad citotóxica, por lo que pueden funcionar como inhibidores de la señalización hacia apoptosis (Gruss and Dower 1995; Schneider and Tschopp 2000). Por otro lado, algunos de los receptores de esta

familia, no poseen el dominio DD, por lo que carecen de la capacidad para transmitir la señal de apoptosis, funcionando también como inhibidores. A este tipo de receptores se les llama Receptores Señuelo o Decoy (MacFarlane 2003).

Las proteínas intracelulares que interaccionan con la ruta de apoptosis son moduladores de los receptores de muerte. Así, FLIP, que tiene la misma estructura que caspasa-8 pero carece de la actividad proteasa, interacciona con FADD y caspasa-8 para inhibir la señal de apoptosis mediada por los receptores de muerte y, al mismo tiempo, activar otras rutas de señalización como la que lleva a la activación de NFκB (Schneider and Tschopp 2000).

Receptores o ligandos son funcionales cuando forman multímeros mediante puentes disulfuro entre los CRD y los THD (Banner, D'Arcy et al. 1993). La unión ligando-receptor produce la activación del receptor, y puede inducir proliferación, movilidad o invasividad, aunque su principal función es inducir apoptosis (Barnhart, Legembre et al. 2004).

Aunque se han descrito gran variedad de receptores de muerte y sus ligandos (Figura 11), los más estudiados han sido principalmente tres: Fas/FasL, TNFR/TNF y TRAIL-R/TRAIL. A continuación, hablaremos más en detalle de cada uno de ellos.

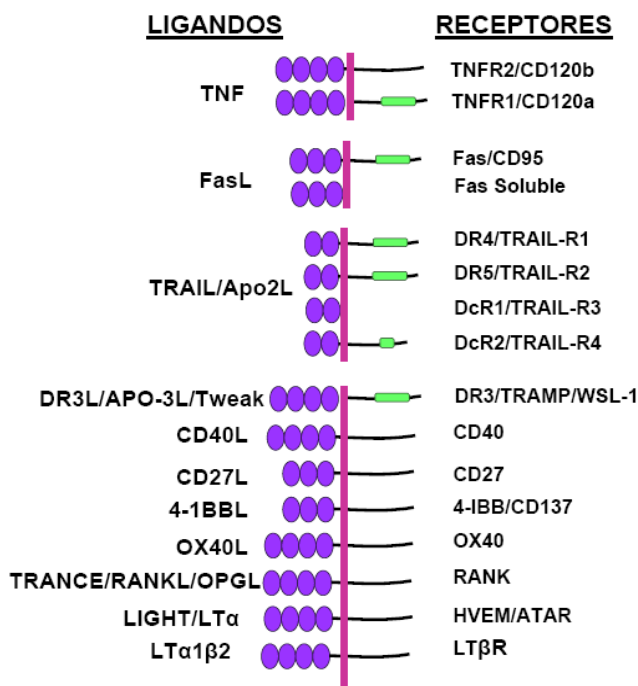


Figura 11. Ligandos y Receptores de la familia de TNF. En color lila se representan los dominios ricos en cisteínas (CRDs) extracelulares y en verde los dominios de muerte (DD) intracelulares.

1) Fas/CD95/APO-1.

El receptor Fas, miembro de la familia de TNF, es una molécula glicosilada de 45-52 KDa, que se identificó en 1991 (Itoh, Yonehara et al. 1991). Contiene entre dos y seis dominios ricos en cisteínas (CRDs) en su región extracelular, un dominio transmembrana para su anclaje en la membrana de la célula y un dominio intracitoplásmico de muerte (DD) cerca de la región carboxiterminal. Es una proteína de tipo-I, que puede también encontrarse de forma soluble, generada por splicing alternativo (Cheng, Zhou et al. 1994). Fas se expresa en distintos tipos de células, principalmente en timo, células T activadas, linfocitos B, macrófagos, hígado, bazo, pulmón, testículos, cerebro, corazón, intestino y ovarios. Su expresión puede verse aumentada por citoquinas como IFN- γ o TNF, o por la activación de linfocitos (Zimmermann, Bonzon et al. 2001). Sin embargo, la expresión del ligando está más restringida (células inmunes: linfocitos T y B, macrófagos, células NK; y células no inmunes: testículos, hígado, pulmón, intestino y ojo), y sólo se induce bajo determinadas condiciones (Watanabe-Fukunaga, Brannan et al. 1992). Debido a que la interacción de Fas/FasL suprime las células activadas en el sistema inmune periférico, los defectos en esta ruta predisponen a enfermedades autoinmunes (Orlinick, Vaishnav et al. 1999).

La unión de FasL a su receptor produce una rápida formación del complejo inductor de muerte (DISC) a través de los dominios de muerte en la región carboxiterminal (DD) (Medema, Scaffidi et al. 1997). Así pues, la proteína moduladora FADD, que tiene un dominio de muerte, se une al DD del receptor mediante una unión DD-DD (Ashkenazi and Dixit 1998). Además, FADD contiene un dominio efector de muerte (DED) en su región aminoterminal, que permite el reclutamiento de la pro-caspasa-8, que se une al DED. Una vez que se agregan dos o más moléculas de pro-caspasa-8, ésta se activa por procesamiento autoproteolítico inducido por proximidad.

A este complejo también se le une la proteína inhibidora c-FLIP, que debido a su falta de actividad proteasa, no induce señalización de muerte. Se ha visto que IL-2 puede inhibir la expresión de c-FLIP (Refaeli, Van Parijs et al. 1998), lo que podría explicar que IL-2 sensibilice a células T activadas a Fas. Sin embargo, otros estudios apuntan a que c-FLIP no se recluta en el complejo de señalización de células T resistentes (Scaffidi, Schmitz et al. 1999), sugiriendo que debe haber otros moduladores implicados.

En células tipo-I, el procesamiento de caspasa-8 es suficiente para activar otros miembros de la familia de caspasas que, actuando sobre diversos sustratos celulares, llevarán a la fase de ejecución de la apoptosis. En las células tipo-II, la activación de caspasas efectoras depende de una amplificación, mediada por el corte de Bid y la subsecuente liberación de proteínas de la mitocondria (citocromo-c, Smac/DIABLO) para formar el apoptosoma con la procaspasa-9, que se activará dando lugar a la activación de caspasa-3, induciendo apoptosis. La caspasa-3 activada puede activar a caspasa-8 en un mecanismo de retroalimentación, amplificando la señalización.

La muerte celular mediada por Fas no sólo ocurre por apoptosis sino también por necrosis, dependiendo del contexto. Esta necrosis requiere la presencia de FADD y de la proteína serin/treonina quinasa de interacción con el receptor (RIP), mientras que caspasa-8 parece no ser necesaria (Holler, Zaru et al. 2000). Por otro lado, aunque la principal función de Fas es inducir muerte celular, también transmite señales de proliferación en células T y fibroblastos humanos (Siegel, Chan et al. 2000). Este fenómeno está relacionado con la activación de NFκB, mediada por FADD, caspasa-8 y RIP1 (Kreuz, Siegmund et al. 2004). Además, Fas promueve la activación de JNK, que frecuentemente se correlaciona con la apoptosis mediada por Fas. Otros estudios apuntan un papel de JNK en la hipertrofia cardíaca en respuesta a una sobrecarga de la presión en ausencia de apoptosis (Badorff, Ruetten et al. 2002).

2) **Receptores de TNF.**

La familia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) son proteínas transmembrana tipo-I que transmiten sus señales a través de interacciones proteína-proteína, dando lugar a mecanismos moleculares que llevan tanto a muerte como a supervivencia (Baker and Reddy 1998).

Se conocen dos receptores para el Factor de Necrosis Tumoral, denominados TNFR1 (CD120a) y TNFR2 (CD120b), de 55 y 75 KDa, respectivamente. El TNFR1 es una proteína glicosilada de 455 aminoácidos de los cuales 171 se encuentran en la porción extracelular. Este receptor está estructuralmente relacionado con el NGF (factor de crecimiento neuronal) y con el antígeno humano CD-40. El TNFR1 se une preferentemente al TNF soluble y posee un dominio de muerte (DD) en su porción intracelular que regula la apoptosis. Por el contrario, el TNFR2 tiene una mayor afinidad hacia el TNF de membrana, careciendo de dominio de muerte. Sin embargo, el TNFR2 también puede iniciar la muerte celular estimulando el TNFR1. Los dos receptores pueden activar las vías de transducción de señales de NFκB o de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Campbell, Roberts et al. 2003).

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF) es una potente citoquina producida por células T y macrófagos activados en respuesta a infección. Este ligando es una glicoproteína de membrana tipo-II que media procesos como apoptosis, inflamación, proliferación celular, diferenciación e inmunidad (Ashkenazi and Dixit 1998; Wallach, Varfolomeev et al. 1999). Cuando el ligando se une al receptor, se induce su conformación activa en homotrímeros. Se ha visto también que la homotrimierización puede darse de forma independiente de ligando (Hsu, Xiong et al. 1995). TNF puede unirse a sus receptores TNFR1 o TNFR2. En el caso de TNFR1, se ha descrito la existencia de una molécula silenciadora del dominio de muerte (SODD), que parece mantener a TNFR1 en su conformación monomérica. Tras la unión del ligando, estas

moléculas se disocian de los receptores, permitiendo su oligomerización y consecuente activación. Además, diez minutos después del tratamiento con TNF, estas moléculas vuelven a reclutarse al receptor, bloqueando las señales dependientes de TNFR1 (Jiang, Woronicz et al. 1999). Posteriormente, se sugirió un nuevo concepto de activación de los receptores de muerte, en el que se proponía que los receptores estaban formando trímeros en la célula antes de la llegada del ligando. Además, en el receptor TNFR1 se identificó un dominio extracelular denominado PLAD, que también estaba presente en los receptores de Fas y de TRAIL (DR4) (Chan, Chun et al. 2000; Golstein 2000; Siegel, Frederiksen et al. 2000).

El mecanismo molecular implicado en la señalización por TNF engloba la formación de dos complejos que transducen señales tanto de muerte como de supervivencia (Tartaglia, Ayres et al. 1993) (Figura 12).

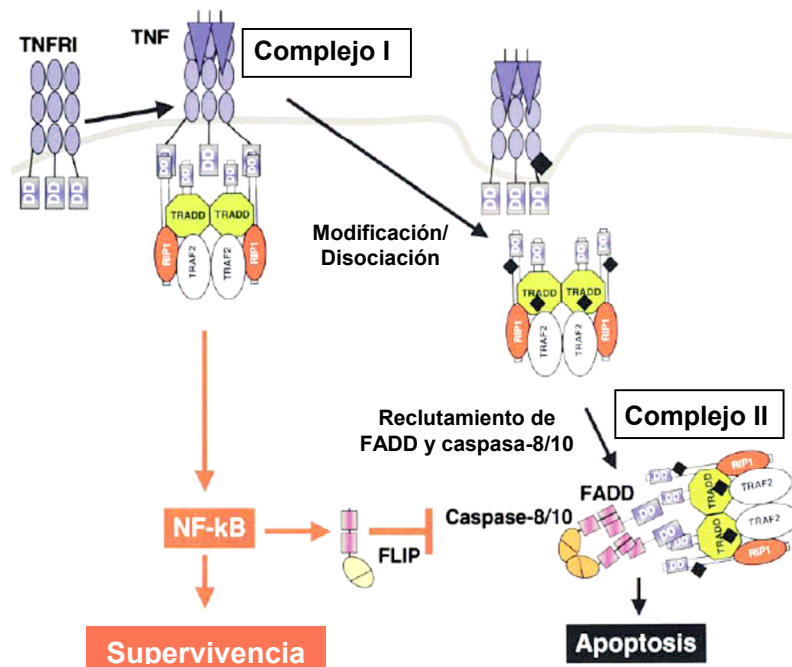


Figura 12. Modelo de la señalización mediada por TNF. Los rombos representan modificaciones moleculares. Adaptado de (Micheau and Tschopp 2003).

El primer complejo (Complejo I) se forma rápidamente en la membrana tras la unión del TNF a su receptor TNFR1. A los dominios de muerte (DD) del receptor se le asocia la proteína adaptadora TRADD, seguida de RIP1, que también contiene un DD (Ashkenazi and Dixit 1998). Este complejo de señalización se requiere para la unión de TRAF2/5 y de c-IAP1, dando lugar a la activación del complejo IKK (IKK α , β y γ). IKK estimula a NF κ B mediante la inducción de la fosforilación y degradación de su inhibidor I- κ B. TRAF2 actúa como conductor para la estimulación de JNK a través de su MAPK (MKK7), promoviendo la fosforilación de c-Jun y aumentando así la actividad de AP-1. Este proceso da lugar a la supervivencia de la célula (Baud and Karin 2001; Wajant, Pfizenmaier et al. 2003; Varfolomeev and Ashkenazi 2004). Sin embargo, la ruta de señalización pro-apoptótica de TNF requiere la formación de los dos complejos. Tras la formación del primer complejo, TRADD, TRAF2 y RIP1 se modifican y se disocian del receptor. Los dominios de muerte (DD) de TRADD (y/o de RIP1) que han quedado libres, se unen a FADD, que induce el reclutamiento de caspasa-8/10, formándose el segundo complejo (Complejo II), que es soluble y citoplásmico y da lugar a apoptosis. Si la activación de NF κ B que se produce por el Complejo I es suficiente para inducir supervivencia, los niveles celulares de FLIP_L aumentan para bloquear la apoptosis mediada por el segundo complejo (Micheau and Tschopp 2003). Así, mientras que las señales de muerte parecen estar asociadas con la activación tanto de caspasas como de quinasas de c-Jun, las señales de supervivencia están mediadas por la activación de NF κ B (Baker and Reddy 1998).

Recientemente se ha descrito que TNF puede inducir la activación de caspasa-8 mediante dos mecanismos diferentes; el primero mediante la eliminación de la proteína inhibidora de caspasa-8 (cFLIP), y el segundo, induciendo la degradación de IAP1/2, que permite que RIP1 se desubiquitine y se libere del complejo que forma con el receptor para poder formar otro complejo, distinto del complejo II, con caspasa-8 y

FADD, activándose la caspasa-8 e induciendo muerte. Además, este último mecanismo no se bloquea por cFLIP endógeno (Wang, Du et al. 2008).

TNF fue la primera citoquina utilizada en humanos para la terapia contra el cáncer. Sin embargo, su papel en el tratamiento de pacientes de cáncer es controvertido debido a las diferentes rutas de señalización que pueden llevar a la supervivencia de célula, además de sus efectos inflamatorios (Bertazza and Mocellin 2008).

1.3.3.2. Receptores de Apo2L/TRAIL

Apo2L/TRAIL es una citoquina que pertenece a la familia de TNF. Se descubrió por su homología estructural con el dominio extracelular de otros miembros de la misma familia (Wiley, Schooley et al. 1995), compartiendo el 28% de la secuencia de aminoácidos con FasL y el 23% con TNF. Apo2L/TRAIL tiene 33 KDa y se expresa como proteína transmembrana tipo II. Su dominio extracelular se puede cortar proteolíticamente, liberándose una molécula soluble de 20 KDa. Ambas formas son capaces de inducir apoptosis tras su unión con el receptor (Mariani and Krammer 1998; Kelley and Ashkenazi 2004). Mediante estudios de cristalografía, se ha determinado que Apo2L/TRAIL es una molécula homotrimérica estabilizada por un átomo de zinc interno que coordina tres residuos de cisteína, cada uno de ellos en la posición 230 de cada subunidad del ligando (Hymowitz, O'Connell et al. 2000).

Los receptores de TRAIL son proteínas transmembrana tipo I. Se han identificado cinco receptores que se unen al ligando (LeBlanc and Ashkenazi 2003) (Figura 13).

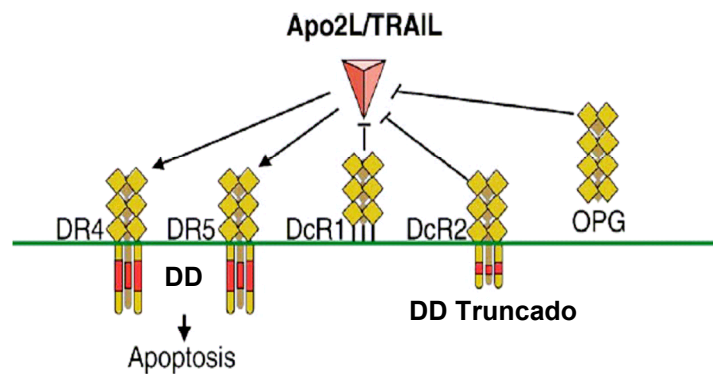


Figura 13. Receptores de Apo2L/TRAIL. Los receptores DR4 y DR5 corresponden a TRAIL-R1 y TRAIL-R2 respectivamente. Los receptores señuelo o Decoy son DcR1 y DcR2, conocidos también como TRAIL-R3 y TRAIL-R4, respectivamente. La osteoprotegerina (OPG) es un receptor soluble capaz de unir a Apo2L/TRAIL aunque no se conoce muy bien el significado fisiológico de esta unión. DD: Dominio de muerte. Adaptada de (Almasan and Ashkenazi 2003).

En humanos, dos de los receptores inducen muerte, y sólo uno de ellos está presente en ratones. Estos receptores que llevan a la apoptosis son TRAIL-R1 (también conocido como DR4 o TNFRSF10a) y TRAIL-R2 (DR5 o TNFRSF10b). Ambos contienen dos dominios extracelulares de unión a ligando, ricos en residuos de cisteínas, y un dominio citoplásmico de inducción de muerte (DD), necesario para la activación de la ruta apoptótica extrínseca. Otros tres receptores son capaces de unir a Apo2L/TRAIL, los dos primeros conocidos como Receptores señuelo o Decoy Receptors: TRAIL-R3 (DcR1 o TNFRSF10c), TRAIL-R4 (DcR2 o TNFRSF10d) y la osteoprotegerina (OPG o TNFRSF11b), que inhiben la apoptosis, al secuestrar la molécula de TRAIL, impidiendo así que ésta se una a los receptores pro-apoptóticos, o bien induciendo señales de supervivencia. Los receptores DcR1 y DcR2 tienen homología con los dominios extracelulares de DR4 y DR5. El Decoy Receptor 2 tiene un DD truncado y no funcional, mientras que el Decoy Receptor 1 ha perdido su región citosólica y permanece unido a la membrana a través de una fracción glucosfolipídica. La OPG se descubrió como receptor de unión a RANKL (el ligando del receptor de activación de NFκB), y posteriormente se vio que también se unía a

Apo2L/TRAIL, aunque la afinidad de unión es baja a temperatura fisiológica (Truneh, Sharma et al. 2000). Recientemente, se ha visto que la OPG está implicada en la biología vascular, teniendo un potencial antiinflamatorio (Corallini, Rimondi et al. 2008).

Los receptores de TRAIL tienen diferentes afinidades por el ligando. Así, TRAIL-R2 es el de mayor afinidad y la OPG el de menor. La expresión de los receptores en tejidos humanos también es variable, de forma que la expresión de los receptores TRAIL-R1, TRAIL-R2 y TRAIL-R4 está bastante extendida mientras que la de TRAIL-R3 está más bien restringida al bazo y células de sangre periférica (Degli-Esposti, Dougall et al. 1997; Degli-Esposti, Smolak et al. 1997). Sin embargo, el papel y función de los distintos receptores está aún por determinar. Por ejemplo, se pensaba que TRAIL-R1 y TRAIL-R2 intercambiaban su potencial de inducción de apoptosis, pero estudios más recientes mostraron que cada uno de ellos puede ser dominante en la señalización de muerte de forma dependiente del tipo celular. Así, TRAIL-R1 parece predominar en la apoptosis de células B de leucemia linfocítica crónica, a pesar de que TRAIL-R2 está más expresado en estas células (MacFarlane, Inoue et al. 2005).

Los mecanismos que conducen a la activación de apoptosis mediada por TRAIL han sido estudiados en detalle. Cuando TRAIL se une a TRAIL-R1 y TRAIL-R2, los receptores homotrimerizados reclutan proteínas citosólicas para formar el complejo inductor de muerte (DISC). FADD es una proteína adaptadora que se une directamente al dominio de muerte (DD) intracelular del receptor, donde simultáneamente se une la forma inactiva de caspasa-8 o caspasa-10, a través del dominio efector de muerte (DED), dando lugar a su activación. Caspasa-10 no es indispensable para la activación de apoptosis, pudiendo estar implicada en efectos de proliferación mediados por los receptores. A partir de aquí, pueden inducirse dos rutas diferentes, que darán lugar a la muerte irreversible de la célula. En la primera de ellas, caspasa-8 activa directamente a las caspasas efectoras (3, 6 y 7) (ruta extrínseca). En

la segunda ruta (intrínseca), caspasa-8 corta la proteína Bid, liberándose el Bid truncado, que se trasloca a la mitocondria donde interacciona con otros miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax y Bak. Esto induce la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, causando la liberación de factores proapoptogénicos como citocromo-c y Smac/DIABLO. El citocromo-c junto a dATP inician el ensamblaje del apoptosoma, que comprende a Apaf-1 y a la procaspasa-9. Una vez formado este complejo, caspasa-9 se activa por asociación dando lugar a la activación de caspasas efectoras. Smac/DIABLO es capaz de neutralizar la actividad inhibitoria de las caspasas que tienen los IAPs, particularmente la de XIAP, facilitando el proceso de apoptosis (Figura 14). Además, se ha visto recientemente que TRAIL y sus receptores TRAIL-R1/2 son rápidamente endocitados de forma dependiente del tiempo y la concentración. Sin embargo, esta internalización, al contrario de lo que pasa con FasL/Fas o con TNF/TNFR, no es necesaria para la formación del DISC, la activación de caspasa-8 o la transmisión de la señal de apoptosis (Kohlhaas, Craxton et al. 2007).

Hace algunos años se descubrió la capacidad de TRAIL para inducir, no sólo muerte celular, sino también señales de supervivencia y proliferación, mediadas por NF κ B, JNK y p38 (Kimberley and Screatton 2004). Los mecanismos moleculares implicados en la activación de estas quinasas por TRAIL se han estudiado por co-inmunoprecipitación, mostrando la implicación de un complejo de señalización secundario posterior al ensamblaje del DISC (Varfolomeev, Maecker et al. 2005). Este complejo secundario (Figura 14) conserva los componentes del DISC, FADD y caspasa-8, pero recluta otras proteínas como RIP1, TRAF2 y Nemo/IKK γ , además de TRADD. RIP1 y TRAF2 inducen la activación de JNK además de inducir la expresión de genes de proliferación a través del factor c-Jun (AP-1), mientras que Nemo recluta a IKK α/β al complejo de señalización, produciendo la fosforilación del inhibidor de

NFκB (IκB), y así NFκB queda libre para traslocarse al núcleo y ejercer su función, regulando la transcripción de numerosos genes antiapoptóticos como cFLIP, Bcl-X_L, Mcl-1 e IAPs (Kreuz, Siegmund et al. 2001).

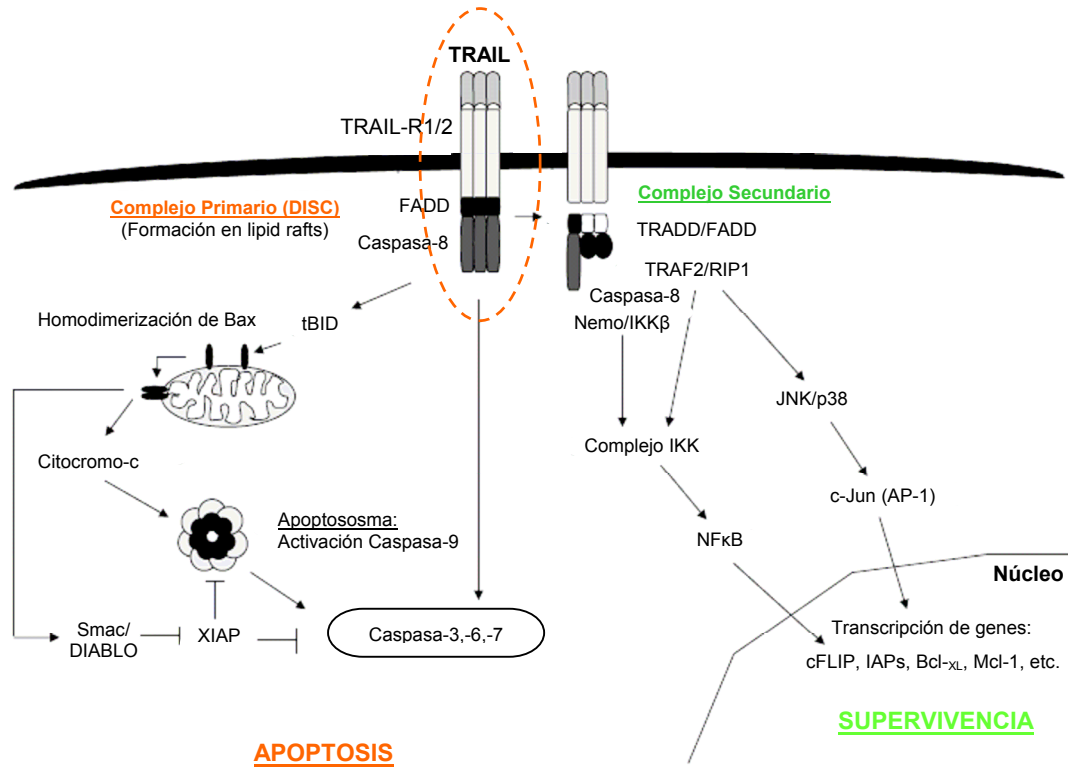


Figura 14. Señalización de apoptosis y supervivencia inducida por TRAIL. Adaptada de (Kruyt 2008).

Por otro lado, y en relación con la función de supervivencia de TRAIL, se ha descrito que TRAIL-R4 activa a NFκB, confiriendo resistencia a TRAIL en células epiteliales de riñón (Degli-Esposti, Dougall et al. 1997). Sin embargo, otros estudios no han podido demostrar la capacidad de TRAIL-R4 para activar NFκB en células de cáncer de colon. Así pues, hacen falta más estudios para conocer los mecanismos de señalización de supervivencia mediados por TRAIL. Además, TRAIL puede activar la ruta de PKB/Akt, una quinasa que tiene un papel en la regulación de funciones celulares como metabolismo de nutrientes, crecimiento celular, apoptosis y supervivencia. De esta forma, TRAIL induce la fosforilación de la serina/treonina

quinasa PKB/Akt, de forma dependiente de la activación de PI3K (Secchiero, Gonelli et al. 2003). Esta activación puede inducir un aumento en la expresión de los niveles de cFLIP, contribuyendo a la resistencia de las células a la muerte por TRAIL. Por su parte, PKB/Akt puede activar a la diana de rapamicina (mTOR), que aumenta la traducción de cFLIP (Panner, James et al. 2005). Por otro lado, recientemente se han revelado datos sobre un nuevo mecanismo de señalización mediado por TRAIL en lisosomas, en el que TRAIL induce apoptosis mediante la activación de Bim, de forma dependiente de JNK, lo que induce la permeabilización de los lisosomas mediada por Bax (Werneburg, Guicciardi et al. 2007). Por lo tanto, queda mucho por estudiar sobre la implicación de estos mecanismos en la actividad antitumoral inducida por TRAIL.

1.4. Papel fisiológico de TRAIL

A pesar de que en ratones sólo se expresa un receptor de TRAIL, homólogo a TRAIL-R1 o TRAIL-R2, los modelos animales han servido para aportar datos sobre la expresión y el papel fisiológico de TRAIL *in vivo* (Wu, Burns et al. 1999).

La expresión de TRAIL en los distintos tejidos puede dar una idea de su función natural. Así, mientras que la expresión de ARNm y proteína se observa en gran variedad de tejidos (hígado, pulmón, riñón, bazo, próstata, mama, timo, ovario, intestino, colon, sangre periférica, corazón, placenta, músculo esquelético) (Spierings, de Vries et al. 2004), estudios en ratones y humanos muestran que TRAIL no se expresa en la superficie de células T y B, monocitos, células dendríticas o células natural killer (NK). Sólo un pequeño porcentaje de células NK de ratón expresan TRAIL en su superficie. Tras la estimulación con interferón (IFN), la mayoría de células NK, monocitos, células T periféricas y células dendríticas expresan TRAIL en su superficie, sugiriendo el importante papel que juega TRAIL en la respuesta inmune innata y del sistema inmune en general (Jo, Kim et al. 2000; Smyth, Cretney et al.

2001). Numerosos estudios describen una función inhibidora de TRAIL en el desarrollo de enfermedades autoinmunes en modelos de ratón (ejemplo: artritis reumatoide, diabetes y encefalomiелitis). Sin embargo, TRAIL también puede estar implicado en la aceleración de estas enfermedades, por lo que parece tener una función dual que depende del tiempo y la localización de la expresión de TRAIL (Cretney, Shanker et al. 2006). Por otro lado, las células progenitoras CD34 no expresan receptores de TRAIL, aunque su expresión aumenta en médula ósea en patologías como anemia aplásica, anemia de Fanconi y síndrome mielodisplásico, pudiéndose usar anticuerpos antagonistas de TRAIL-R1/2 así como TRAIL recombinante para el tratamiento de enfermedades hematopoyéticas (Secchiero and Zauli 2008).

1.4.1. TRAIL, apoptosis y cáncer

Las enfermedades en las que la apoptosis puede estar implicada se dividen en dos grupos (Tabla 2). El primero, engloba las enfermedades en las que hay un aumento de la supervivencia celular debido a que la apoptosis está inhibida. En el segundo, encontramos enfermedades donde se produce un exceso de muerte celular provocada por una apoptosis hiperactiva (Ortega-Camarillo, Diaz-Flores et al. 2001).

El cáncer es la segunda causa de muerte en países desarrollados. Está caracterizado por el crecimiento incontrolado de células anormales, causado por múltiples factores (mutaciones genéticas, alteraciones hormonales, tabaco, productos químicos, radiaciones, etc). La eficacia de los tratamientos frente al cáncer, incluidas la radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia, se debe a su capacidad de inducir apoptosis en la célula tumoral. Así, defectos en el mecanismo de inducción de apoptosis en la célula tumoral puede favorecer la invasividad y tumorigenicidad.

TRAIL está siendo utilizado en ensayos clínicos como tratamiento en la terapia contra el cáncer debido a que induce apoptosis selectivamente en células

transformadas pero no en células normales. Por eso, tanto TRAIL como sus receptores, son atractivas dianas para el tratamiento antitumoral (Walczak, Miller et al. 1999; Leverkus, Neumann et al. 2000). Sin embargo, muchas células tumorales son resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL. Por este motivo, los últimos estudios no sólo se focalizan en estudiar la actividad antitumoral de TRAIL como agente terapéutico, sino también en combinación con otros agentes biológicos (drogas quimioterápicas, inhibidores del proteosoma, radiación ionizante, agentes genotóxicos, etc) para así conseguir sensibilizar a las células tumorales a la apoptosis (Cretney, Shanker et al. 2006). Muchos de estos agentes sinergizan con TRAIL mediante el aumento de la expresión de los receptores, por inhibición de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 o cFLIP, mediante la regulación positiva de proteínas pro-apoptóticas como Bak, FADD o caspasa-8, o a través de un aumento en la expresión de TRAIL endógeno.

| Inhibición de la apoptosis | Incremento de la apoptosis |
|---|---|
| <p><u>Cáncer</u> Colorrectal, Glioma, Linfoma folicular, Carcinomas con mutaciones de p53</p> <p><u>Tumores dependientes de hormonas:</u> Cáncer de mama, próstata y ovario</p> <p><u>Enfermedades autoinmunes</u> Lupus eritematoso sistémico, Miastenia gravis</p> <p><u>Infecciones virales</u> Herpesvirus, Poxvirus, Baculovirus, Adenovirus</p> <p><u>Enfermedades inflamatorias</u></p> | <p><u>Enfermedades neurodegenerativas</u> Alzheimer, Parkinson, Esclerosis lateral amiotrófica, Epilepsia, Rinitis pigmentosa.</p> <p><u>Sistema hematopoyético</u> Anemia aplásica, Linfocitopenia T CD4+, Deficiencia de G6PD (monocitoss9)</p> <p><u>Daño a órganos</u> Diabetes mellitus tipo-I, Pancreatits alcohólica, Daño isquémico (miocardio, retina, cerebro, riñón)</p> <p><u>Sida</u> Linfocitos T</p> |

Tabla 2. Enfermedades asociadas a la inducción e inhibición de la apoptosis. Adaptada de (Ortega-Camarillo, Diaz-Flores et al. 2001).

Se ha visto que ratones deficientes en TRAIL (Cretney, Takeda et al. 2002) o en sus receptores (Finnberg, Klein-Szanto et al. 2008; Grosse-Wilde, Voloshanenko et al. 2008) son más susceptibles a la metástasis, lo que concuerda con otros datos en los que TRAIL se expresa constitutivamente en células NK, para el control de la metástasis tumoral (Smyth, Cretney et al. 2001; Takeda, Hayakawa et al. 2001). Además, la formación de tumores inducida por carcinógenos es mayor en presencia de anticuerpos antagonistas de TRAIL (Takeda, Hayakawa et al. 2001), por lo que TRAIL juega un papel fundamental como molécula efectora innata en la vigilancia inmune durante la formación y progresión de tumores.

| Agente/Identificador | Mecanismo/Farmacología | Fase de EC |
|------------------------|---|--------------------------|
| rhApo2L/TRAIL (AMG951) | rhApo2L/TRAIL con diana en DR4 y DR5 | Fase II (NHL, NSCLC) |
| Mapatumumab (HGS-ETR1) | Anticuerpo humano frente a DR4 | Fase II (CRC, NSCLC, MM) |
| Lexatumumab (HGS-ETR2) | Anticuerpo humano frente a DR5 | Fase I |
| Apomab | Anticuerpo humano frente a DR5 | Fase II (NHL, NSCLC) |
| AMG-655 | Anticuerpo humano frente a DR5 | Fase II (NSCLC) |
| LBY135 | Anticuerpo quimera frente a DR5 | Fase I /II |
| TRA-8/CS-1008 | Anticuerpo murino frente a DR5 (TRA-8) y versión humanizada (CS-1008) | Fase I |
| Ad5-TRAIL | Adenovirus recombinante con Apo2L/TRAIL | Fase I |

Tabla 3. Esquema de las fases de estudio en ensayos clínicos (EC) en los que se encuentra TRAIL. NHL: Linfoma no-Hodgking; NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas; MM: Mielomamúltiple; CRC: Carcinoma colorrectal. Adaptada de (Ashkenazi and Herbst 2008).

Actualmente, TRAIL en su forma recombinante y anticuerpos agonistas de los receptores de TRAIL-R1 y TRAIL-R2, solos o en combinación con otras drogas, están en Fase I y II de ensayos clínicos en linfoma no Hodgking, cáncer colorrectal, mieloma múltiple y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Tabla 3) (Ashkenazi and Herbst 2008).

1.4.2. Apoptosis en el desarrollo de la glándula mamaria

La glándula mamaria sufre un proceso morfogénético que tiene lugar durante la embriogénesis y la pubertad, induciendo el desarrollo de unidades acinares y sus terminaciones en ductos. Estas estructuras servirán en el futuro para generar y elaborar la leche necesaria para amamantar a la progenie. Estudios recientes en los que se han utilizado cultivos tridimensionales de células epiteliales de mama (Debnath, Muthuswamy et al. 2003), y en los que las estructuras acinares formadas provenían de una sola célula, han mostrado que la formación del lumen requiere el proceso de apoptosis para inducir la muerte de las células del centro del acino, en las que se ha perdido la adhesión a la matriz (proceso conocido como anoikis) (Figura 15).

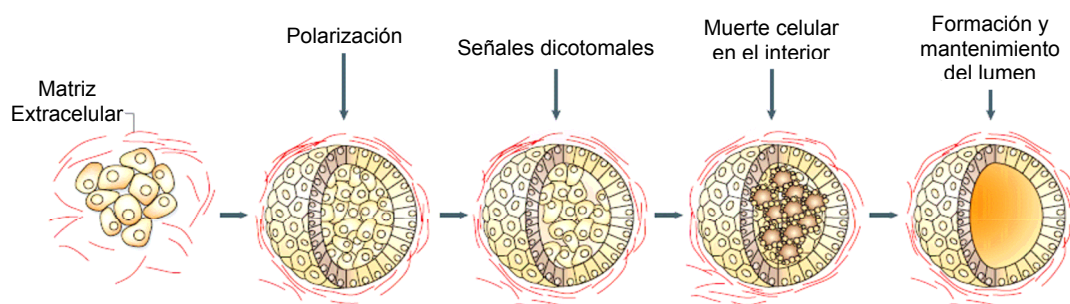


Figura 15. Morfogénesis de los acinos de células epiteliales de mama. Durante el desarrollo de la mama se observa una secuencia ordenada de eventos biológicos. Durante los primeros estadios del cultivo tridimensional, tiene lugar una polarización apicobasal. Entre los días 5 y 8, se distinguen dos poblaciones de células: una capa externa en contacto directo con la matriz, y una zona interna de células que han perdido el contacto con la matriz extracelular. Durante el proceso de morfogénesis, la capa externa se mantiene polarizada respecto al centro del acino. Se pueden observar distintas señales dicotómicas entre las dos zonas: se produce un aumento de las señales de supervivencia mediadas por Akt en las células de la capa externa. A partir del día 8, las células del centro del acino comienzan a sufrir muerte celular por apoptosis, caracterizada por un incremento en la activación de caspasa-3. Esta muerte celular contribuye al vaciamiento del acino y a la formación completa del lumen. Adaptada de (Debnath and Brugge 2005).

Este programa de apoptosis *in vitro* requiere la molécula pro-apoptótica Bim. También se ha visto que Bim es necesario para la formación del lumen en la glándula mamaria de ratones, siendo un regulador de apoptosis *in vivo*. Además de Bim, los niveles de la proteína pro-apoptótica Bmf aumentan en las células que pierden la

adhesión con la matriz durante la morfogénesis. Por otro lado, Bmf está expresado durante la involución de la mama en ratones, lo que sugiere que Bmf contribuye no sólo al proceso de morfogénesis sino también al proceso de regresión de la mama tras la lactancia *in vivo* (Schmelzle, Maillieux et al. 2007).

El proceso de formación del lumen está regulado por numerosos factores, como proteínas anti-apoptóticas, oncogenes o TRAIL (Figura 16).

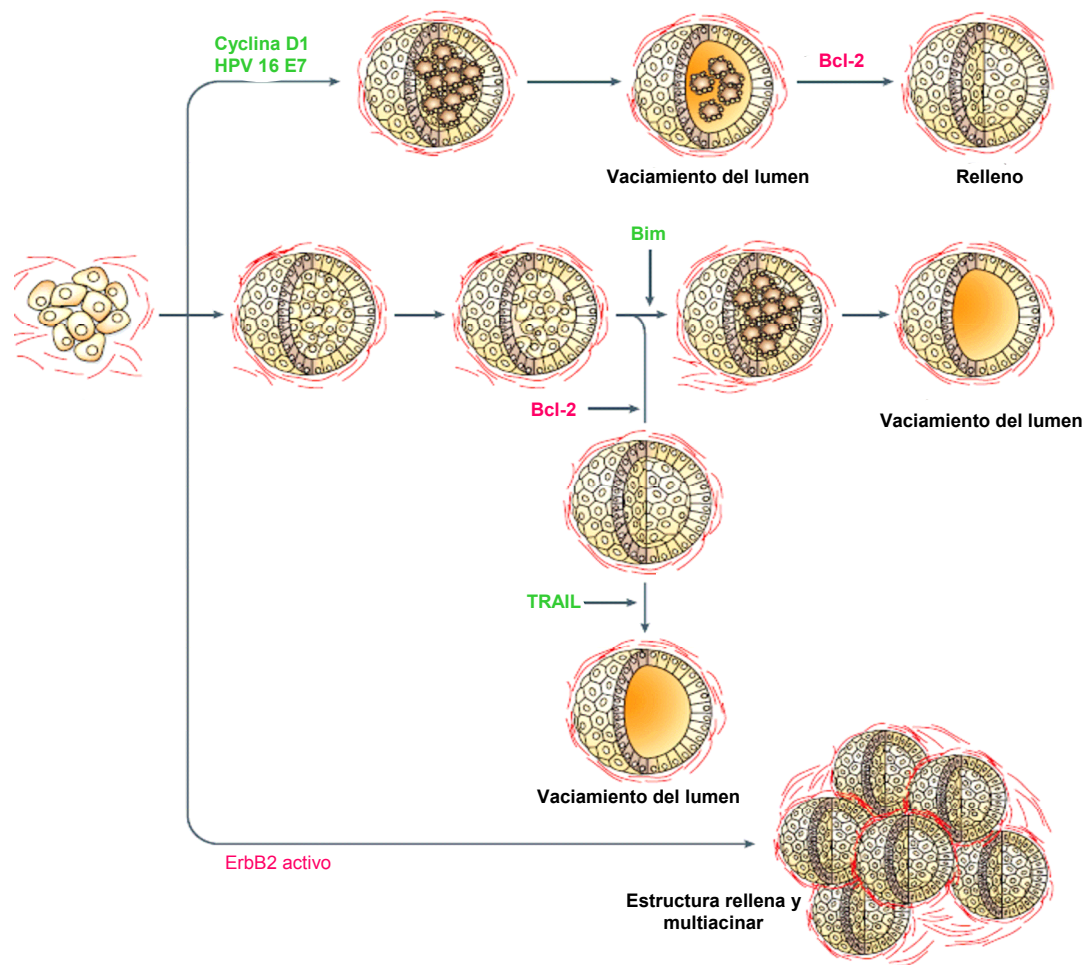


Figura 16. Esquema de la formación y mantenimiento del lumen en acinos epiteliales *in vitro*. En verde se muestran moléculas que favorecen el vaciamiento del acino, mientras que las marcadas en rosa representan aquellas moléculas que inducen que el acino se rellene. Adaptada de (Debnath and Brugge 2005).

De esta forma, la sobreexpresión de Bcl-2 retrasa, aunque no previene, la formación de un lumen totalmente vacío. La incapacidad de la proteína Bcl-2 para

prevenir la formación del lumen tanto *in vitro* como *in vivo*, indica que debe haber otros procesos adicionales que participen en la generación y el mantenimiento del espacio luminal. Se ha visto por microscopía electrónica una gran cantidad de vacuolas en las células centrales, parecidas a las vacuolas de autofagia. Además, las células centrales de los acinos que sobreexpresan Bcl-2 también contienen estas vacuolas similares a las autofágicas antes de vaciarse (Debnath, Mills et al. 2002; Mills, Reginato et al. 2004). Evidencias más recientes indican que TRAIL se induce durante la formación del lumen y podría estar regulando la formación de vacuolas autofágicas en el lumen (Mills, Reginato et al. 2004). Por otro lado, la proliferación no es suficiente para que el acino se rellene, sino que debe haber una inhibición de la muerte celular. En este sentido, la inhibición de la apoptosis (mediante la expresión exógena de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2) o el aumento de la proliferación (a través de la sobreexpresión de proteínas oncogénicas como Ciclina D) facilitan un relleno parcial del lumen. Sin embargo, cuando se sobreexpresa el oncogén ErbB2, que induce tanto un aumento en la proliferación como una inhibición de la apoptosis, se produce un fenotipo multiacinar con el lumen relleno, debido a la hiperproliferación y a la actividad anti-apoptótica (Muthuswamy, Li et al. 2001; Debnath, Mills et al. 2002).

2. AUTOFAGIA

2.1. Introducción y generalidades

La palabra autofagia proviene del griego y significa *comer* (fagia) y *uno mismo* (auto). Es un proceso homeostático fundamental en la célula, que le permite limpiar parte de su citoplasma y degradar sus componentes dañados (Klionsky and Emr 2000). Esta función principal se conserva en todos los organismos eucarióticos, desde levaduras hasta humanos.

Las células eucariotas tienen dos mecanismos principales de degradación de proteínas: el proteosoma y los lisosomas. El proteosoma es un complejo de proteasas multicatalítico que degrada la mayoría de las proteínas endógenas, incluidas las proteínas mal plegadas o dañadas, para mantener una función celular normal. Este mecanismo de degradación juega un importante papel en múltiples procesos como progresión del ciclo celular, proliferación, apoptosis y angiogénesis. El segundo mecanismo de degradación, los lisosomas, degrada proteínas extracelulares liberadas por endocitosis, fagocitosis o pinocitosis, y componentes citoplasmáticos intracelulares que provienen de autofagia mediada por chaperonas, microautofagia o macroautofagia (a partir de ahora, referida como autofagia) (Figura 17). La diferencia entre microautofagia y macroautofagia radica en que la microautofagia implica exponer el contenido citoplásmico directamente a la superficie de los lisosomas por invaginación, protusión y/o septación de la membrana limitante lisosomal, mientras que la macroautofagia implica la formación de vesículas de doble membrana citosólicas, que secuestran contenido del citoplasma y lo degradan (Levine and Klionsky 2004). Mientras que el proteosoma principalmente degrada proteínas de vida media corta (Goldberg 2003), la autofagia es el mecanismo catabólico por el que las células degradan proteínas de vida media larga, otras macromoléculas e incluso organelas (Mortimore and Poso 1987).

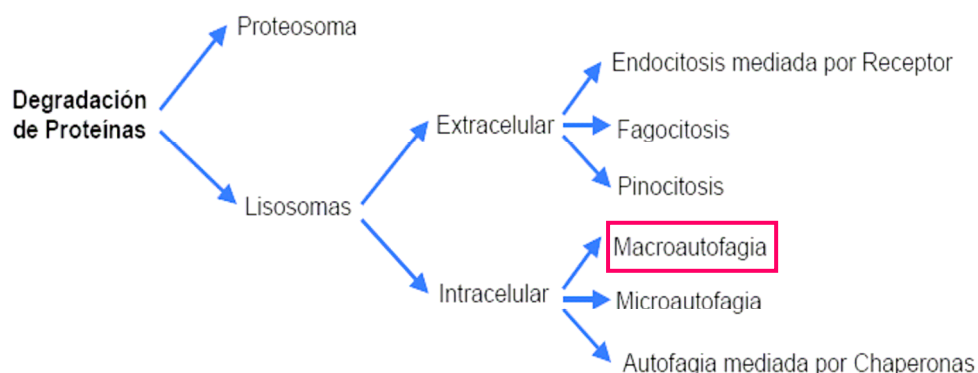


Figura 17. Mecanismos de degradación de proteínas. Las células eucariotas tienen diversos mecanismos para degradar las proteínas. La Macroautofagia es el tópico principal del que trata esta tesis.

La autofagia ocurre espontáneamente a niveles basales (Mizushima, Yamamoto et al. 2004), y se conoce como “autofagia basal”. Sin embargo, este proceso se regula rápidamente cuando las células necesitan producir nutrientes intracelulares y energía durante condiciones en las que hay una privación de nutrientes (ejemplo: baja concentración de aminoácidos (Mortimore and Poso 1988), disminución de factores de crecimiento (Lum, Bauer et al. 2005)) y cuando se produce una acumulación de componentes citoplasmáticos dañados en la célula (organelas dañadas o formación de agregados de proteínas que se acumulan en la célula). En estos casos, el proceso se conoce como “autofagia inducida”. Además, tras una infección patógena (Kirkegaard, Taylor et al. 2004) o durante estrés oncogénico (ejemplo: sobreexpresión del oncogén Ras (Chi, Kitanaka et al. 1999)), las células también aumentan los niveles de autofagia. Por tanto, este proceso sirve como una respuesta común al estrés extracelular (hipoxia, altas temperaturas, falta de nutrientes) e intracelular (daño organelas), permitiendo a los organismos eucariotas sobrevivir bajo estas condiciones mediante el reciclado. Además de la señalización de Insulina y aminoácidos, muchos otros factores están implicados en la regulación de la autofagia. Entre ellos se incluyen la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Levine, Sinha et al. 2008), las

especies reactivas de oxígeno (ROS) (Djavaheri-Mergny, Amelotti et al. 2006; Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007), calcio (Hoyer-Hansen, Bastholm et al. 2007), AMPK (Meley, Bauvy et al. 2006; Hoyer-Hansen and Jaattela 2007; Liang, Shao et al. 2007), BNIP3 (Daido, Kanzawa et al. 2004), DRAM (Crighton, Wilkinson et al. 2006), Calpaína (Demarchi, Bertoli et al. 2006), TRAIL (Mills, Reginato et al. 2004), FADD (Pyo, Jang et al. 2005; Thorburn, Moore et al. 2005), AMBRA1 (Fimia, Stoykova et al. 2007) e inositol trifosfato (IP₃) (Sarkar, Floto et al. 2005; Criollo, Maiuri et al. 2007).

En mamíferos, la autofagia parece estar implicada en numerosos procesos fisiológicos como: control del crecimiento celular, respuesta a falta de nutrientes, mecanismo antienvjecimiento e inmunidad innata. Su desregulación parece tener un papel en determinadas enfermedades (cáncer, cardiomiopatías, enfermedades musculares y desórdenes neurodegenerativos). Además, la autofagia está aumentada de forma fisiológica en células que sufren remodelación en el curso de procesos de diferenciación (ejemplo: órganos de recién nacidos como riñón, pulmón, intestino, glándulas salivares, queratinocitos, etc. (De Duve and Wattiaux 1966), o en el proceso de formación de la glándula mamaria (Debnath 2008; Fung, Lock et al. 2008). Así pues, la autofagia juega un importante papel en procesos de diferenciación y desarrollo.

2.2. Mecanismos moleculares de la autofagia

El proceso por el que se forman las vesículas de la autofagia está altamente conservado desde levaduras hasta plantas y animales. Este proceso tiene lugar mediante una serie de pasos secuenciales (Figura 18) que llevarán al secuestro de componente citoplásmico (carga) en vesículas para su posterior degradación y obtención de energía (Reggiori and Klionsky 2005). El primer paso consiste en la nucleación de la membrana, cuyo origen es aún desconocido, aunque parecen

proceder del retículo endoplásmico, del Golgi o bien sintetizadas de novo como pequeñas estructuras pro-membrana (Gozuacik and Kimchi 2004). En levaduras, se sabe que se genera a partir de estructuras pre-autofagosomales (PAS) (Kim, Huang et al. 2001; Suzuki, Kirisako et al. 2001; Suzuki and Ohsumi 2007), pero estas estructuras no se han identificado aún en mamíferos. Esta membrana inicial, llamada fagóforo o membrana aislada, sufre una elongación hasta que sus bordes acaban fusionándose, dando lugar a una vacuola de doble membrana llamada autofagosoma. Una vez éste se ha formado, puede recibir señales de la vía de endocitosis para formar una organela híbrida conocida como amfisoma (Stromhaug and Seglen 1993; Berg, Fengsrud et al. 1998). Sin embargo, de forma similar a lo que ocurre en levaduras, el autofagosoma puede fusionarse directamente con uno o más lisosomas, generando autolisosomas. El paso final es la degradación, que tiene lugar en el autolisosoma, del contenido de la vacuola por las hidrolasas lisosomales, permitiendo la liberación de aminoácidos y ácidos grasos, que serán reutilizados por la célula.

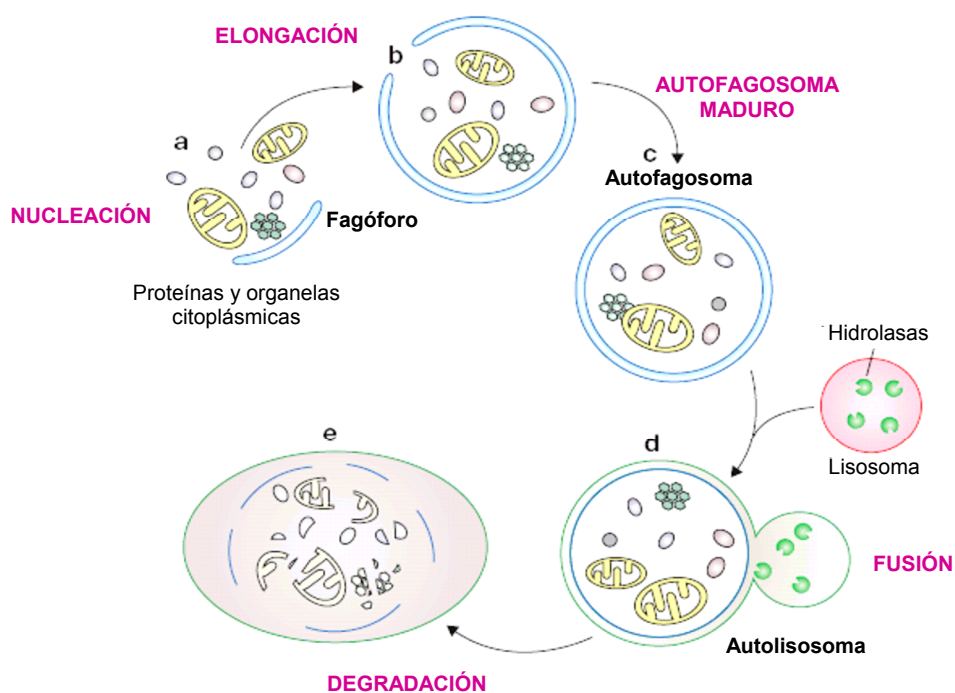


Figura 18. Descripción esquemática de la autofagia. El material citosólico es secuestrado por el fagóforo (a y b) durante los procesos de nucleación (a) y elongación de la membrana (b). El resultado es la formación del autofagosoma, una vesícula de doble membrana (c). La membrana externa del autofagosoma maduro se fusiona con un lisosoma formando el autolisosoma (d), exponiendo la membrana interna a la acción de las hidrolasas lisosomales. Finalmente, el interior del autolisosoma que contiene el cargo, es lisado y su contenido es degradado (e). Adaptada de (Xie and Klionsky 2007).

2.2.1. Genes relacionados con autofagia (Atg's).

El proceso de autofagia se conoce desde hace unos 40 años, pero debido a que no se conocían los componentes específicos implicados en dicho proceso, los estudios sobre la ruta de autofagia se limitaban a observaciones morfológicas y fenomenológicas. En los últimos 15 años, estudios genéticos, principalmente en levaduras (*S. cerevisiae*) y hongos (*P. pastoris* y *H. polymorpha*) han permitido aislar 31 genes denominados “genes relacionados con autofagia” (ATG), cuyos productos están específicamente involucrados en este proceso catabólico (Reggiori 2006). Además, 11 de estos genes han sido identificados como ortólogos también en organismos eucariotas superiores (Tabla 4), confirmando que el mecanismo de autofagia se conserva desde levaduras hasta mamíferos.

| ATG | Otro nombre | Homólogo | Función | Interacción |
|-------|-------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| Atg1 | Ulk1, Ulk2 | - | Serina treonina quinasa | Atg13, Atg1, Atg17 |
| Atg3 | - | - | Sistema de conjugación Atg8 | Atg9, Atg18, Atg8 |
| Atg4 | Autofagina | Atg4A (Autofagina2) Atg4B (Autofagina 1) ATG4C (Autofagina 3) Atg4D (Autofagina 4) | Cisteín-proteasa | Atg8 |
| Atg5 | - | - | Sistema conjugación Atg12 | Atg12, Atg16L |
| Atg6 | Beclina1 | - | Síntesis PtsIns-3P | Vps34, PI3K, UVRAG |
| Atg7 | - | - | Conjugación Atg8, Atg12 | Atg8, Atg3, Atg12 |
| Atg8 | - | MAP-LC3 GATE16 GABARAP Atg18L | Proteína de ubiquitinación | Atg3, Atg4, Atg7 |
| Atg9 | Atg9L | Atg9L1 Atg9L2 | Proteína trnsmembrana | Atg2 |
| Atg10 | - | - | Sistema conjugación Atg12 | Atg12 |
| Atg12 | - | - | Proteína de ubiquitinación | Atg3, Atg5, Atg7, Atg10, Atg16 |
| Atg16 | - | - | Asociación con Atg5-Atg12 | Atg5, Atg12 |

Tabla 4. Proteínas relacionadas con autofagia (Atg) identificadas en humanos. Adaptada de (Reggiori 2006; Ferraro and Cecconi 2007).

No obstante, otro nivel de complejidad se observa en la maquinaria de autofagia en humanos, ya que algunos de los genes ATG tienen numerosos homólogos (ejemplo: Atg8 tiene varios homólogos como la proteína asociada a microtúbulos MAP-LC3, la ATPasa asociada al golgi GATE-16, la proteína asociada al receptor gaba GABARAP, y Atg8L, que son ortólogos de ATG8 de levaduras). Además, cada homólogo puede tener distintas isoformas (ejemplo: existen tres isoformas de MAP-LC3: $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$) (He, Dang et al. 2003; Kabeya, Mizushima et al. 2004; Tanida, Sou et al. 2006). El hecho de que esta diversidad tenga redundancia en la función de la autofagia está aún por resolver.

2.2.2. Señalización de la maquinaria de autofagia

Para que puedan formarse los autofagosomas y unirse a los lisosomas para degradar su contenido, las proteínas Atg deben ejercer su función. Así, podemos dividir a estas proteínas en tres grupos funcionales, dependiendo del papel que ejerzan en la maquinaria de la autofagia (Figura 19): **1)** Atg9 y su sistema cíclico, que incluye Atg9, el complejo quinasa Atg1 (Atg1 y Atg13), Atg2 y Atg18; **2)** El complejo PI3K-III (Vps34, Vps15, Atg6 (Vps30)/Beclina1 y Atg14; y **3)** El sistema de proteínas similares a ubiquitina (ubiquitin-like) (Ubl), que incluye dos proteínas Ubl (Atg8/LC3 y Atg12), una enzima activadora (Atg7), dos análogos de la enzima conjugadora de ubiquitina (Atg10 y Atg3), una proteasa que modifica Atg8 (Atg4), la proteína diana de unión de Atg12 (Atg5) y Atg16.

1) Atg9 y Atg1. Atg9 es una proteína integral de membrana que proviene de endosomas o de trans-Golgi, pero no de mitocondria, y que se localiza en la membrana preautofagosomal. No se encuentra en autofagosomas maduros pero es necesaria para su formación, ya que Atg2 interacciona con Atg9, cuya interacción es

indispensable para la formación de los autofagosomas (Ferraro and Cecconi 2007; Webber, Young et al. 2007).

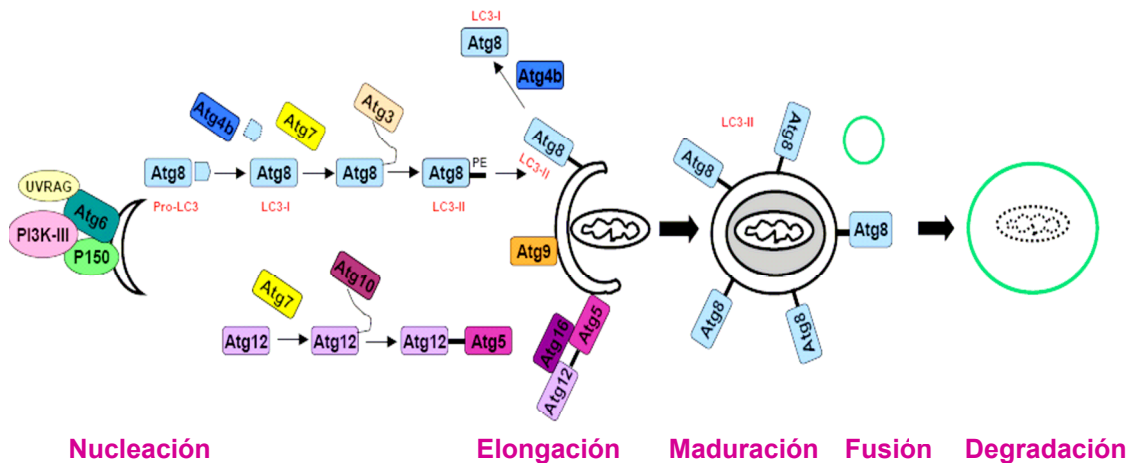


Figura 19. La maquinaria de autofagia. La figura muestra la contribución de las proteínas Atg's más importantes en el proceso de autofagia.

Atg1 es una serina-treonina quinasa que forma un complejo con proteínas reguladoras (Atg13 y Atg17). Su actividad quinasa es importante para la autofagia, ya que este complejo quinasa regula la magnitud de la autofagia (Matsuura, Tsukada et al. 1997; Kamada, Funakoshi et al. 2000). En condiciones ricas en nutrientes, Atg13 se hiperfosforila y su asociación con Atg1 se bloquea. Sin embargo, en condiciones de privación de nutrientes, Atg13 llega a estar parcialmente defosforilada, lo que permite la interacción entre Atg1 y Atg13, y la consiguiente generación de la membrana del autofagosoma (Reggiori, Tucker et al. 2004).

2) Complejo formado por Beclina1/Atg6. Beclina1 fue inicialmente identificada como una proteína de interacción con Bcl-2 en levaduras (Liang, Kleeman et al. 1998). El gen de Beclina1 se encuentra deletado monoalélicamente en el 75% de tumores de ovario, el 50% de cánceres de mama y el 40% de tumores de próstata (Aita, Liang et al. 1999). También se ha observado una disminución en la expresión de Beclina1 en otros tipos de tumores como el de cerebro (Miracco, Cosci et al. 2007) y el carcinoma cervical (Wang, Xu et al. 2007).

La principal función de Beclina1 es la supresión de tumores mediante la inducción de autofagia. Por tanto, los niveles de Beclina1 así como su estado en la célula son un factor crítico en la regulación de este proceso. Además, Beclina1 puede funcionar como inhibidora del crecimiento celular y la tumorigénesis (ejemplo: la baja expresión de Beclina1 aumenta la progresión del cáncer de mama). Pero Beclina1 tiene otras funciones. Por ejemplo, la expresión de Beclina1 es importante para disminuir los agregados de proteínas (Shibata, Lu et al. 2006), que suponen un papel protector de autofagia en procesos de neurodegeneración (Rubinsztein, DiFiglia et al. 2005). Por otro lado, la disminución del aporte de aminoácidos a la célula, estimula la actividad de la PI3K-III asociada a Beclina1 (Tassa, Roux et al. 2003), induciendo autofagia, como veremos más adelante.

Estructuralmente, Beclina1 es una proteína de 60 KDa que contiene 450 aminoácidos (Figura 20). Posee un dominio de cola central (CDD), formado por los aminoácidos 140-268, que puede interactuar con PIST (Yue, Horton et al. 2002) y UVRAG (Liang, Feng et al. 2006). Contiene otro dominio conservado evolutivamente (ECD), formado por los aminoácidos 244-337, que media la unión a la PI3K-III/Vps34 (Furuya, Yu et al. 2005). Además, se ha descrito una nueva región de homología a Bcl2, es decir, un dominio BH3, formada por los aminoácidos 114-123, y que media la interacción con Bcl-2 y homólogos a éste (Bcl-X_L y Mcl-1) (Maiuri, Le Toumelin et al. 2007; Oberstein, Jeffrey et al. 2007). También posee un dominio de señalización nuclear, formado por los aminoácidos 180-190, responsable del transporte de Beclina1 desde el núcleo al citosol (Liang, Yu et al. 2001).

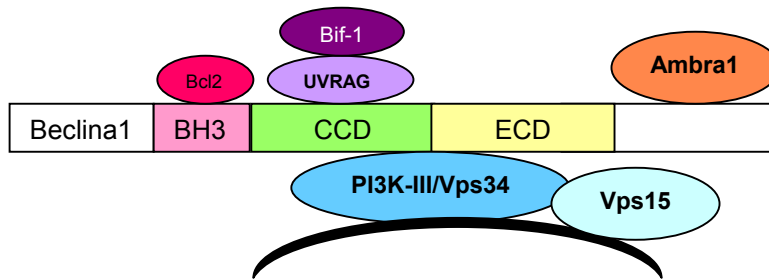


Figura 20. Representación esquemática de los dominios de Beclina1. BH3: dominio de homología a Bcl-2; CCD: Dominio cola central; ECD: dominio conservado evolutivamente. Adaptada de (Cao and Klionsky 2007).

La localización de Beclina1 se ha identificado en el trans-Golgi (Kihara, Kabeya et al. 2001), en el retículo endoplásmico, en la mitocondria y en la membrana perinuclear (Liang, Yu et al. 2001; Patingre, Tassa et al. 2005). En levaduras, hay una proteína vacuolar idéntica a Atg6, Vps30 (Kametaka, Okano et al. 1998). Como muestra la Figura 21, Atg6/Vps30 forma un complejo con Vps34/PI3K-III y con su adaptador Vps15, que es una proteína transmembrana. Cuando este complejo se asocia a Vps14 forma el denominado Complejo-I, que regula autofagia. Sin embargo, si Atg6-Vps34 se une a Vps38 forma el Complejo-II, que regula las proteínas de la vacuola (Kihara, Noda et al. 2001). De esta forma, el Complejo-I contribuye a la formación del autofagosoma, permitiendo que otras proteínas Atg se localicen en la estructura preautofagosomal (Suzuki, Kirisako et al. 2001).

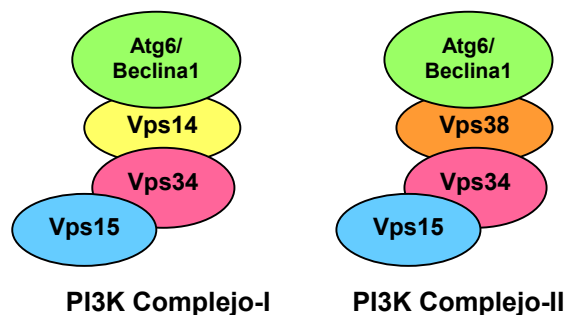


Figura 21. Los complejos entre Beclina1 y PI3K. Adaptada de (Cao and Klionsky 2007).

Como hemos visto anteriormente, Beclina1 forma parte de un complejo multiproteico que actúa como plataforma para reclutar activadores o represores de la autofagia. Entre las proteínas que interactúan con Beclina1, podemos encontrarnos las que siguen:

a) Beclina1-PI3K-III. Beclina1 se une al homólogo de Vps34 en mamíferos, la PI3K-III, formando un complejo que se localiza en el trans-Golgi (Kihara, Kabeya et al. 2001). PI3K/Vps34 se une a Beclina1 por su dominio ECD, que es esencial para esta unión y para su función como supresor de tumores (Furuya, Yu et al. 2005; Zeng, Overmeyer et al. 2006). En levaduras, se ha visto que este complejo está implicado en la clasificación de proteínas vacuolares (VPS) y en autofagia, mientras que en mamíferos no se ha identificado ningún papel en el tráfico de proteínas. Recientemente se ha observado que la interacción entre Beclina1 y PI3K/Vps34 puede regular los niveles de autofagia en la célula. Así, Bcl-2, es capaz de romper la interacción entre Beclina1 y PI3K/Vps34 en células tumorales de colon (Patingre, Tassa et al. 2005), o bien UVRAG, que es un activador de autofagia, puede potenciar la interacción entre ambas proteínas (Liang, Feng et al. 2006), como veremos más adelante.

El papel de la PI3K en la regulación de autofagia es complejo y no está claro. Una posible hipótesis es que actúe en distintos compartimentos subcelulares para regular autofagia o la actividad de mTOR (Dann and Thomas 2006; Nobukuni, Kozma et al. 2007), un sensor del estado metabólico de la célula, del que hablaremos más adelante.

b) Beclina1-UVRAG. UVRAG es un supresor de tumores que está mutado monoalélicamente con elevada frecuencia en cánceres de colon. Se ha visto recientemente que puede unirse a Beclina1 a través de su dominio CCD, induciendo la formación del complejo Beclina1-PI3K/Vps34. La activación de Beclina1-PI3K/Vps34

mediada por UVRAG promueve autofagia e inhibe proliferación y tumorigenicidad de células tumorales de colon (Liang, Lee et al. 2008). Además, se ha visto que la interacción de UVRAG con Beclina1-PI3K/Vps34 estimula la actividad GTPasa de Rab7, así como la fusión del autofagosoma con el lisosoma o el endosoma tardío, favoreciendo la degradación del contenido de la vesícula autofágica. Así, UVRAG puede actuar regulando no sólo dos pasos importantes en la autofagia (formación y maduración de los autofagosomas) sino también controlando la fusión lisosomal, que promueve el transporte de vesículas autofágicas a los lisosomas para ser degradadas (Liang, Lee et al. 2008). Por otro lado, se ha sabido en los últimos meses que Beclina1 forma un dímero a través de su dominio CCD *in vivo* e *in vitro*, y que UVRAG induce la disrupción de este dímero de Beclina1, formándose heterodímeros entre Beclina1 y UVRAG, y dando lugar a la activación de la autofagia (Noble, Dong et al. 2008). Otro papel de UVRAG es permitir que Bif-1, también conocido como Endofilina B1, interaccione con Beclina1 (Figura 20), funcionando como mediador positivo de la PI3K-III y regulando la autofagia. Así, Bif-1 se une a UVRAG a través de su dominio SH3. En condiciones de privación de nutrientes, Bif-1 se localiza en los autofagosomas, donde colocaliza con Atg5 y con LC3 (Takahashi, Coppola et al. 2007).

c) Beclina1-Ambra1. Ambra1 se ha identificado como otra proteína de unión a Beclina1, que actúa como activadora de autofagia. Se expresa principalmente en el cerebro, donde juega un importante papel durante el desarrollo del tubo neural. No se sabe cómo Ambra1 se une a Beclina1, pero se sabe que el defecto funcional de Ambra1 en embriones de ratón, da lugar a defectos severos en el tubo neural. Bioquímicamente, esta carencia da lugar a alteraciones en el proceso de autofagia, en la acumulación de proteínas ubiquitinadoras, en la proliferación celular desequilibrada y en la muerte excesiva por apoptosis. Por tanto, Ambra1 juega un papel en autofagia,

crecimiento celular y muerte durante el desarrollo del tubo neural, algunas de estas funciones mediadas por su unión a Beclina1 (Fimia, Stoykova et al. 2007).

d) Beclina1-Bcl-2/Bcl-X_L. Beclina1 se describió originariamente por su interacción con Bcl-2. La interacción entre Beclina1 y Bcl-2 o Bcl-X_L es un mecanismo de regulación de autofagia, que trataremos más adelante en el apartado 2.2.4.

e) Beclina1-ICP34.5. ICP34.5 es una proteína tipo-I del virus herpes simple (HSV), capaz de interactuar con Beclina1 e inhibir su función autofágica. Recientemente se ha observado que al utilizar un HSV-1 que contiene un mutante de ICP34.5 incapaz de unirse a Beclina1, se producía un fallo en la inhibición de la autofagia en neuronas, lo que disminuía la capacidad de producir encefalitis en ratones. Por tanto, las proteínas virales utilizan a Beclina1 para inhibir la autofagia y conferir patogenicidad (Orvedahl, Alexander et al. 2007).

3) Sistemas de conjugación por ubiquitina. Durante el proceso de formación de los autofagosomas, deben producirse dos sistemas de conjugación por ubiquitina: Atg8/LC3 y Atg12. Estas proteínas participan en reacciones inusuales utilizando enzimas tipo E1, E2 y E3, que conjugan ubiquitina a sustratos de proteínas.

a) Atg8/LC3. Atg8/LC3 se identificó como una proteína que co-purificaba con las proteínas 1A y 1B asociadas a microtúbulos de cerebro de ratón (Mann and Hammarback 1994). Además, se vio que tenía un 28% de homología con la proteína Apg8/Aut7, esencial para la autofagia en levaduras (Liang, Jackson et al. 1999). Atg8/LC3 fue la primera molécula autofágica encontrada, que se localizó en estructuras autofagosomales y que es necesaria para su formación (Kirisako, Baba et al. 1999). Se comporta como una proteína integral de membrana aunque no posee la región transmembrana. Atg8/LC3 forma parte de la maquinaria de autofagia en estadios iniciales (Ichimura, Kirisako et al. 2000). Tras su síntesis, el fragmento carboxiterminal de Atg8/LC3 es procesado por una cisteín proteasa, la Atg4, dando

lugar a la forma citosólica LC3-I, que expone un residuo de Glicina en su extremo carboxiterminal (Hemelaar, Lelyveld et al. 2003; Kabeya, Mizushima et al. 2004; Tanida, Sou et al. 2004). LC3-I se activa fuertemente por Atg7, una enzima tipo E1, se transfiere a Atg3, una enzima tipo E2, y finalmente se transforma en su forma de unión a membrana, LC3-II (Tanida, Mizushima et al. 1999; Tanida, Tanida-Miyake et al. 2001; Tanida, Tanida-Miyake et al. 2002). El LC3-II se localiza en la membrana del autofagosoma, haciendo de esta proteína un marcador de autofagia (Kabeya, Mizushima et al. 2000; Klionsky, Cuervo et al. 2007). Se ha identificado también una forma de LC3-II conjugada con fosfatidiletanolamina (PE) (Kabeya, Mizushima et al. 2004), al igual que su homólogo en levaduras (Apg8-PE) (Ichimura, Kirisako et al. 2000), que se localiza en la membrana de las vesículas autofágicas. El Atg8/LC3-PE se multimeriza y media la hemifusión de lisosomas, además de fusionarse a la membrana permitiendo su expansión, y la completa formación del autofagosoma (Chernomordik and Kozlov 2005; Nakatogawa, Ichimura et al. 2007). Esta forma conjugada puede volver a su estado normal por la acción de Atg4b (Kirisako, Ichimura et al. 2000).

Durante la autofagia, Atg8/LC3 se localiza en las estructuras preautofagosomales, que se asocian al fagóforo. Cuando el fagóforo madura a autofagosoma, algunos Atg8/LC3 son atrapados dentro y, eventualmente, degradados (Kabeya, Mizushima et al. 2000; Tanida, Minematsu-Ikeguchi et al. 2005). Por tanto, y como se ha demostrado recientemente, Atg8/LC3 controla la expansión del fagóforo durante la formación del autofagosoma (Xie, Nair et al. 2008). Sin embargo, su ausencia no afecta a la función de otras proteínas de la maquinaria de autofagia (Suzuki, Kubota et al. 2007).

En los últimos años se han descrito dos variantes de LC3: LC3A y LC3B. La última es una variante de LC3 obtenida por splicing alternativo. LC3A, LC3B y LC3

muestran diferente expresión en los distintos tejidos, sugiriendo una divergencia funcional. Por su parte, LC3A y LC3B colocalizan con LC3 y se encuentran asociadas a la membrana del autofagosoma. Además, los residuos de Glicina 120 de LC3A y LC3B son esenciales para su corte en el extremo carboxiterminal y para su localización en la membrana autofágica (Wu, Dang et al. 2006).

b) Atg12-Atg5-Atg16L. Atg12 se activa por Atg7 (Mizushima, Noda et al. 1998; Tanida, Mizushima et al. 1999), lo que permite que se transfiera a Atg10 (Shintani, Mizushima et al. 1999) para finalmente unirse covalentemente a Atg5. La unión se realiza entre el extremo carboxiterminal de Atg12 y un residuo de Lisina interno de Atg5 (Mizushima, Noda et al. 1998). El conjugado se asocia con Atg16L, y el complejo se homo-oligomeriza. Como resultado, Atg12, Atg5 y Atg16L forman un complejo proteico de 800 KDa (conocido como Complejo 16L) (Fujita, Itoh et al. 2008). Este proceso requiere ATP (Mizushima, Noda et al. 1998). Una fracción del complejo multimérico se localiza en membranas aisladas, mientras que la mayoría está difuso en el citoplasma (Mizushima, Yamamoto et al. 2001; Mizushima, Kuma et al. 2003). El conjugado Atg12-Atg5-Atg16L se disocia justo tras la completa formación de la vacuola autofágica (Mizushima, Yamamoto et al. 2001; Mizushima, Kuma et al. 2003). A pesar de que Atg5 es esencial para la elongación de membranas aisladas, la función del complejo no está clara. Sin embargo, recientemente, varios estudios han mostrado que la mutación de Atg16L es un factor de riesgo en la enfermedad de Crohn, sugiriendo que Atg16L es una molécula clave en la prevención de dicha enfermedad (Hampe, Franke et al. 2007; Rioux, Xavier et al. 2007). Por otro lado, Atg16L está a su vez regulada por una GTPasa que reside en el Golgi, Rab33, interaccionando específicamente con Atg16L, de forma dependiente de guanosina trifosfato, e impidiendo la formación del autofagosoma (Itoh, Fujita et al. 2008).

La conjugación Atg12-Atg5-Atg16L es necesaria para la posterior modificación de Atg8, facilitando directamente la formación de Atg8-PE, actuando como una enzima tipo E3 para producir la lipidación de proteínas en autofagia (Hanada, Noda et al. 2007).

La Figura 22 muestra un resumen de las etapas moleculares de la autofagia, así como de sus inhibidores (Maiuri, Zalckvar et al. 2007).

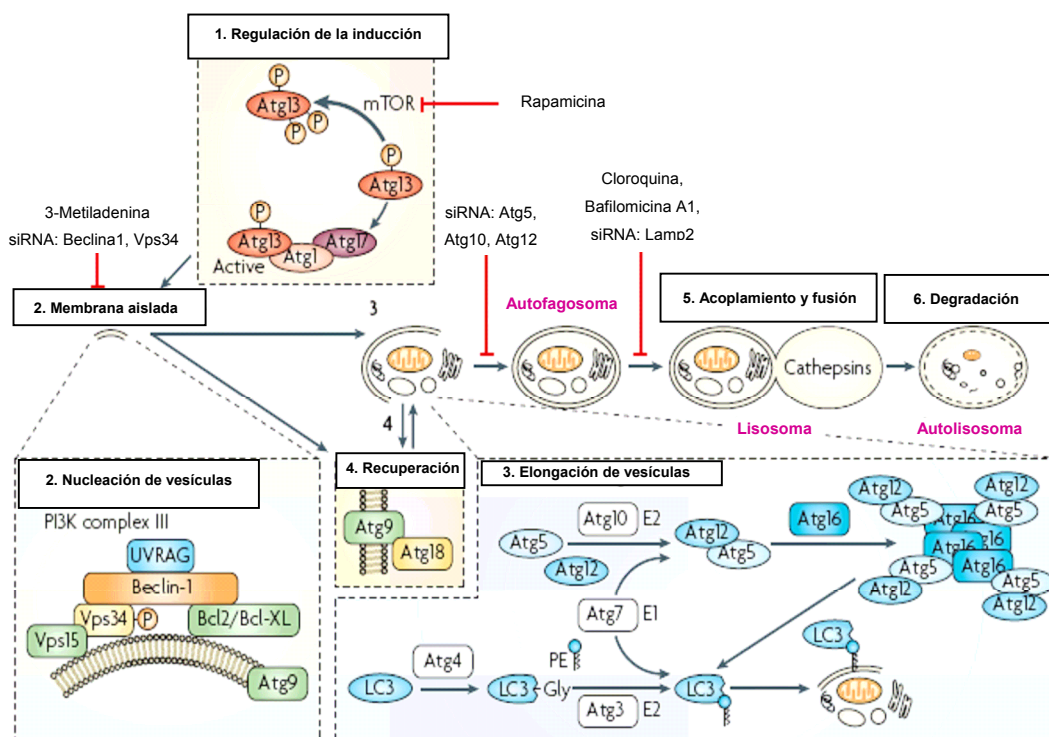


Figura 22. Mecanismos moleculares de la autofagia y sus inhibidores. Adaptada de (Maiuri, Zalckvar et

2.2.3. AMPK y mTOR en la regulación de autofagia.

Una gran variedad de estímulos son capaces de inducir autofagia, lo que sugiere que hay numerosas vías de señalización que pueden participar y converger en la maquinaria de autofagia. A continuación hablaremos de las dos moléculas mejor conocidas: AMPK y mTOR.

1) **mTOR**. La diana en mamíferos de Rapamicina (mTOR) es una serina treonina quinasa de 289 KDa que se expresa en todas las células eucariotas. Fue descubierta en 1994 (Brown, Albers et al. 1994), estudiando los mecanismos de señalización de Rapamicina, un macrólido lipofílico que se aisló en 1975 (Vezina, Kudelski et al. 1975) y que tiene un potencial antifúngico, inmunosupresor y anticancerígeno. Aunque TOR está bien conservado en especies animales y levaduras, en levaduras y hongos existen dos genes homólogos de TOR, mientras que en eucariotas superiores sólo hay un gen (Lorberg and Hall 2004).

La quinasa mTOR es un sensor intracelular que integra señales metabólicas transmitidas por factores hormonales, estrés, disponibilidad de nutrientes y estado energético de la célula, siendo capaz de regular numerosas funciones fisiológicas, incluyendo la transcripción de genes, el metabolismo de proteínas, el ciclo celular y la organización del citoesqueleto (Schmelzle and Hall 2000; Kahn and Myers 2006).

Respecto a su estructura, TOR contiene una región catalítica en su extremo carboxiterminal, con elevada homología con el dominio catalítico de la PI3K y la PI4K (Kunz, Henriquez et al. 1993; Keith and Schreiber 1995).

En respuesta a factores de crecimiento y aminoácidos, mTOR controla la maquinaria de traducción de proteínas a través de la activación de la proteína quinasa p70^{S6K} y de la inhibición de 4E-BP1, un inhibidor del factor eIF4 (Thomas and Hall 1997; Hara, Yonezawa et al. 1998). Por otro lado, controla la transcripción de genes a través de la activación de STAT3 y de la inhibición de la proteína de retinoblastoma (pRb), regulando la acción de las Polimerasas I, II y III (Figura 23).

Los efectores mejor caracterizados son la proteína quinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) y 4E-BP1 (también llamado PHAS-I). La quinasa S6K se fosforila directamente por mTOR tras su estimulación por factores de crecimiento o nutrientes, lo que resulta en un incremento en la traducción de transcritos de ARNm que

contienen motivos 5'-TOP (Dufner and Thomas 1999). Estos ARNm con motivos 5'-TOP codifican para componentes del aparato traduccional como factores de elongación y proteínas ribosomales (Terada, Patel et al. 1994; Bjornsti and Houghton 2004). Por tanto, se promueve un incremento en la síntesis de proteínas y en el crecimiento de la célula. Por otro lado, 4E-BP1 es un inhibidor del factor de iniciación de traducción eIF4E. Una vez se hiperfosforila por mTOR, 4E-BP1 se disocia de eIF4E, lo que permite a éste unirse al motivo 5'-CAP de ARNm, iniciándose la traducción (Gingras, Gygi et al. 1999; Lawrence and Brunn 2001).

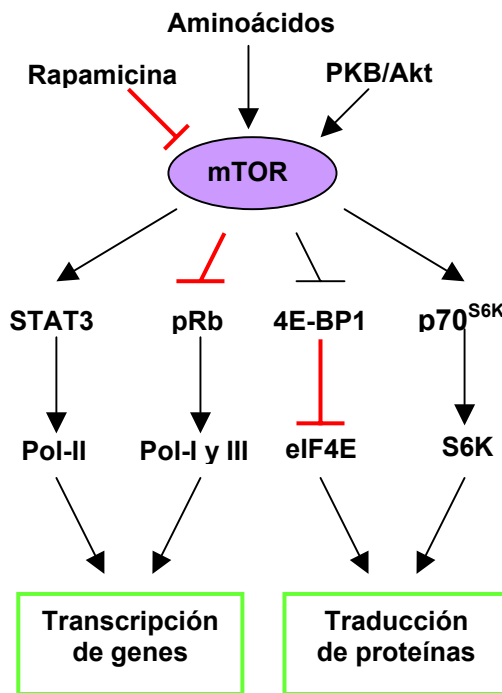


Figura 23. Efectores de mTOR y su señalización en células animales. Adaptada de (Schneider and Tschopp 2000).

En células humanas, mTOR existe formando dos complejos multiproteicos (Figura 24), el Complejo-I y el Complejo-II, dependiendo de los estímulos que se inducen en la célula. De este modo, hay una señalización de mTOR sensible a rapamicina y dependiente de nutrientes (Complejo-I) y otra insensible a rapamicina y

dependiente de insulina (Complejo-II). El Complejo-I (conocido como TORC1) está formado por un polipéptido de 150 KDa, llamado Raptor, que se une selectivamente a mTOR. Raptor contiene 1335 aminoácidos no catalíticos con segmentos conservados en su extremo aminoterminal y siete dominios WD en su extremo carboxiterminal. El polipéptido GβL o mLST8, de 36 KDa, se compone de siete dominios WD y también forma parte de TORC1 (Kim, Sarbassov et al. 2003).

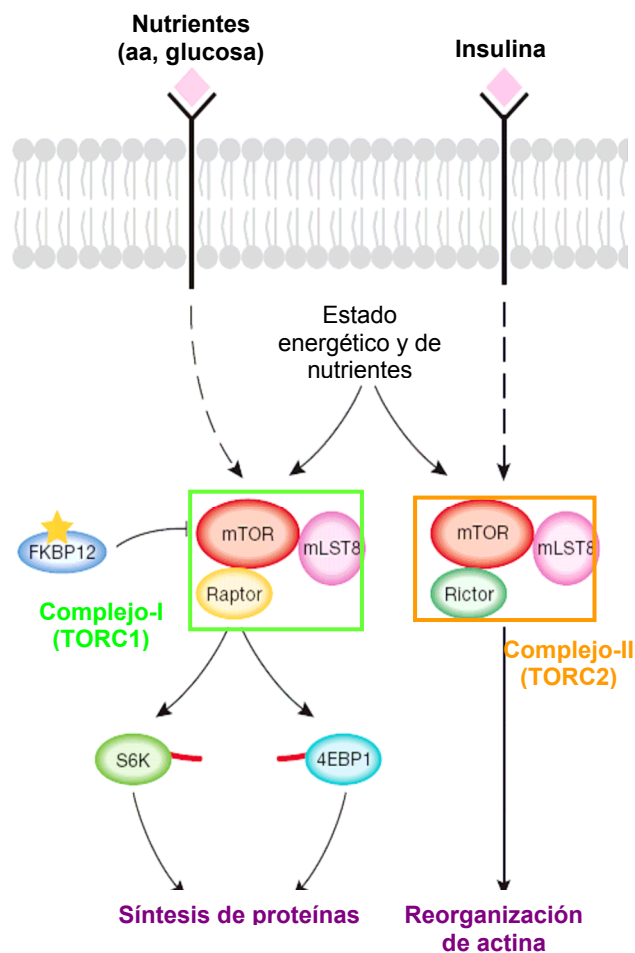


Figura 24. Complejos I y II formados por mTOR. FKBP12: Rapamicina; mLST8: GβL. Adaptada de (Templeton and Moorhead 2005).

Aunque se sabe que GβL es necesario para la señalización y función de mTORC1, no se conoce su papel específico. Se ha sugerido que podría funcionar como receptor de señales por encima de mTORC1 (Kim, Sarbassov et al. 2003),

aunque otros autores han propuesto que regula señales por debajo de mTORC1 (Chen and Kaiser 2003). Lo que se sabe es que LST8 o GβL es necesario para la completa actividad catalítica de mTOR (Wullschleger, Loewith et al. 2005).

El segundo complejo que forma TOR (TORC2) es insensible a rapamicina y media el crecimiento celular (Loewith, Jacinto et al. 2002). Este complejo multimérico está formado por mTOR, Rictor y mLST8/GβL. Algunos autores indican que la proteína hSIN1, que tiene homología con AVO1 de levaduras, también se une al complejo, aunque no hay evidencias de que exista una interacción estable entre mTOR y hSIN1 (Loewith, Jacinto et al. 2002). Rictor, también conocida como mAVO3, es una proteína de 200 KDa que no contiene motivos catalíticos. El complejo-II está implicado en procesos de proliferación celular (Jacinto, Loewith et al. 2004; Sarbassov, Ali et al. 2004).

El complejo mTORC1 está regulado por dos mecanismos, controlados por AMPK, como veremos más adelante, y por Akt/PKB. Al contrario que AMPK, Akt es un activador de mTOR, y sus moléculas reguladoras también controlan autofagia. Se ha visto que la expresión de formas constitutivamente activas o dominantes negativos de Akt inhiben o activan, respectivamente, la autofagia espontánea en cáncer de colon (Arico, Petiot et al. 2001). En línea con estos datos, el tratamiento de células HT-29 con lípidos PI(3,4,5) y PI(3,4), que activan Akt, bloquea la autofagia espontánea (Petiot, Ogier-Denis et al. 2000).

Cuando se inhibe mTOR por deprivación de nutrientes, estrés o falta de factores de crecimiento, se inhibe la biogénesis de ribosomas, ya que es un proceso que requiere mucha energía (Mayer and Grummt 2006). Además, esta inhibición de mTOR estimula el proceso catabólico de autofagia para obtener energía (Shintani and Klionsky 2004; Meijer and Codogno 2006). En relación a esta función, se ha visto que la depleción de mTOR mediante siRNAs aumenta la formación de autofagosomas

inducida por Rapamicina, sugiriendo que mTOR previene la autofagia (Iwamaru, Kondo et al. 2007). El mecanismo por el que mTOR previene la autofagia aún no está muy bien caracterizado en mamíferos. En levaduras, se sabe que TOR hiperfosforila a Atg13, inhibiendo su interacción con Atg1 (Kamada, Funakoshi et al. 2000). Debido a que no se ha encontrado un ortólogo de Atg13 en humanos, hay algunos autores que apuntan a que el factor de elongación eEF2, que está regulado por mTOR, activa la autofagia, sugiriendo que mTOR media la inhibición de autofagia mediante el bloqueo de este sustrato (Wu, Yang et al. 2006). Sin embargo, también se ha visto que la autofagia inducida por litio, vimblastina o disminución de leucina, tiene lugar en ausencia de inhibición de mTOR, lo que sugiere que puede inducirse autofagia de forma independiente de mTOR (Mordier, Deval et al. 2000; Kochl, Hu et al. 2006). En esta línea, se ha demostrado recientemente que el disacárido Trehalosa, presente en numerosas especies no animales, es también capaz de inducir autofagia independientemente de mTOR (Sarkar, Davies et al. 2007). Por otro lado, se ha visto que la activación del gen supresor de tumores p53, inhibe la actividad de mTOR, induciendo autofagia. Este mecanismo implica la activación de la ruta de AMPK, que veremos a continuación (Feng, Zhang et al. 2005).

2) AMPK. La quinasa activada por adenina monofosfato (AMP) es un complejo heterotrimérico que se activa por un aumento en la relación AMP/ATP. AMPK fue descubierta como una proteína soluble que, en presencia de ATP, producía la activación de enzimas reguladoras de la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Beg, Allmann et al. 1973; Carlson and Kim 1973). Se purificó en 1994, revelándose que contenía tres subunidades (Davies, Hawley et al. 1994). Actualmente se sabe que el complejo heterotrimérico se compone de una subunidad catalítica α y de dos subunidades reguladoras β y γ (Figura 25). Cada subunidad está codificada por múltiples genes ($\alpha 1, \alpha 2; \beta 1, \beta 2; \gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$), dando lugar al menos a 12 combinaciones

heterotriméricas por splicing. Las dos isoformas de la subunidad α contienen un dominio quinasa en su extremo aminoterminal, cuya fosforilación en la treonina 172 es necesaria para su actividad (Hawley, Davison et al. 1996), mientras que el dominio de unión a las isoformas β y γ para formar el complejo, se encuentra en la región carboxiterminal (Iseli, Walter et al. 2005). La subunidad β contiene dos regiones conservadas, localizadas en las regiones central y carboxiterminal (Jiang and Carlson 1997). El dominio carboxiterminal es necesario para formar un complejo $\alpha\beta\gamma$ funcional, mientras que la región central es un dominio de unión a glicógeno (Hudson, Pan et al. 2003; Polekhina, Gupta et al. 2003). La subunidad γ está formada por regiones variables en su extremo aminoterminal, seguidas de cuatro repeticiones en tandem de una secuencia de 60 aminoácidos, llamada motivo CBS, y que sirven para unir moléculas de AMP (Scott, Hawley et al. 2004).

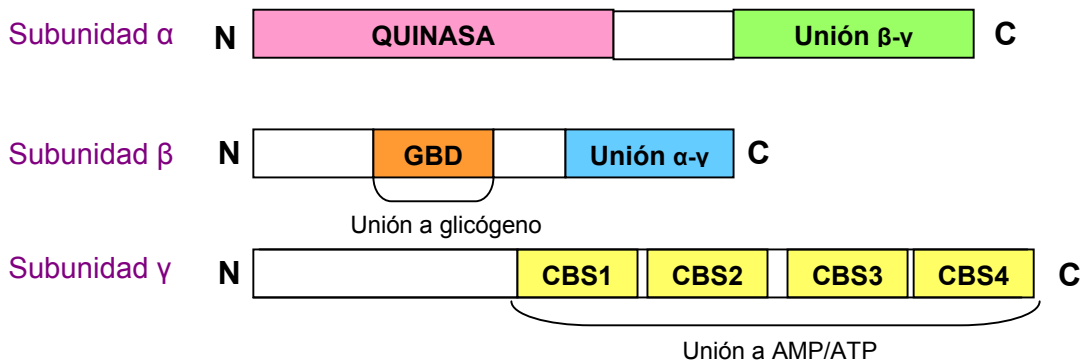


Figura 25. Dominios estructurales de las subunidades α , β , γ de AMPK.

La activación del complejo de AMPK por AMP tiene lugar a través de tres mecanismos independientes (Hardie, Salt et al. 1999): 1) activación alostérica de la enzima fosforilada; 2) promoción de la fosforilación de la treonina 172 por una quinasa; y 3) inhibición de la defosforilación de la treonina 172 por fosfatasas. Este triple

mecanismo sugiere que el sistema es muy sensible y que un mínimo cambio en la concentración de AMP puede producir una gran señalización.

Entre las funciones de AMPK, la principal es la de sensor el estatus energético de la célula, función que está conservada en células eucariotas. Así, puede activar mecanismos de señalización como el aporte de glucosa, la glicólisis, la oxidación de ácidos grasos y la biogénesis de la mitocondria, así como inhibir otras rutas como la síntesis de ácidos grasos y colesterol, la gluconeogénesis, la síntesis de glicógeno o la síntesis de proteínas (Hardie, Hawley et al. 2006). En los últimos años, y tras demostrarse que AMPK podía inhibir a mTOR y bloquear la síntesis de proteínas (Meijer and Dubbelhuis 2004), se ha concluido que AMPK no sólo es una proteína reguladora de mTOR, como rapamicina, sino que es necesaria para la autofagia en mamíferos (Meley, Bauvy et al. 2006) así como en levaduras (Wang, Wilson et al. 2001). Sin embargo, la activación de AMPK por un activador directo, AICAR, en hepatocitos inhibe la autofagia (Samari and Seglen 1998), sugiriendo que la inhibición de la autofagia por AICAR no está relacionada con su capacidad para activar AMPK. Además, se ha visto que AICAR activa PKB/Akt, un potente activador de mTORC1, de forma independiente de AMPK (Jhun, Jin et al. 2004). Por otro lado, el uso de un inhibidor de AMPK, el Compuesto-C, es capaz de inhibir autofagia, lo que apoya la idea de que AMPK es necesario para inducir autofagia (Meley, Bauvy et al. 2006).

Bajo condiciones de privación de nutrientes y falta de energía, donde el ratio AMP/ATP está elevado, AMPK se activa y fosforila a los genes supresores de tumores TSC1 y TSC2, que tienen actividad GTPasa. Ambas proteínas forman un complejo intracelular que inhibe la actividad de mTOR a través de la inhibición de una proteína G de unión a GTP homóloga a Ras, Rheb (Jozwiak, Jozwiak et al. 2005; Sarbassov, Ali et al. 2005; Corradetti and Guan 2006). Ésta es capaz de activar a mTOR, regulando la autofagia (Figura 26).

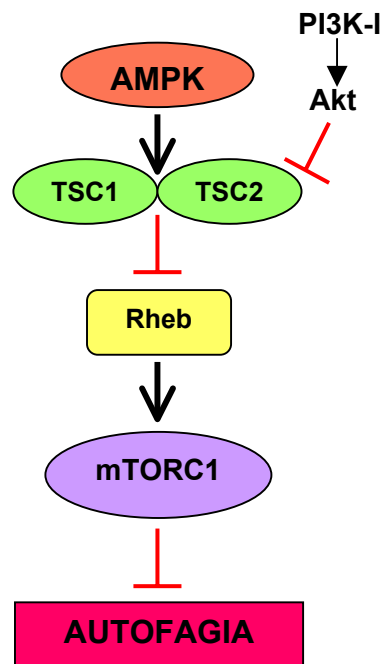


Figura 26. Señalización entre AMPK y mTOR para inducir autofagia.

El ortólogo de AMPK en levaduras, Snf1, ha sido identificado como un inductor de autofagia (Wang, Wilson et al. 2001). Además, evidencias genéticas en *Drosophila* indican que la ruta TSC1/TSC2-Rheb juega un papel en la señalización a autofagia (Scott, Schuldiner et al. 2004). A pesar de que no se ha demostrado que TSC1/TSC2 o Rheb jueguen un papel directo en la autofagia en mamíferos, AMPK es esencial para inducir autofagia a través de la inhibición de mTOR.

2.2.3.1. La regulación de AMPK: CaMKK β , LKB1 y TAK1.

AMPK puede estar, a su vez, regulada por tres quinasas conocidas, en función del estímulo. Como muestra la Figura 27, en condiciones de aumento del ratio AMP/ATP en la célula, AMPK se activa a través de la quinasa LKB1. Por otro lado, cuando se produce un incremento en la concentración de calcio intracelular, se activa la quinasa CaMKK β , que es capaz de activar a AMPK. Recientemente se ha descrito

otra quinasa que puede activar a AMPK cuando es estimulada por citoquinas (IL-1 β , TNF α , TGF- β): TAK1. A continuación hablaremos de estas quinasas.

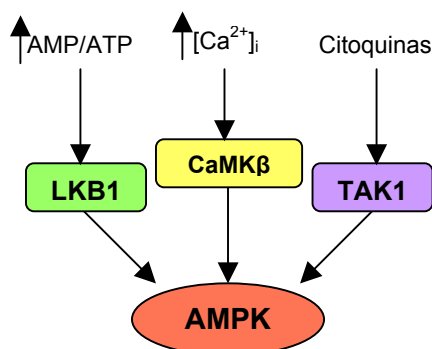


Figura 27. Esquema de las quinasas de activación de AMPK y sus diferentes estímulos.

1) **LKB1.** La serina treonina quinasa LKB1 es la quinasa mejor caracterizada de AMPK. Su función más importante es ser un punto de control de la energía de la célula, regulando así el metabolismo (Shaw, Kosmatka et al. 2004). También se ha estudiado como molécula de señalización en la polaridad celular (Brenman 2007; Mirouse, Swick et al. 2007; Williams and Brenman 2008). Un estudio reciente identifica otras funciones metabólicas como mediador de diabetes tipo-II (Williams and Brenman 2008). Además, LKB1 ha sido identificada en humanos como una proteína supresora de tumores ya que mutaciones en el gen de LKB1 causan el Síndrome de Peutz-Jeghers, caracterizado por un incremento en el riesgo de adenocarcinoma de pulmón, carcinoma cervical y cáncer de mama (Marignani 2005; Katajisto, Vallenius et al. 2007). LKB1 es un heterotrímero que requiere de otras dos proteínas (STRAD y MO25) para su actividad catalítica (Hawley, Boudeau et al. 2003; Kahn, Alquier et al. 2005). Esta quinasa es capaz de fosforilar la treonina 172 de AMPK, dando lugar a su activación (en respuesta a cambios en el ratio AMP/ATP en la célula), y a la posterior inhibición de mTOR (Hawley, Boudeau et al. 2003; Baas, Smit et al. 2004; Shaw, Bardeesy et al. 2004). Además de su implicación en el metabolismo energético, tiene

la capacidad de regular múltiples procesos celulares como la parada del ciclo celular, la señalización mediada por Wnt, la remodelación de la cromatina o la señalización por TGF- β (Baas, Smit et al. 2004; Marignani 2005). También se sabe que LKB1 es capaz de proteger a las células de la apoptosis en respuesta a agentes que aumentan los niveles de AMP intracelulares, actuando como un punto de control de la célula en el metabolismo energético (Shaw, Kosmatka et al. 2004). Sin embargo, su implicación en la regulación de autofagia no se ha demostrado experimentalmente. Recientemente se ha demostrado que la ruta LKB1-AMPK regula la fosforilación de la proteína p27, controlando el hecho de que la célula decida ir hacia autofagia o apoptosis (Liang, Shao et al. 2007).

2) CaMKK β . La calcio/calmodulina quinasa quinasa β se ha identificado como una quinasa de AMPK en los últimos años (Hawley, Pan et al. 2005; Woods, Dickerson et al. 2005). Se sabe que induce activación de AMPK y autofagia cuando aumenta la concentración intracelular de calcio (Hoyer-Hansen, Bastholm et al. 2007), induciendo una inhibición del complejo mTORC1. Hay que destacar que la activación del receptor de células T activa a AMPK e induce autofagia de forma dependiente de la CaMKK β , regulando la homeostasis (Tamas, Hawley et al. 2006).

3) TAK1. TAK1 se identificó como miembro de la familia MAPKKK, funcionando como mediador de la señalización de los miembros de la familia de TGF- β a través de p38 y JNK (Yamaguchi, Shirakabe et al. 1995). También está implicado en la señalización mediada por la proteína morfogenética del hueso (BMP) (Shibuya, Iwata et al. 1998), así como en respuestas inflamatorias y del sistema inmune innato (Sato, Sanjo et al. 2005).

TAK1 se activa mediante la asociación con proteínas adaptadoras de unión a TAK1 (TAB), implicadas en la fosforilación de TAK1. Así pues, TAK1 forma un primer complejo con TAB1 y TAB2 y otro complejo con TAB1 y TAB3. Ambos complejos se

activan en respuesta a TNF o IL-1, y son necesarios para que la subunidad catalítica de TAK1 se fosforile en residuos serina-treonina para activarse (Cheung, Nebreda et al. 2004; Singhirunnusorn, Suzuki et al. 2005).

La quinasa de TGF- β regula numerosos procesos fisiológicos a través de mediadores intracelulares. Para ello, puede activarse mediante diversos estímulos. Por ejemplo, TAK1 se activa catalíticamente por TGF- β , jugando un papel en la activación de p38 (Hanafusa, Ninomiya-Tsuji et al. 1999), en la apoptosis inducida por TGF- β (Edlund, Bu et al. 2003) o incluso en el desarrollo vascular (Jadrich, O'Connor et al. 2006). Sin embargo, se sabe poco sobre cómo TAK1 media la señalización por TGF- β . Algunos estudios muestran que TAK1 interacciona con la proteína inhibidora de la señalización por TGF- β , SnoN, induciendo su degradación (Kajino, Omori et al. 2007). Recientemente se ha visto que TAK1 está involucrada en procesos de angiogénesis de tumores y metástasis, inducidas por TGF- β . Este proceso está mediado por un mecanismo que implica la activación de NF κ B, lo que lleva a la activación de la metaloproteínasa 9 (MMP9) (Safina, Ren et al. 2008). Otro estímulo que puede inducir la activación de TAK1 es TNF α . Se ha demostrado que TNF α también es capaz de inducir un aumento en la producción de MMP9 en células de músculo esquelético, a través de la activación de TAK1 (Srivastava, Qin et al. 2007). También se ha visto que la señalización que lleva a la activación de NF κ B por TNF α está mediada por TAK1, de forma que TNF α forma un complejo con su receptor TNFR1 (como hemos visto anteriormente), reclutando a RIP1, entre otras proteínas. RIP1 es necesario para que TAK1 se reclute al complejo, se active e induzca la activación de NF κ B a través de la activación de IKK (Blonska, Shambharkar et al. 2005; Jackson-Bernitsas, Ichikawa et al. 2007). IL-1 es otra citoquina capaz de activar a TAK1 y mediar la activación de NF κ B y JNK. Este mecanismo de señalización implica la formación de un primer complejo (Complejo-I), formado por IL-1, IL-1R, IRAK (una quinasa de asociación al

receptor de IL-1) y TRAF6 como molécula adaptadora. Este complejo recluta a TAK1-TAB1-TAB2, que se encuentran preasociados en la membrana antes de la llegada del estímulo, formándose un segundo complejo (Complejo-II), en el que TAK1-TAB2 se fosforilan en la membrana, disociándose IRAK de TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2 (Complejo-III). Este último complejo se trasloca al citosol, donde TAK1 se activa mediante la interacción con factores citosólicos, dando lugar a la activación de NFκB y JNK (Ninomiya-Tsuji, Kishimoto et al. 1999; Jiang, Ninomiya-Tsuji et al. 2002; Bertelsen and Sanfridson 2007). En relación con el sistema inmune, se sabe que en células B, TAK1 es necesario para la activación de MAPK pero no de NFκB. Sin embargo, en timocitos, TAK1 media la activación tanto de NFκB como de MAPKs inducida por el receptor de células T (TCR) (Sato, Sanjo et al. 2006). Por otro lado, se ha mostrado recientemente que, en células tumorales de cervix uterino y en células de adenocarcinoma de pulmón, el ligando de muerte TRAIL induce la fosforilación de TAK1, así como de sus proteínas activadoras TAB1 y TAB2, mediando la activación de NFκB y MAPKs. Además, la inhibición de TAK1 mediante siRNAs, induce un aumento en la apoptosis inducida por TRAIL a través de la activación de las caspasas. Estos datos sugieren que TAK1 tiene un importante papel en la regulación de la apoptosis mediada por TRAIL (Choo, Kawasaki et al. 2006).

Como hemos visto, TAK1 puede activar diversas rutas de señalización como NFκB y MAPKs (Shim, Xiao et al. 2005; Adhikari, Xu et al. 2007). Sin embargo, poco se sabe sobre la relación de TAK1 y AMPK. Inicialmente, se demostró que TAK1 era capaz de activar a Snf1, el homólogo de AMPK en levaduras, mediante la fosforilación de la treonina 210 de Snf1. Además, se vio que TAK1 también tenía la capacidad de fosforilar *in vitro* a la treonina 172 de la subunidad catalítica de AMPK (Momcilovic, Hong et al. 2006). Posteriormente se ha sugerido que TAK1 activa a AMPK a través de otra de sus quinasas, LKB1, tras la estimulación con AICAR, Metformina, Oligomicina

o isquemia (Xie, Zhang et al. 2006). Por tanto, como muestra la Figura 28, TAK1 es una reciente quinasa de AMPK en mamíferos que puede activarse por numerosos ligandos y mediar diversas rutas de señalización.

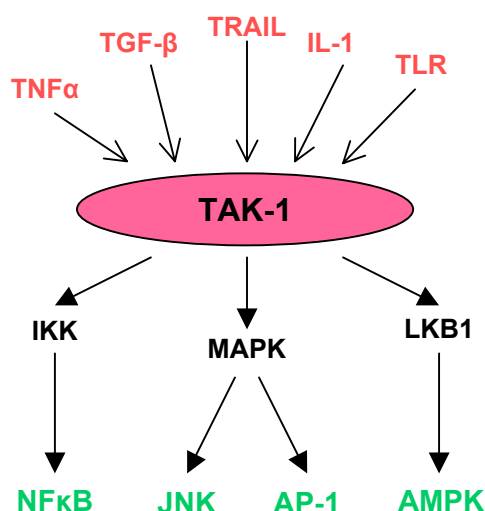


Figura 28. Esquema de señalización de TAK1 así como sus activadores.

2.2.4. Regulación de la autofagia: Bcl-2 y Atg5

La función de supervivencia de la autofagia se ha demostrado en diversos contextos, incluyendo la privación de nutrientes y factores de crecimiento, el estrés del retículo endoplásmico, las infecciones microbacterianas y enfermedades caracterizadas por acumulación de agregados proteicos (Levine and Yuan 2005; Lum, DeBerardinis et al. 2005; Maiuri, Zalckvar et al. 2007; Yorimitsu and Klionsky 2007). Aunque esta función parece ser adaptativa, hay algunos mecanismos capaces de bloquear la señalización de autofagia para promover muerte celular (Levine and Kroemer 2008). Entre las moléculas más importantes reguladoras de autofagia, nos encontramos Bcl-2 y Atg5.

1) **Bcl-2.** Como hemos visto anteriormente, Beclina1 tiene la capacidad de unir Bcl-2 o Bcl-X_L, pero no Bax, a través de su dominio BH3, siendo ésta una interacción

inhibitoria. La interacción de ambas proteínas está regulada por condiciones que, a su vez, regulan autofagia. Así pues, bajo condiciones ricas en nutrientes, cuando la autofagia está inhibida, Beclina1 y Bcl-2 interaccionan fuertemente. Sin embargo, la falta de nutrientes, cuando los niveles de autofagia son elevados, hace que la interacción entre Beclina1 y Bcl-2 sea débil y se disocien (Figura 29). Esto sugiere que Bcl-2 actúa como molécula reguladora de autofagia, bloqueando o permitiendo su señalización según las condiciones externas.

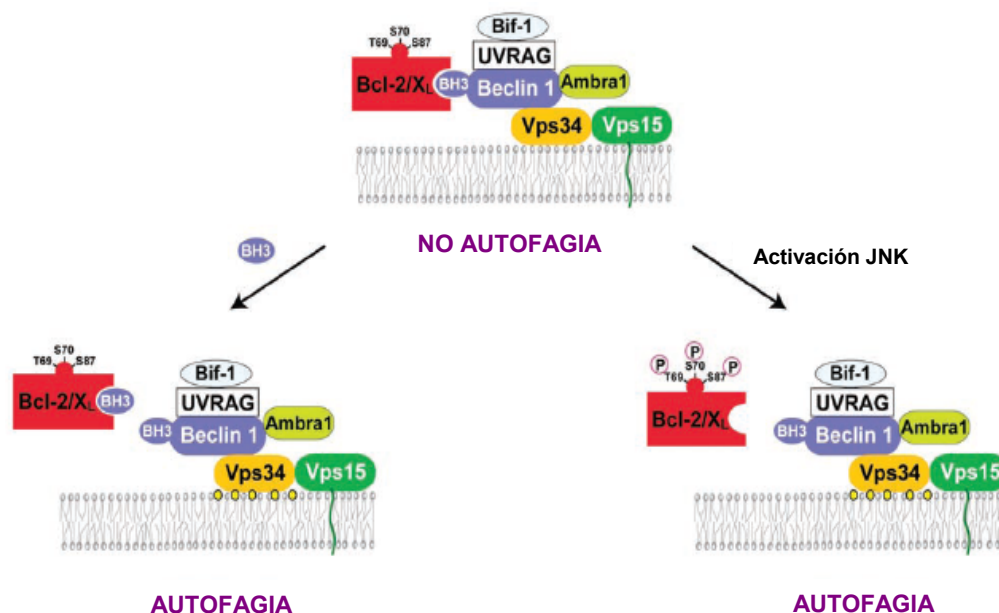


Figura 29. Interacciones de Beclina1 y su regulación por Bcl-2/Bcl-XL. Adaptada de (Levine, Sinha et al. 2008).

Esta interacción Beclina1-Bcl-2 a su vez está regulada por dos mecanismos. El primero se basa en el modelo de que otras proteínas con dominio BH3 puedan desplazar competitivamente a la proteína que esté unida al dominio BH3 de Beclina1, produciendo una ruptura entre Beclina1 y Bcl-2/Bcl-X_L, lo cual liberaría a Beclina1 de su inhibición por Bcl-2/Bcl-X_L (Oltersdorf, Elmore et al. 2005). El segundo mecanismo se ha descrito recientemente y relaciona la privación de nutrientes con la disociación de Beclina1 de su interacción con Bcl-2 mediante la fosforilación de este

último. Este proceso está mediado por JNK1, y permite que Bcl-2 se disocie de Beclina1, dejándola libre para inducir autofagia (Wei, Pattingre et al. 2008). Además, sólo el Bcl-2 localizado en el retículo endoplásmico, y no el de la mitocondria, es capaz de inhibir la autofagia (Pattingre, Tassa et al. 2005).

2) *Atg5*. Ya vimos que Atg5 está implicado en la formación del autofagosoma. Sin embargo, no sólo regula la autofagia mediante su conjugación con Atg12, como hemos descrito, sino que además aumenta la susceptibilidad a estímulos apoptóticos, de tal manera que cuando Atg5 es cortado por proteólisis mediada por las Calpaínas 1 y 2, se libera un Atg5 truncado de 24 KDa (que comprende los aminoácidos 1-193). Este Atg5 truncado se trasloca del citosol a la mitocondria, donde se asocia con Bcl-XL, bloqueando su función proapoptótica y permitiendo la liberación de citocromo-c (Figura 30). Por tanto, Atg5 también es un regulador de la señalización entre autofagia y apoptosis (Yousefi, Perozzo et al. 2006).

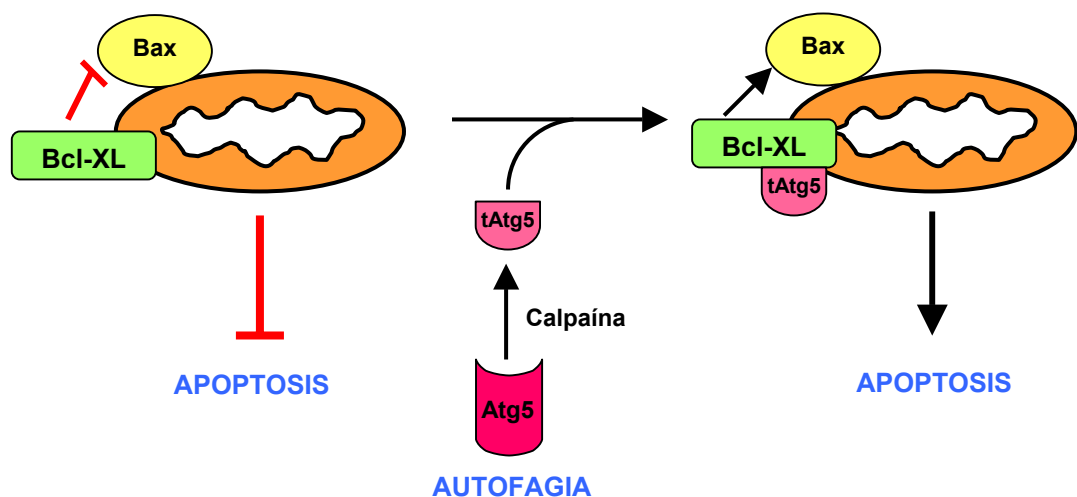


Figura 30. Regulación de apoptosis y autofagia por Atg5. Adaptada de (Luo and Rubinsztein 2007).

2.3. Relación entre apoptosis y autofagia.

Como hemos visto, autofagia y apoptosis están relacionadas molecularmente. En los últimos años se han realizado numerosos estudios en los que se relacionan, de una forma u otra, ambos procesos.

Hace unos años se describió que la inhibición de la autofagia inducida por privación de nutrientes daba lugar a una sensibilización de las células a la muerte celular programada tipo I (apoptosis). En un primer lugar, la autofagia jugaba un papel citoprotector en condiciones de falta de nutrientes. Pero cuando se bloqueaba tanto genética como farmacológicamente la autofagia, las células se morían por apoptosis, dando lugar a un primer apunte sobre la relación entre apoptosis y autofagia (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005). Poco después, el mismo grupo describió que en condiciones de privación de nutrientes, se producía en primer lugar la formación de autofagosomas y la acumulación de vacuolas autofágicas, y posteriormente la muerte celular por apoptosis. Para ello, bloqueaban la fusión del autofagosoma con el lisosoma mediante siRNA de LAMP2, una glicoproteína de membrana que juega un papel en el mantenimiento y adhesión del lisosoma. Se observó una acumulación de vacuolas autofágicas que precedía a la muerte con características de apoptosis. Sin embargo, mientras que la inhibición de las caspasas retardaba la muerte celular sin tener efecto alguno sobre el potencial de membrana mitocondrial, la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica mitocondrial Bcl-2 era capaz de bloquear totalmente la apoptosis, sugiriendo una posible relación entre ambos procesos a nivel de la mitocondria (Gonzalez-Polo, Boya et al. 2005).

Aproximadamente en la misma época se observó que Atg5 mediaba la muerte celular autofágica mediante su interacción con el dominio de muerte de FADD tras el estímulo con IFN- γ en células tumorales de cervix HeLa. En este caso, la inhibición de

las caspasas era capaz de bloquear la muerte celular pero no la formación de vacuolas, lo que sugería que Atg5 podía estar participando tanto en autofagia como en apoptosis (Pyo, Jang et al. 2005). Por otro lado, se ha descrito que el ligando TGF- β es capaz de inducir tanto apoptosis como autofagia en células epiteliales mamarias bovinas, donde la apoptosis se acompaña por un aumento de la intensidad de la autofagia como mecanismo citoprotector en la involución de la glándula mamaria. Además, en células de cáncer de mama humanas MCF7, tras el estímulo con camptotecina, la primera respuesta que se produce es apoptosis (como mecanismo de muerte) y autofagia (como mecanismo de supervivencia), donde la autofagia tiene lugar en las células resistentes a la apoptosis. Así, es difícil establecer el umbral entre autofagia como mecanismo citoprotector (reversible) o como muerte celular programada (irreversible), aunque probablemente dependa del alcance de la degradación de componentes celulares (Motyl, Gajkowska et al. 2006).

A partir de aquí, numerosos estudios relacionan la inhibición de la autofagia con la sensibilización a la muerte celular por apoptosis mediante diversos mecanismos. Por ejemplo, se ha descrito que la inhibición de autofagia mediante siRNA de Atg5 aumenta la capacidad de responder a tamoxifeno a través de la activación de p53, induciendo muerte celular (Amaravadi, Yu et al. 2007); o que la inhibición de la autofagia inducida por irradiación aumenta la citotoxicidad de la radioterapia en células tumorales resistentes a la misma (Apel, Herr et al. 2008); o que la inhibición de la autofagia puede inducir efectos proapoptóticos (en respuesta a Fas y TNF- α) o antiapoptóticos (en respuesta a Menadiona, a vitamina K3, y a radiación ultravioleta) en la misma célula (fibroblastos embrionarios de ratón), dependiendo del estímulo (Wang, Singh et al. 2008).

También puede darse la situación opuesta, donde la inhibición de la apoptosis favorece la autofagia. En este sentido, recientemente se ha publicado que la inhibición

de proteínas proapoptóticas (Bax y Bak) induce una disminución de la señalización de Akt/mTOR y un aumento de proteínas proautofágicas tras la irradiación, sensibilizando a las células tumorales a la terapia (Kim, Mutter et al. 2006). Además, otro grupo ha demostrado que la inhibición de la apoptosis mediante la depleción de Bid es capaz de inducir un aumento en la expresión de Beclina1 y, por tanto, de autofagia en células MCF7 expuestas a camptotecina (Lamparska-Przybysz, Gajkowska et al. 2005).

Por tanto, ya que la autofagia puede bloquear la apoptosis y viceversa, y que ambos procesos pueden inducir muerte, debe haber conexiones por encima de la maquinaria de apoptosis y de autofagia que puedan estar regulando ambos procesos. Por ejemplo, p53 es un potente inductor de apoptosis que puede inducir autofagia a través de DRAM (Crighton, Wilkinson et al. 2006), o Akt/PI3K es un inhibidor de apoptosis que también inhibe la autofagia (Arico, Petiot et al. 2001). No obstante, son necesarios más estudios para entender la relación entre ambos mecanismos.

2.4. TRAIL y autofagia

A pesar de que en los últimos años se han realizado algunos estudios sobre la relación entre el ligando de muerte TRAIL y autofagia, poco se sabe acerca de esta cuestión. En 2004 se publicó el primer estudio que implicaba a TRAIL en la formación de autofagosomas (demostrado por microscopía electrónica) durante el proceso de morfogénesis para la formación del lumen en células epiteliales de mama MCF10A (Mills, Reginato et al. 2004). Un año más tarde, se demostró que TRAIL inducía un nuevo mecanismo de muerte que activaba apoptosis y autofagia a través del dominio de muerte de FADD, y que se inactivaba selectivamente en estadios tempranos del desarrollo del tumor epitelial (Thorburn, Moore et al. 2005). Más adelante se realizó otro estudio utilizando un fragmento de cadena simple de la región variable del

anticuerpo humanizado que reconoce específicamente a TRAIL-R2 (HW1) y que se une a él sin competir con TRAIL, y se observó que tras su unión al receptor era capaz de inducir muerte por autofagia en células tumorales tanto sensibles como resistentes a TRAIL. Además, la autofagia inducida por HW1 a través de TRAIL-R2, inducía el reclutamiento de TRADD y TRAF2, pero no de FADD, Caspasa-8 o RIP1, dando lugar a la activación de JNK. Por tanto, por primera vez se identifica una nueva señalización mediada por el receptor 2 de TRAIL que induce muerte por autofagia, siendo una posible estrategia para eliminar células tumorales, incluso las resistentes a TRAIL, por muerte celular no apoptótica (Park, Lee et al. 2007). Finalmente, en los últimos meses se ha visto que parece haber una relación entre la apoptosis y la autofagia mediadas por TRAIL. De esta forma, defectos en la apoptosis que llevan a la muerte inducida por TRAIL, desvían la señalización hacia una autofagia citoprotectora. Por otro lado, la inhibición de la autofagia mediada por TRAIL inicia una respuesta mitocondrial dependiente de caspasa-8 que da lugar a la muerte por apoptosis (Han, Hou et al. 2008).

Todos estos datos indican que TRAIL es capaz de inducir autofagia y que este mecanismo podría ser estudiado como un mecanismo de resistencia a la muerte inducida por TRAIL.

2.5. Papel fisiológico de la autofagia.

2.5.1. Autofagia como mecanismo de muerte y de supervivencia.

Paradójicamente, la autofagia está implicada tanto en muerte celular como en supervivencia. El papel crítico de la autofagia en el mantenimiento de la viabilidad celular bajo condiciones deficientes en nutrientes externos está bastante bien documentada en levaduras. Así pues, mutantes con defectos en autofagia son viables

bajo condiciones de crecimiento normales, mientras que los no mutantes mueren rápidamente tras la privación de nutrientes (Tsukada and Ohsumi 1993; Ohsumi 2001; Levine and Klionsky 2004). Del mismo modo, cuando células de mamífero están en condiciones de falta de nutrientes (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005), oxígeno (Degenhardt, Mathew et al. 2006) o factores de crecimiento (Lum, Bauer et al. 2005), la autofagia actúa como un proceso de supervivencia. Además, embriones deficientes en Beclina1 muestran una disminución en la autofagia y un aumento en la muerte celular, sugiriendo que la autofagia es un mecanismo citoprotector también *in vivo* (Yue, Jin et al. 2003). El mecanismo por el cual la autofagia promueve supervivencia no está limitado a su papel en el mantenimiento de la homeostasis celular durante la privación de nutrientes (Ravikumar, Berger et al. 2006), sino que también está implicada en la eliminación de organelas dañadas. Por ejemplo, la eliminación de patógenos y agregados de proteínas podría promover supervivencia durante enfermedades infecciosas y procesos neurodegenerativos (Kirkegaard, Taylor et al. 2004; Liang, Feng et al. 2006).

Sin embargo, la autofagia también está implicada en procesos de muerte celular programada, llamada muerte celular autofágica, que se basa en estudios morfológicos que detectan vacuolas autofágicas en células en proceso de muerte (Kroemer, El-Deiry et al. 2005). Aunque se debate si la autofagia contribuye directamente a la muerte celular o es un mecanismo fallido de preservar la viabilidad celular. La mayoría de los estudios que apoyan que la autofagia es un proceso de ejecución celular, se han realizado mediante criterios morfológicos y utilizando un inhibidor de la PI3K clase-I (3-Metiladenina) que bloquea la formación de los autofagosomas, para inhibir la muerte celular (Seglen and Gordon 1982; Blommaert, Krause et al. 1997). La 3-Metiladenina es un inhibidor que se utiliza en concentraciones milimolares y podría bloquear otras quinasas y, por tanto, influir en el

proceso de supervivencia celular. Otros estudios que apuntan más directamente a la participación de la autofagia en muerte celular, se han realizado utilizando siRNAs de proteínas Atg, detectando una disminución en la muerte o un incremento en la supervivencia. Así pues, la autofagia puede contribuir a la muerte celular en modelos experimentales a pesar de que no hay evidencias *in vivo* de que la depleción de genes requeridos para la autofagia disminuya la muerte celular durante el desarrollo en células de mamífero. En este sentido, células madre embrionarias de ratones deficientes en beclina1 no muestran diferencias en respuesta a la muerte celular inducida por privación de nutrientes o radiación ultravioleta (Yue, Jin et al. 2003). A pesar de que la autofagia inducida por falta de nutrientes se inhibe en estas células, el análisis mediante microscopía electrónica muestra que se forman autofagosomas. Estos datos sugieren que la maquinaria de autofagia es flexible y que otras proteínas pueden compensar la pérdida de Beclina1, lo que explicaría la falta de efecto en la viabilidad celular *in vivo*.

Lo que determina si el resultado de la inducción de autofagia es supervivencia o muerte aún no se sabe, pero no parece depender exclusivamente del tipo celular ni del estímulo. Se podría especular que fuera el nivel de autofagia lo que condicione el resultado. Así, una inducción masiva de autofagia daría lugar a la destrucción de la célula por, literalmente, “comerse a sí misma”, finalizando con la muerte. Otra posibilidad podría ser una diferencia en los mecanismos de señalización que están por encima de la maquinaria de autofagia. Por ejemplo, se sabe que en fibroblastos de ratón hay una degradación selectiva de catalasas tras la inducción de muerte celular autofágica por el inhibidor de caspasas (z-VAD-fmk) pero no tras la autofagia inducida por privación de nutrientes. La eliminación específica de estas catalasas permite la acumulación de especies reactivas de oxígeno, la oxidación de lípidos de membrana, la pérdida de integridad de membrana y la muerte celular (Yu, Wan et al. 2006).

2.5.2. Autofagia en la supresión y progresión de tumores.

En ratones heterocigotos para Beclina1 hay más frecuencia de aparición de tumores, lo que sugiere que Beclina1 es una proteína supresora de tumores (Yue, Jin et al. 2003). Por otro lado, la autofagia es un proceso degradativo de la célula que facilita la supervivencia, lo que lleva a pensar que pueda ser un mecanismo que promueva la formación de tumores. A partir de estos dos resultados aparentemente contradictorios, se ha sugerido que la autofagia funciona tanto en la supresión de tumores como en facilitar su progresión.

La función supresora de tumores de la autofagia se lleva a cabo de diferentes formas. En primer lugar, la muerte celular autofágica puede eliminar células tumorales durante el proceso de desarrollo de un tumor. Así, numerosos agentes antitumorales como tamoxifeno, radiación y compuestos de arsénico, inducen muerte celular autofágica en células de cáncer (Bursch, Ellinger et al. 1996; Paglin, Hollister et al. 2001; Kanzawa, Kondo et al. 2003; Paglin, Lee et al. 2005). En segundo lugar, la autofagia puede disminuir la tasa de mutación eliminando organelas dañadas, como la mitocondria, que puede generar radicales libres y dar lugar a una mayor inestabilidad genómica (Degenhardt, Mathew et al. 2006). Se podría pensar que la inestabilidad genómica y el aumento de las mutaciones resultan de la acumulación de especies reactivas de oxígeno debido a defectos en el sistema de control de organelas en células deficientes en autofagia. En tercer lugar, la autofagia disminuye la proliferación celular en células tumorales de mama MCF7 que sobreexpresan Beclina1, que crecen más despacio que las células parenterales (Liang, Jackson et al. 1999), y en ratones heterocigotos en Beclina1, que tienen mayor número de células proliferando en los ductos mamarios comparados con ratones silvestres (Qu, Yu et al. 2003; Marx 2006).

Por otro lado, la autofagia puede promover tumorigénesis permitiendo que las células tumorales que se encuentran en un tumor en crecimiento, sobrevivan incluso

en ausencia de nutrientes. Esto se ve favorecido por la importancia de la autofagia en la protección de células tumorales frente el estrés nutricional inducido por falta de factores de crecimiento o de nutrientes *in vitro* (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005; Lum, Bauer et al. 2005). Recientemente se ha visto *in vivo* que la autofagia también se produce en regiones insuficientemente vascularizadas de tumores es estadios tempranos y que, cuando se reestablece el suministro de sangre, disminuyen los niveles de autofagia (Degenhardt, Mathew et al. 2006). Esto sugiere que la autofagia puede fomentar el desarrollo de tumores. Además, la inducción de autofagia en pacientes de cáncer puede aumentar la quimioresistencia, como se demuestra en estudios con líneas celulares donde la autofagia inducida por rapamicina protege frente a la apoptosis (Ravikumar, Berger et al. 2006).

La inducción de autofagia puede ser específica de tumores o dependiente del estadio del desarrollo del tumor. Así, estudios en cáncer de próstata inducido por carcinógenos en ratas muestran que la capacidad de autofagia primero aumenta durante las fases de premalignidad y posteriormente disminuye durante la fase de adenoma y carcinoma pancreático (Rez, Toth et al. 1999; Toth, Nagy et al. 2002). Recientemente se ha utilizado un modelo *in vivo* que demuestra que la autofagia tiene un papel dual en el desarrollo de tumores, ya que el estrés metabólico induce muerte celular apoptótica mientras que cuando ésta se bloquea (como es frecuente en los tumores), la autofagia permite la supervivencia (Degenhardt, Mathew et al. 2006). Así, si se previene la autofagia, se produciría una inducción masiva de muerte celular por necrosis. Sin embargo, una pequeña población de células sobreviven, incluso en ausencia de autofagia, lo que aumenta en la progresión de tumores, probablemente debido a la creación de microambientes que favorecen la oncogénesis (Degenhardt, Mathew et al. 2006).

Muchos de los genes supresores de tumores (p53, PTEN, DAPK) y algunos oncogenes inductores de tumores (Bcl-2, PI3K clase-I, mTOR y Akt), estimulan o inhiben autofagia, respectivamente (Gozuacik and Kimchi 2004), además de su función como reguladores de tumores. Esto aporta evidencias en la disminución de la capacidad de inducir autofagia al menos en estadios tardíos del desarrollo del tumor. De acuerdo con esto, la autofagia está disminuida tras el desarrollo de un cáncer de hígado inducido por carcinógenos en ratas (Schwarze and Seglen 1985; Kisen, Tessitore et al. 1993). Además, Beclina1, DRAM y UVRAG constituyen un nuevo grupo de genes supresores de tumores con la única función conocida de regular autofagia (Figura 31) (Liang, Jackson et al. 1999; Qu, Yu et al. 2003; Yue, Jin et al. 2003; Crighton, Wilkinson et al. 2006; Liang, Feng et al. 2006).

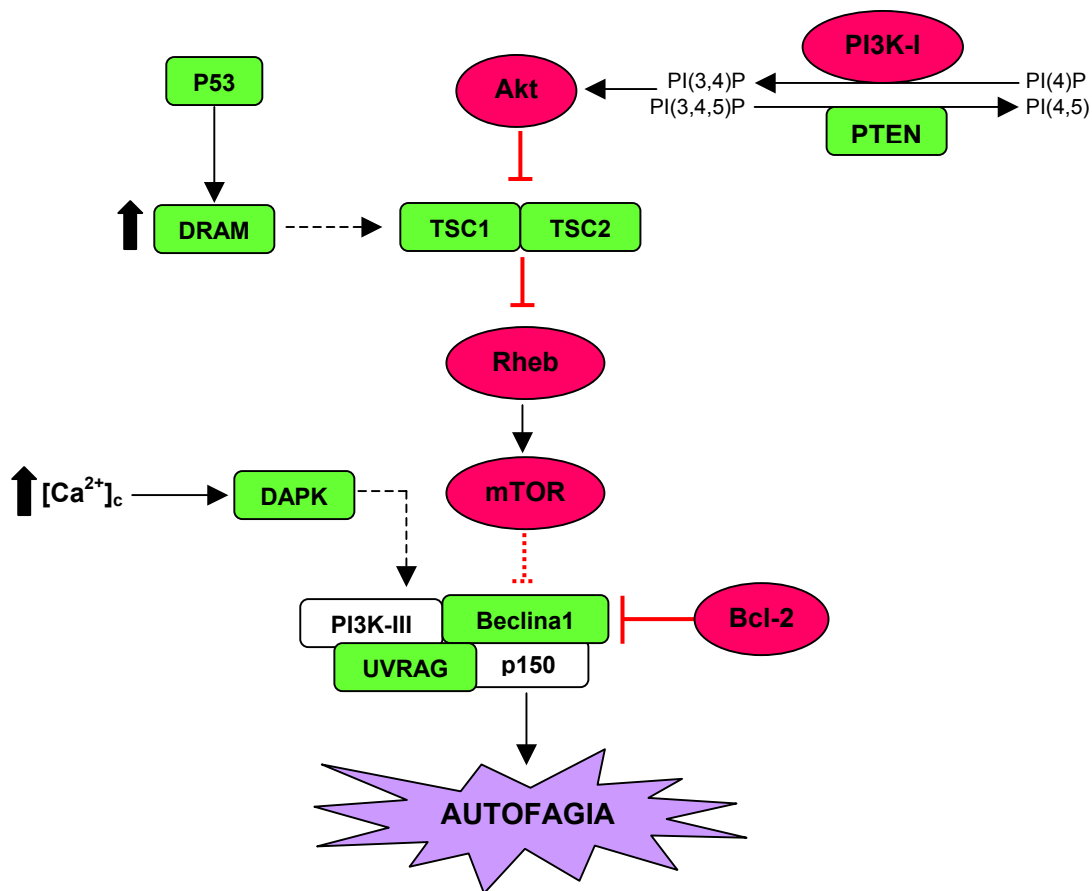


Figura 31. Numerosos genes que inducen cáncer también regulan autofagia. Los genes supresores de tumores (verde) inducen autofagia. Por el contrario, los protooncogenes (rosa) inhiben autofagia. La función reguladora de tumores de TSC1/TSC2 y Rheb está bastante documentada, sin embargo, no se ha demostrado que estas proteínas regulen directamente autofagia en células de mamífero (líneas punteadas)

3. ONCOGENICIDAD

2.6. Introducción

La transformación de células normales en células tumorales implica cambios en la expresión de algunos genes. Hace años se describió que un oncogén es insuficiente para transformar una célula normal en tumoral (Land, Parada et al. 1983; Raley 1983), siendo necesaria la cooperación entre dos mutaciones oncogénicas. Sin embargo, años más tarde se ha visto que la alteración de la expresión de algunos genes es suficiente para inducir malignidad (McMurray, Sampson et al. 2008). Además, en muchos casos, la normalización en la expresión de alguno de estos genes es suficiente para disminuir el crecimiento tumoral. La Teoría de la Cooperación de genes se basa en la unión de fuerzas para promover formación de tumores. Por ejemplo, la cooperación entre Ras y p53 da lugar a la activación de genes que inducen tumorogénesis, aunque por separado, también pueden contribuir al cáncer pero de forma más limitada (Figura 32).

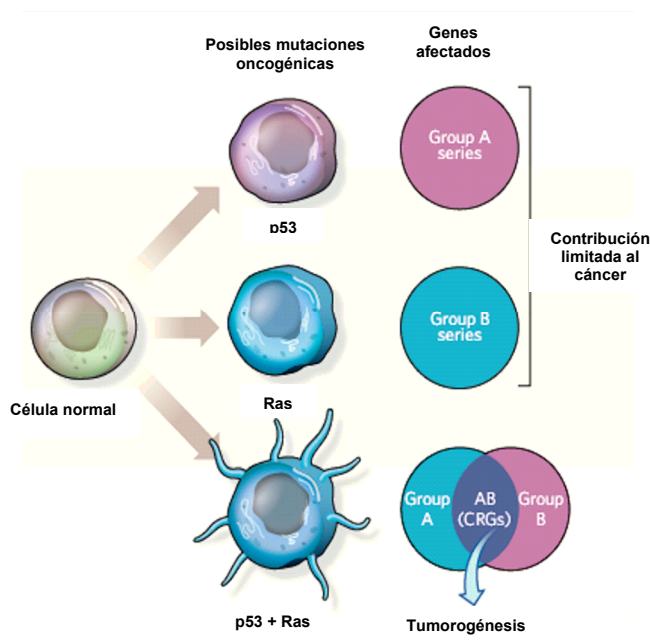


Figura 32. Cooperación de genes. Las mutaciones oncogénicas en el factor de transcripción p53 y la proteína GTPasa Ras tienen algunos efectos en la promoción del cáncer individualmente. Pero cooperan para transformar las células normales en tumorales. La mutación de p53 afecta a la expresión de un grupo de genes (A), mientras que la mutación de Ras modifica la expresión de otro grupo de genes (B). Cuando ambos están mutados en la misma célula, regulan sinérgicamente una serie de genes, conocidos como genes de respuesta a la cooperación (CRGs), que son mediadores cruciales en la formación de tumores. Adaptada de (Luo and Elledge 2008)

Una cuestión principal en la formación de tumores es determinar los genes que contribuyen a este proceso. Los oncogenes Ras y Src, por ejemplo, están sobreexpresados en un alto porcentaje en tumores de páncreas (90%), colon (50%) y pulmón (30%), en el caso de Ras, y en menor medida en el caso de Src. Otro oncogén que se encuentra alterado en el 20% de carcinomas de mama es ErbB2.

Por otro lado, hay que decir que, como se ha comentado anteriormente, la expresión de oncogenes tiende, por un lado, a bloquear mecanismos de señalización que llevan a supervivencia de la célula tumoral (autofagia), que impedirían la generación de mutaciones y de inestabilidad genómica y la consiguiente progresión del tumor. Además, la expresión de oncogenes pueden inhibir mecanismos de muerte (apoptosis).

2.7. El oncogén Src

Se descubrió en 1979 por Bishop y Varmus, que observaron en células de pollo un gen estructuralmente similar al gen del virus del sarcoma de Rous, v-Src, y lo denominaron c-Src (Bishop, Baker et al. 1978; Oppermann, Levinson et al. 1979). Src fue el primer oncogén que se descubrió capaz de inducir la transformación de células normales en tumorales (Wang and Goldberg 1976). El oncogén Src es una familia de proto-oncogenes tirosin quinasa que posee un importante papel en el desarrollo embrionario y el crecimiento celular. La proteína codificada por el gen es una proteína tirosin quinasa citoplásmica formada por tres dominios: un dominio SH3 en el extremo amino- terminal, un dominio SH2 central y un dominio tirosin quinasa en el extremo carboxi- terminal. Los dominios SH2 y SH3 cooperan en la inhibición del dominio tirosin quinasa, regulando la función de Src (Varmus, Hirai et al. 1989). Además, c-Src tiene una importante función en invasividad y metástasis (Alper and Bowden 2005). Se sabe que hay una relación entre los niveles de c-Src y el desarrollo de tumores. En

este sentido, la expresión y la actividad de Src están aumentados en líneas celulares de melanoma y en tumores *in vivo*. Así, Src puede activar STAT3, STAT5 y otras dianas en células de melanoma, donde Src y STAT3 se expresan en sus formas activas, aunque los niveles de expresión son variables (Homsí, Cubitt et al. 2007).

Estudios recientes han mostrado que Src regula la adhesión celular, la invasividad y la motilidad en células tumorales. Además, la actividad y expresión de Src están aumentadas en líneas de melanoma y en tumores *in vivo* (Homsí, Cubitt et al. 2007).

2.8. El oncogén Ras

Este oncogén se asoció al cáncer entre 1980-1990 (Chang, Furth et al. 1982; Der, Krontiris et al. 1982; Sefton, Trowbridge et al. 1982; Shimizu, Goldfarb et al. 1983; Barbacid 1987). Originariamente se identificó como un oncogén del virus de sarcoma en ratones. Ras es una proteína de unión a GTP asociada a membrana, que regula proliferación y supervivencia en respuesta a estímulos extracelulares como EGFR o TCR. Cuando Ras se une a GTP, se activa y estimula numerosas dianas por interacciones directas. Además, Ras tiene actividad GTPasa, de forma que puede ser activada por proteínas que activan GTPasas (GAPs). La activación de Ras está mediada por efectores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), que catalizan el paso de Ras-GDP a Ras-GTP. Esta unión a GTP induce la activación de Ras, mediada por un cambio conformacional (Vetter and Wittinghofer 2001). El estado de activación de Ras se limita por la actividad GTPasa intrínseca de la proteína.

Los genes Ras codificados por el virus del sarcoma de rata, v-H-ras y v-K-ras se encuentran entre los primeros oncogenes reconocidos (Harvey 1964). Estos genes virales son formas mutantes de protooncogenes celulares. Las mutaciones más

comunes son las que hacen que la GTPasa sea insensible a la acción de GAPs y así Ras se mantenga unido a GTP, es decir, activo.

El genoma humano codifica tres genes de Ras que dan lugar a cuatro productos génicos: N-Ras, H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B. A pesar de que el 90% de cánceres de páncreas tienen mutado K-Ras, sólo el 10% de tumores de vejiga contienen mutaciones de Ras, y son en el gen H-Ras.

Ras media mecanismos efectores de señalización que incluyen: la cascada Raf-MEK-ERK, la vía PI3K/Akt-mTOR y la ruta Ral-GTPasa (Figura 33).

1) La vía de señalización Ras-Raf-MAPK regula diversos procesos fisiológicos, transmitiendo señales de receptores de membrana a distintas dianas intracelulares (nucleares y citoplásmicas), coordinando así gran variedad de respuestas de la célula. La función de esta familia de quinasas implica el desarrollo de orgánulos, la regulación del ciclo celular, proliferación y diferenciación celular, supervivencia, apoptosis, etc. La sobreexpresión o activación de los componentes de esta ruta es un indicador común en enfermedades proliferativas como el cáncer, y contribuye a la iniciación, proliferación y metástasis del tumor (Leicht, Balan et al. 2007). Tras la activación de Ras, éste se une a la serina treonina quinasa Raf y la activa. Raf fosforila y activa a MAPKs, que a su vez fosforilan y activan a ERK1 y ERK2. Las quinasas ERK activadas se traslocan al núcleo, donde pueden fosforilar y activar diversas dianas (Mor and Philips 2006). Además de estos mecanismos, Ras activa rutas de señalización independientes de Raf que también contribuyen a la transformación celular iniciada por la activación de Ras (Shields, Pruitt et al. 2000).

2) Por otro lado, PI3K es un mediador importante de la función de Ras, siendo un efector en la transformación por Ras en algunos tipos celulares. PI3K cataliza la formación de fosfoinosítoles, que activan a la proteína quinasa B (PKB)/Akt (Downward 1998).

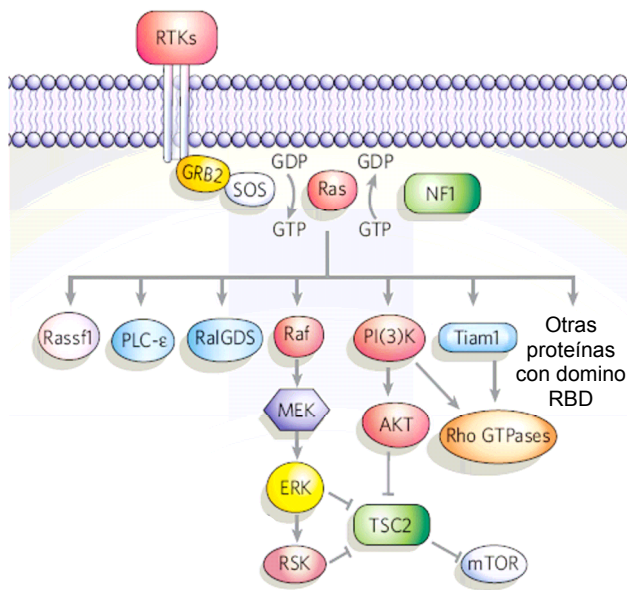


Figura 33. Señalización de Ras. El receptor tirosin quinasa (RTK) activa a Ras a través de la proteína adaptadora GRB2 y de factores de intercambio de nucleótidos (GEFs) como SOS, que inducen la unión de Ras a GTP, activándolo. Ras vuelve a su estado inactivo, Ras-GDP, a través de la proteína tipo GAP, Neurofibromina1 (NF1). Todos los efectores conocidos de Ras contienen un dominio de unión a Ras (RBD), que interacciona directamente con el oncogén. Una vez que Ras se activa, puede activar a numerosas proteínas, siendo las más importantes Raf-MEK-ERK, PI3K-Akt-mTOR y RalGDS. PLC: Fosfolipasa-C; RSK: Proteína ribosomal S6K. Adaptada de (Shaw and Cantley 2006).

3) El tercer mecanismo efector de Ras es Ral. La actividad de Ral contribuye a la transformación oncogénica de fibroblastos de ratón NIH3T3 (Urano, Emkey et al. 1996) y de fibroblastos humanos, astrocitos y células epiteliales (Hamad, Elconin et al. 2002).

Por tanto, la importancia de los efectores de Ras en la inducción de transformación tumoral puede variar según los tipos celulares. Las frecuentes mutaciones de Raf en cánceres, sugieren que esta vía de señalización es clave en la oncogénesis (Davies, Bignell et al. 2002). No obstante, falta por esclarecer por qué distintos tipos celulares utilizan diversos mecanismos efectores de Ras para llevar a cabo la transformación.

Por otro lado, se ha visto que existe una relación entre Ras y autofagia y apoptosis. Por ejemplo, se ha descrito que Ras inhibe la degradación de proteínas de vida media larga, indicando una disminución de la autofagia funcional, mediada por privación de nutrientes, de forma dependiente de la ruta PI3K/Akt en células NIH3T3 (Furuta, Hidaka et al. 2004). Además, tras el estímulo con Oridonina, un diterpenoide que se utiliza en el tratamiento de leucemia, se induce apoptosis y se inhibe autofagia.

Sin embargo, el cotratamiento con inhibidores de Ras, pero no de Raf ni ERK, favorece la autofagia en células de carcinoma epidermoide A431 (Li, Cui et al. 2007). En células de carcinoma de cervix HeLa, este mismo compuesto, Oridonina, induce autofagia, cuyos niveles aumentan al inhibir Ras. Pero la autofagia se inhibe cuando se bloquea la señalización de p38 o de JNK, indicando que mientras que Ras inhibe la autofagia, p38 y JNK la activan (Cui, Tashiro et al. 2007). En relación a ERK, se ha visto recientemente que es capaz de controlar autofagia induciendo la acumulación de autolisosomas defectivos (Corcelle, Nebout et al. 2006) y que media la señalización hacia supervivencia e inhibe apoptosis mediante la inhibición del gen supresor de tumores Tuberina, que a su vez, inhibe mTOR (Freilinger, Rosner et al. 2008). Por otro lado, AMPK activa la tuberina mediante la fosforilación en los residuos Ser1345 y Thr1227, induciendo apoptosis (Inoki, Zhu et al. 2003).

Todos estos datos sugieren que la transformación oncogénica puede estar jugando un papel en la regulación de la apoptosis y la autofagia en células tumorales, aunque el mecanismo molecular de esta regulación está por determinar.

IV. OBJETIVOS

La autofagia es un mecanismo celular conservado evolutivamente en el que las células secuestran el contenido citoplasmático en vesículas de doble membrana, que será degradado por los lisosomas, tras su fusión con éstos, para así obtener precursores para la síntesis de proteínas y producir nutrientes para mantener la homeostasis celular. Numerosos estímulos pueden inducir autofagia (falta de nutrientes o estímulos que inducen estrés), y contribuir a la supervivencia celular: No obstante, en determinadas condiciones estos estímulos pueden acabar induciendo muerte celular.

Se había descrito que TRAIL inducía autofagia durante el proceso de morfogénesis en células epiteliales de mama MCF10A (Mills, Reginato et al. 2004). Con estos antecedentes, quisimos saber los mecanismos por los que TRAIL señalizaba hacia autofagia en células epiteliales de mama, así como su implicación en autofagia en células tumorales o transformadas de mama. Así pues, los objetivos de este trabajo fueron:

1. Estudiar el mecanismo por el cual TRAIL induce autofagia en células epiteliales normales de mama MCF10A.
 - 1.1. Implicación de proteínas de autofagia Beclina1 y Atg7.
 - 1.2. Papel de AMPK y mTOR en la autofagia inducida por TRAIL.
 - 1.3. Requerimientos del DISC de TRAIL para la autofagia.

2. Estudiar la regulación de la autofagia en células tumorales de mama MCF7 o células MCF10A transformadas con los oncogenes Ras o Src. Caracterizar las diferencias entre células normales y transformadas en su respuesta autofágica a TRAIL

3. Analizar la posible relación entre la apoptosis y la autofagia inducidas por TRAIL en células tumorales y normales de mama.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. CULTIVOS CELULARES

1.1.1. MCF10A.

Las células MCF10A son células epiteliales derivadas de tejido mamario humano normal (Pauley, Soule et al. 1993). Las células MCF10A-EcoR expresan un receptor ecotrópico (EcoR) y fueron suministradas por la Dra. Joan Brugge y el Dr. David Lynch (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) (Debnath, Muthuswamy et al. 2003). Se cultivaron en medio DMEM F12 (1:1) suplementado con 5 % de suero de caballo inactivado (HS), 10 µg/ml de insulina, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF), 100 ng/ml de toxina colérica, 500 ng/ml de hidrocortisona y antibióticos. Las células MCF10A-GFP-LC3, MCF10A-Ras, MCF10A-Src y MCF10A-Ras-Mutantes se crearon mediante infecciones retrovirales como se especifica en el apartado 2.13.1.

1.1.2. MCF7.

La línea celular tumoral MCF7, derivada de una efusión pleural de adenocarcinoma mamario humano (Soule, Vazquez et al. 1973), se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina y antibióticos. Las células MCF7-GFP-LC3 fueron creadas en el laboratorio de la Dra. Marja Jäättelä (Institute of Cancer Biology, Copenhagen, Dinamarca) por transfección transitoria y selección con antibiótico.

1.1.3. RPE1.

La línea celular humana de epitelio pigmentado de retina humana hTERT-RPE1, que expresa establemente la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT) (Shakib and Zinn 1973), fue cedida amablemente por la Dra. Rosa M^a Ríos (CABIMER, Sevilla, España) y se cultivó en medio DMEM F12 suplementado con 10 %

de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina y antibióticos. Las células RPE1-GFP-LC3 se crearon mediante transfección como se especifica en el apartado 2.11.2.

1.1.4. MEFs.

Los fibroblastos epiteliales de ratón (MEFs) inmortalizados de ratones “knock-in” que expresan un mutante inactivo de TAK1 al haber perdido el dominio de unión para ATP, así como los MEFs silvestres, fueron suministrados por el Dr. S. Akira (Osaka University, Osaka, Japón) (Sato, Sanjo et al. 2006) y cultivados en DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 0’1 mM (1X) de aminoácidos no esenciales y antibióticos.

1.1.5. HEK293.

Las células HEK (Human Embryonic Kidney) 293, son una línea primaria de células embrionarias de riñón humano, transformadas con ADN de adenovirus humano tipo 5 (AD5) (Graham, Smiley et al. 1977). Las células Phoenix Eco (ΦNX Eco) son derivadas de las 293 y expresan el antígeno T de SV40 (SV40 large T antigen) (DuBridge, Tang et al. 1987). Son empaquetadoras de retrovirus ecotrópicos, y fueron cedidas por Christian Holmberg (Universidad de Copenhague, Copenhague, Dinamarca) y cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 0’1 mM (1X) de aminoácidos no esenciales y antibióticos.

Todas las células fueron mantenidas en un incubador humidificado a 37°C, 5 % de CO₂ y 95 % de aire.

1.2. REACTIVOS

1.2.1. Medios de Cultivo.

Los medios RPMI 1640, DMEM, DMEM F12 (1:1) y el medio de privación de aminoácidos HBSS, así como el EGF, la Hidrocortisona, la Insulina, la Toxina Colérica,

los Aminoácidos no esenciales, el Suero Bovino Fetal (FBS), la L-glutamina y los antibióticos (Penicilina/Streptomycin) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El Suero de Caballo (HS) se obtuvo de Gibco (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA).

1.2.1. Ligandos de muerte.

El TRAIL recombinante con cola de histidinas así como el TRAIL biotinilado recombinante (TRAIL-bio) fueron producidos en nuestro laboratorio como se describió previamente (Harper, Farrow et al. 2001; MacFarlane, Harper et al. 2002). El TNF α humano fue suministrado por Anthony Cerami (Kenneth Warren Laboratories, Tarrytown, NY, USA). El TGF β se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

1.2.2. Drogas e Inhibidores.

La Rapamicina, la 3-Metiladenina (3-MA), el AICAR, la Ionomicina, la Cicloheximida (CHX), los inhibidores de proteasas: Pepstatina-A y E64d, el inhibidor de TGF β : SB431542 y los inhibidores de PI3K: Wortmanina y LY294002 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El inhibidor general de caspasas benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp-(OMe) fluoromethyl ketone (z-VAD-fmk) fue proporcionado por Bachem, AG (Bachem, Bubendorf, Suiza). El inhibidor de la JNK: SP600125 y el inhibidor de MEK: PD98059 se obtuvieron de Calbiochem Novabiochem GmbH (Band Soden, Alemania). El inhibidor de MEK: U0126 fue proporcionado por Promega (Madison, WI, USA). El inhibidor de RabGGT: BMS1 fue proporcionado amablemente por Bristol Myers y no es comercial.

1.3. ANTICUERPOS

1.3.1. Los anticuerpos primarios utilizados para el análisis de proteínas incluyen:

1.3.1.1. Anticuerpos monoclonales de ratón:

Beclina-1 (clon 20), Ras, FADD, XIAP y RIP1 (BD Transduction Laboratories; New Jersey, USA), GAPDH (Biogenesis; Poole, UK), P-p70^{S6K} (Cell Signaling Technology; Inc, Danvers, MA, USA), Tubulina (Sigma-Aldrich; St. Louise, MO, USA), FLIP NF6 (Alexis; San Diego, CA, USA), PARP (Pharmingen; San Diego, CA, USA), LC3 (NanoTools, Teningen, Alemania), LKB1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) y Bcl-2 (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

1.3.1.2. Anticuerpos policlonales de conejo:

p70^{S6K} (# 9202), AMPK (#2603), p-AMPK (#2535), p-ACC (#3661), p-TAK1 (#4508), TAK-1 (#4505), p-JNK (#9251), Caspasa-3 (#9661) y Caspasa-9 (#9501) (Cell Signaling Technology; Inc, Danvers, MA, USA), c-Src (ab7950) (Abcam; UK), Bid (regalo del Dr. Wang), Atg7 (ProSci Incorporated, Poway, CA, USA) y Caspasa-8 (cedido por el Dr. Gerald Cohen, Universidad de Leicester, UK).

1.3.1.3. Anticuerpos de cabra:

TRAIL-R2 (Alexis Corp., San Diego, CA, USA).

1.3.2. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa HRP eran de DAKO (Glostrup, Dinamarca).

1.3.3. El reactivo quimioluminiscente ECL era de Millipore (Billerica, MA, USA).

1.3.4. Los anticuerpos frente a los receptores de TRAIL utilizados para citometría de flujo (TRAIL-R1 (HS101), TRAIL-R2 (HS201), TRAIL-R3 (HS301), TRAIL-R4 (HS401)) y el anticuerpo antagonista de TRAIL-R2 utilizado para bloquear el

efecto mediado por dicho receptor (TRAIL-R2 (HS201 Preservative free)) se obtuvieron de Alexis Corp. (San Diego, CA, USA).

1.4. RNAs DE INTERFERENCIA

Los RNAs de interferencia utilizados corresponden a las secuencias de cDNA humano para las siguientes proteínas:

Beclina-1 (5'-CAGTTTGGCACAATCAATAAtt-3'), LKB1 (5'-CUGGUGGAUGUGUUUAUACAAtt-3'), RIP1 (5'-CCACUAGUCUGACGGAUAAAtt-3') y un control siRNA (5'-CGACCGAGACAAGCGCAAGtt-3') se obtuvieron de Dharmacon Research (Colorado, USA); CaMKK β (5'-GGAUCUGAUCAAAGGCAUCtt-3') y TAK-1#1 (5'-GGAGAUCGAGGUGGAAGAGtt-3') se obtuvieron de Ambion (California, USA); AMPK α #1 (5'-UGCCUACCAUCUCAUAAUAtt-3'), AMPK α #2 (5'-CCUCAAGCUUUUCAGGCAUtt-3'), TAK-1#2 (5'- UGGCUUAUCUUACACUGGAtt-3'), Caspasa-8 (5'-GGAGCUGCUCUCCGAAUUt-3'), FLIP (reconoce a las dos isoformas, FLIP_L y FLIP_S) (5'-GGGACCUUCUGGAUUAUUUt-3'), FADD (5'-GAAGACCUGUGUGCAGCAUtt-3') y un control siRNA (5'-CUUUGGGUGAUCUACGUUAtt-3') se obtuvieron de Sigma-Proligo (Woodlands, TX, USA). Atg7#1 (5'-CAGUGGAUCUAAAUCUCAAACUGAUtt-3') y Atg7#2 (5'-AAGGAGUCACAGCUCUCCUUt-3') se obtuvieron de Invitrogen.

1.5. CEBADORES PARA RT-PCR

Los cebadores utilizados para la amplificación de mRNAs por RT-PCR fueron:

CaMKK β : 5'-AGACCAGGCCCGTTTCTACT-3' (sentido) y 5'-GAAGATCTTGCGGGTCTCAG-3' (antisentido) y Actina: 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3' (sentido) Y 5'-CATGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3' (antisentido).

1.6. SOLUCIONES COMUNES

PBS 5X (pH 7'8)

| | |
|--------|--|
| 170 mM | NaCl (Sigma) |
| 3 mM | KCl (Merk) |
| 10 mM | Na ₂ HPO ₄ (Sigma) |
| 1 mM | KH ₂ PO ₄ (Sigma) |

TBS 10X (pH 7'6)

| | |
|-----------------------|-------------------|
| 24'2 gr | Tris Base (Roche) |
| 80 gr | NaCl (Sigma) |
| Hasta 1 litro de agua | |

2. METODOLOGÍA

2.1. CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR (SYTOX)

La viabilidad celular se determinó por el método de SYTOX Green (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), mediante el cual se tiñen los ácidos nucleicos cuando las células están permeabilizadas. Se recogieron las células con tripsina y se incubaron con 500 µl de una solución de SYTOX 1:10.000 en PBS durante 10 minutos. Tras lavar las células, se resuspendieron en PBS y se midieron en el citómetro en FL1. La citometría fue realizada en un citómetro FACScan, utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) para analizar los datos.

2.2. CUANTIFICACIÓN DE APOPTOSIS

La apoptosis se cuantificó por citometría de flujo mediante la detección de células hipodiploides. Para ello, se sembraron 3×10^5 células por pocillo y, tras el tratamiento correspondiente, se recogieron con Tripsina. Se fijaron y permeabilizaron con 900 µl de una solución de etanol frío al 70%, agitando en el vórtex y dejándolas 5 minutos en hielo. Después de lavar, se añadieron 250 µl de PBS y 250 µl de Solución de Extracción de ADN (0'2 M Na_2HPO_4 , 0'1 M Ácido Cítrico en PBS; pH 7'8) y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. A continuación, y tras lavarlas, las células se resuspendieron en 250 µl de Solución PI/RNasa (100 µg/ml RNasa, 40 µg/ml Yoduro de Propidio en PBS) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Las células apoptóticas se detectaron y cuantificaron en la población del ciclo celular con menor contenido en ADN que las células del pico de G1. La citometría de flujo fue realizada en un citómetro FACScan, utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) para el análisis de los datos.

2.3. LIBERACIÓN DE LDH

El ensayo de liberación de Lactato Deshidrogenasa se llevó a cabo como se describió anteriormente (Foghsgaard, Wissing et al. 2001). Esencialmente, los ensayos se realizaron en medio completo RPMI. La citotoxicidad se muestra como porcentaje entre la LDH liberada al sobrenadante y la LDH total. La densidad óptica se midió en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices Ltd., Wokingham, United Kingdom).

2.4. ANÁLISIS DE RECEPTORES DE TRAIL EN LA SUPERFICIE CELULAR

Para detectar la expresión de receptores de TRAIL en la superficie de las células MCF10A y MCF10A-Ras no tratadas (2×10^6 células de cada tipo), se despegaron las células con un raspador en PBS. Una vez lavadas con PBS, se resuspendieron en 100 μ l de PBS. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (5 μ g/ml) a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con isotiocinato de fluoresceína (DAKO, Dinamarca) en una dilución 1:20 durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se volvieron a lavar con PBS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS. La detección de los receptores de muerte se realizó con un citómetro de flujo analizando la población positiva para FL1, que es la longitud de onda a la que emite la fluoresceína.

2.5. AISLAMIENTO DEL DISC DE TRAIL

La precipitación del DISC fue realizada utilizando TRAIL biotinilado recombinante (TRAIL-bio), creado en nuestro laboratorio. Las células (20×10^6

células/tratamiento) fueron incubadas con o sin 3-MA durante 6 horas. Tras esta incubación, las células fueron tratadas con 1 µg/ml de TRAIL-bio durante 15 o 30 minutos. La formación del DISC se obtuvo eliminando el TRAIL-bio no pegado a las células mediante 3 lavados con PBS frío. Posteriormente, las células se lisaron en 3 ml de Tampón de Lisis del DISC (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0.1% Deoxicolato con Complete protease inhibitors (Roche)) durante 30 minutos en hielo, seguido de una centrifugación de 30 minutos a 13.000g a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes, guardando una alícuota de 50 µl como control interno (INPUT). Se midió la concentración de proteína y se añadió TRAIL-bio a los lisados controles. El DISC de TRAIL fue entonces precipitado con 30 µl de bolitas de agarosa-streptavidina (Sigma, St.Louise, MO, USA), incubando toda la noche a 4°C en un rotor circular. Los precipitados se lavaron 6 veces con 500 µl de tampón de lisis, y el DISC fue eluido con 30 µl de Sample Buffer 1X. Las muestras fueron hervidas 5 minutos a 95°C, se centrifugaron y se recogió el sobrenadante. El análisis proteico del DISC se realizó mediante Western Blot.

2.6. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR Western BLOT

Para detectar niveles de expresión de proteínas, tras tratar a las células se despegaron con tripsina y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga Sample Buffer 1X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 6M Urea, 6% 2-Mercaptoetanol, 3% SDS, 0.003% Azul de bromofenol). Posteriormente se sonicaron las muestras. Para detectar proteínas fosforiladas, se aspiró el medio de la placa, se lavaron las células con 1 ml de PBS frío y a las células de la placa se le añadieron 30 µl de Buffer de Lisis (250 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5% Tritón X-100, 50 mM Na-β-glicerofosfato, 250 mM NaF, 5 mM Ortovanadato sódico, 25 mM NaPPi, 27 mM Sacarosa, 1X Inhibidores de proteasas, en agua) y se recogieron con el raspador. Se

dejaron 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 13000 rpm. Se recogió el sobrenadante, al que se le añadió Sample Buffer 5X. Las proteínas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida (Acrilamida (Biorad), Agua, Lower Buffer / Upper Buffer, APS (Sigma), Temed (Sigma)) al 7'5%, 10% o 12% dependiendo del tamaño de la proteína a detectar, para lo cual, las muestras fueron previamente hervidas durante 5 minutos a 95°C. El gel se corrió en un buffer (Running Buffer) a 140 V durante 1 hora aproximadamente. A continuación, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore), previamente humedecida con Buffer de Transferencia, mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot SD (BioRad) a 50 mA por gel durante una hora. La membrana se bloqueó con una solución de PBS 0'1% Tween-20 (Sigma, St.Louise, MO, USA) con 5% de leche en polvo desnatada o de TBS 0'1% Tween-20 con 5% de BSA (Sigma, St. Louise, MO, USA) para proteínas fosforiladas durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Después se lavó con PBS-Tween o TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo correspondiente durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación. Se volvió a lavar 3 veces con PBS-Tween o TBS-Tween durante 5 minutos y finalmente se incubó durante otra hora con el anticuerpo secundario que correspondía, que lleva acoplado la peroxidasa del rábano picante (HRP). De nuevo se lavó tres veces durante 5 minutos cada vez con PBS-Tween o TBS-Tween. Finalmente, la membrana se incubó con el reactivo ECL (Millipore, Billerica, MA, USA) durante 5 minutos y se reveló mediante quimioluminiscencia.

BUFFERS UTILIZADOS:

| <u>Lower Buffer 4X</u> (pH 8'8) | | <u>Upper Buffer 4X</u> (pH 6'8) | |
|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|-----------|
| 90'85 gr | Tris Base (Roche) | 6'06 gr | Tris Base |
| 20 ml | SDS 10% (Sigma) | 4 ml | SDS 10% |
| Hasta 500 ml de Agua | | Hasta 100 ml de Agua | |

Running Buffer 5X (pH 8'3)

15 gr Tris Base (Roche)

72 gr Glicina (Sigma)

5 gr SDS (Sigma)

Hasta 1 litro de Agua

B. Transferencia Semiseca 10X

58 gr (48 mM) Tris Base

29 gr (39 mM) Glicina

3'7 gr (0'037 %) SDS

Hasta 1 litro de Agua

Sample Buffer 5X

250 mM Tris-HCl pH 6'8

500 mM DTT (Sigma)

10 % SDS (Sigma)

20 % Glicerol (Panreac)

0'2 % Azul de Bromofenol

Hasta 10 ml de Agua

2.7. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Con el fin de cuantificar la cantidad de proteína que se ha obtenido tras recoger las células, se utilizaron los reactivos de BioRad (Hercules, CA, USA): Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent A, B y S. Para ello, se hizo una curva patrón con BSA desde 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hasta 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, sobre la cual se extrapolaron los valores obtenidos de las muestras y se obtuvo la concentración de proteína. En primer lugar, se añadieron 5 μl de muestra (o una cantidad menor, pero siempre completando hasta 5 μl con el buffer en que estuviera diluída la muestra), a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con el fondo plano. En el caso del blanco, se añadieron 5 μl de buffer. A continuación, se añadieron 25 μl de la Solución A' (formada por 1 ml de Solución A y 20 μl de Solución S). Y se adicionaron 200 μl del Reactivo B. Se dejó incubando 15 minutos a

temperatura ambiente y se midió la longitud de onda a 750 nm en el lector de microplacas Varioskan Flash (Termo Electron Corporation).

2.8. FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA

Para determinar las células que sufren fragmentación de cromatina tras un tratamiento, se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos con lamelas redondas (Auxilab, Navarra, España). Tras el tratamiento, se lavaron los pocillos con 500 μ l de PBS, se aspiraron y se añadieron 500 μ l de Metanol (Panreac). Se dejaron a -20°C durante 6 minutos. A continuación, se lavaron de nuevo los pocillos con PBS y se incubaron con 0'5 $\mu\text{g/ml}$ de DAPI (Sigma) por pocillo durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado ese tiempo, se lavaron los pocillos con PBS. Las lamelas se montaron en portas utilizando la solución de montaje Prolong Gold (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Las células con la cromatina fragmentada se observaron a través de un microscopio de fluorescencia Leica DFC500. Las fotografías se realizaron utilizando el software LAS AF.

2.9. INMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE Ras

La detección de las células que expresaban Ras tras la infección retroviral de los mutantes de dicho oncogén se realizó mediante tinción con el anticuerpo específico de Ras. Para ello, se sembraron 5×10^4 células en placas de 24 pocillos con lamelas redondas (Auxilab, Navarra, España) y se fijaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en una solución 3'7% Formaldehído en PBS+CaCl₂+MgCl₂. Los pocillos se lavaron con PBS y se colocaron las lamelas sobre una superficie de parafilm totalmente lisa. A continuación, se permeabilizaron las células cubriendo cada cubre con una solución 0'2% Tritón X-100 (Sigma) en PBS+CaCl₂+MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se aspiró esta solución y se añadió la

solución de bloqueo (10% FCS en PBS+CaCl₂+MgCl₂), dejándolo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar esta solución, las lamelas se incubaron con 70 µl del anticuerpo primario anti-Ras (1:200), preparado en 0'1% Tritón X-100 + 0'25% BSA en PBS+CaCl₂+MgCl₂, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se aspiró el líquido y se añadieron 70 µl del anticuerpo secundario AlexaFluor 594 Donkey anti-mouse (1:200), dejándolo incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las lamelas se lavaron 3 veces de 10 minutos cada una con la solución de lavado (0'1% Tritón X-100 + 0'25% BSA en PBS+CaCl₂+MgCl₂), y se montaron en portas utilizando la solución de montaje Prolong Gold (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Antes de montar las lamelas en los portas, se sumergieron en agua destilada y se secaron. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DFC500/DFC350FX).

2.10. DETECCIÓN DE AUTOFAGIA

2.10.1. Traslocación de GFP-LC3 a la membrana del autofagosoma

Se sembraron 5x10⁴ células en placas de 24 pocillos con lamelas redondas (Auxilab, Navarra, España). Tras el tratamiento, se fijaron las células añadiendo 1 ml de Solución de Fijación (3'7% Formaldehído en PBS+CaCl₂+MgCl₂ (Gibco Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) a cada pocillo para que quedara a una dilución 1:2. Tras una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se aspiró el medio y se lavaron las lamelas con 1 ml de PBS+CaCl₂+MgCl₂. Las lamelas se montaron en portas (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania) utilizando el reactivo Prolong Gold (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Para cuantificar las células con un patrón de fluorescencia punteado, se contaron como mínimo 100 células por muestra que expresaban traslocación de eGFP-LC3 a las vesículas autofágicas. Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (Leica

DFC500/DFC350FX) o confocal (Zeiss Axiovert 100 M Confocal Laser Scanning Microscope). El porcentaje de células con un patrón de fluorescencia punteado representan las células en las que LC3 está translocado a la membrana del autofosoma respecto al número total de células que expresan eGFP-LC3.

2.10.2. Detección de autofosomas por Microscopía Electrónica

Para analizar la formación de autofosomas en las células autofágicas, se prepararon muestras para microscopía electrónica. Así pues, se sembraron 10^6 células en una placa de petri de 10 cm de diámetro. Tras tratarlas con TRAIL, se fijaron en una Solución 50% Karnovsky durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recolectaron con un raspador y se centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos. Se lavó el pellet una vez con 4 ml de Solución 70 % Karnovsky y se resuspendió en 1 ml de la misma solución, guardando las muestras a 4°C hasta ser analizadas.

2.10.3. Degradación de proteínas de vida media larga

La degradación de proteínas de vida media larga se evaluó marcando las células con 0,2 mCi/ml C^{14} -Valine (Amersham Biosciences) en el medio de cultivo. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, se lavaron con PBS tres veces y se incubaron con su medio de cultivo una hora antes de añadir el tratamiento. Tras 24 horas de tratamiento, se recogió el medio de cultivo y se tripsinizaron las células. Las proteínas celulares se precipitaron con 10% de Ácido tricloroacético (TCA) (Sigma) a 4°C durante 10 minutos. A continuación se centrifugó a 1000g durante 20 minutos. La radioactividad del medio de cultivo así como la del pellet se determinaron utilizando un contador de centelleo (Wallak, Turku, Finlandia). La tasa de degradación de proteínas se calculó como el nivel de radioactividad en el medio de

cultivo dividido por la radioactividad total, y los valores se expresaron como incremento en tanto por ciento tras los tratamientos.

2.10.4. Detección de LC3-I y LC3-II por Western Blot

La detección de la forma activa en el autofagosoma de la proteína autofágica LC3/Atg8 (LC3-II), se realizó mediante Western Blot. Para ello, se sembraron 3×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas en el incubador, se puso el tratamiento correspondiente para inducir autofagia. Cuatro horas antes de recoger las células, se añadieron los inhibidores de proteinasas Pepstatina-A y E64 a una concentración final de 10 µg/ml. Las células se recogieron en buffer de lisis (ver apartado 2.6.) y las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12%, utilizando los siguientes buffers:

Lower: 30 % Acrilamida, 1M Tris pH=8'8, 10% SDS, 10% APS, 0'4% TEMED.

Upper: 30 % Acrilamida, 1M Tris pH=6'8, 10% SDS, 10% APS, 1% TEMED.

El gel se transfirió a una membrana de PVDF a 50 mA por gel durante una hora. La membrana se bloqueó con una solución de TBS 0'1% Tween-20 (Sigma, St. Louise, MO, USA) con 5% de BSA (Sigma, St. Louise, MO, USA) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario LC3 durante una hora a temperatura ambiente y con el secundario 1:10.000 otra hora a temperatura ambiente, lavando 3 veces de 5 minutos con TBST entre ambos pasos. Finalmente, la membrana se incubó con el reactivo ECL (Millipore, Billerica, MA, USA) durante 5 minutos y se reveló mediante quimioluminiscencia.

2.11. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

2.11.1. Transfección por Dharmafect para silenciamiento de proteínas

Para obtener el silenciamiento de alguna proteína de la célula, se transfectaron de forma transitoria con RNAs de interferencia (siRNAs: small interference RNA). Así pues, se sembraron 3×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos en medio sin antibiótico. Al día siguiente, se le añadieron 2 ml de medio de transfección a cada pocillo y se dejó incubar durante 24, 48 o 72 horas según el oligo. Pasado este tiempo, se puso el tratamiento correspondiente a las células. El medio de transfección se componía de 50 nM del oligo (excepto en los controles), Dharmafect (Dharmacon, Colorado, USA) y Optimem (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, USA). La preparación del medio constaba de dos pasos, el primero en el que se mezclaban durante 5 minutos a temperatura ambiente el Dharmafect con el Optimem. A continuación, se añadía esta mezcla a los oligos y se dejaba 20 minutos a temperatura ambiente. En ese tiempo, se lavaban los pocillos con Optimem y se les añadía 1'6 ml a cada uno. Tras los 20 minutos de incubación, se repartían 400 μ l de la mezcla Dharmafect / Oligo / Optimem al pocillo correspondiente.

La recogida de muestras se realizó según el protocolo a seguir a continuación: para medir apoptosis, tal como se especifica en el punto 2.2; para análisis de proteínas, se aspiró el medio de los pocillos y se añadieron 500 μ l de PBS frío. Las células se despegaron con el raspador. Se lavaron, se resuspendieron los pellets en Sample Buffer 1X, y las muestras se corrieron en un gel de acrilamida (ver apartado 2.6.).

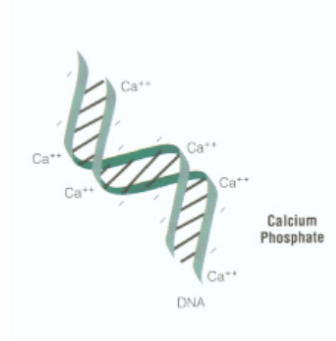
2.11.2. Transfección por Lipofectamina en RPE1 para expresión de GFP-LC3

Para obtener la línea estable RPE1-GFP-LC3, se transfectaron las células RPE1 con el plásmido GFP-LC3. Para ello, sembramos 3×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos en medio sin antibiótico. Tras 24 horas, se lavaron los pocillos con Optimem, se añadieron 2 ml de la mezcla de transfección a cada pocillo y se dejó incubar durante 72 horas. Para la transfección, se mezclaron por un lado 250 μ l de Optimem y 3 μ g de DNA de GFP-LC3 por pocillo, y por otro 250 μ l de Optimem y 3 μ l de Lipofectamina (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) por pocillo, dejándolo a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se unieron ambas mezclas y se dejaron incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadieron 500 μ l de la mezcla final a cada pocillo que contenía 1'5 ml de Optimem. Pasadas 72 horas desde la transfección, se podían ver células verdes en el microscopio de fluorescencia. Para obtener la línea estable, se seleccionaron las células que expresaban GFP-LC3 (verdes) con 500 μ g/ml del antibiótico de selección G418 (Gibco, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), añadido al medio de cultivo, durante un mes.

2.11.3. Transfección por Fosfato Cálcico en 293T para producción de lentivirus

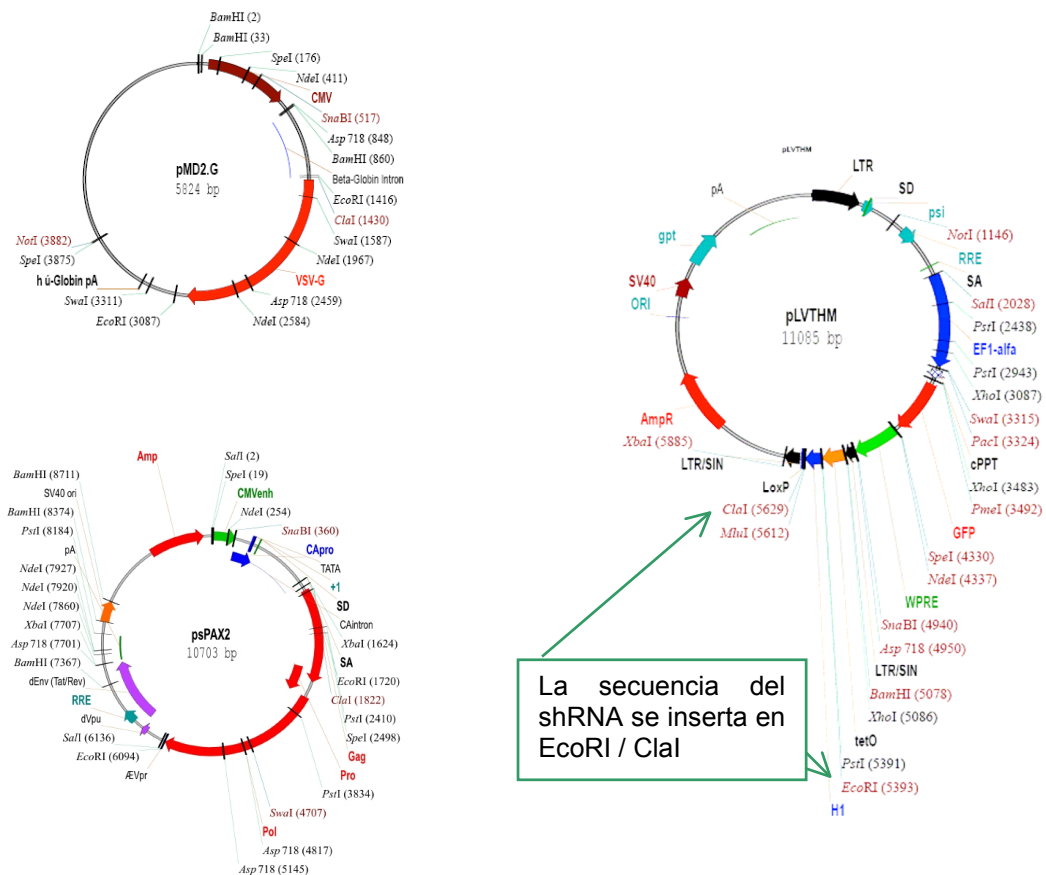
Para la transfección se utilizó el método descrito por Ausbel (Ausbel, F.M. y cols. 1994). Método basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el DNA en una solución salina de fosfatos. En esta situación co-precipitan formando unos agregados que son endocitados/fagocitados por las células. Aparentemente el agregado con calcio protege al DNA de la degradación por las nucleasas celulares. El

tamaño y la calidad del precipitado son críticos para el éxito del proceso, que se ve afectado por factores tales como pequeños cambios en el pH de la solución, etc...



Se sembraron 2×10^6 células 293T en placas de 90 mm en 10 ml de medio completo, para que estuvieran a una confluencia aproximada el día de la transfección de entre un 50-80%. Al día siguiente, unas 3 horas antes de la transfección, se substituyó el medio de cultivo por 8 ml de medio fresco. Se transfectaron las células con 30 μg de DNA total, en una proporción 1:2:3 (Plásmido pMD2.G de la envoltura viral: Plásmido psPAX2 de la cápside: Plásmido pVLTHM con el gen de interés) que incluía: 4'5 μg de pMD2.G, 9 μg de psPAX2 y 13'5 μg de pVLTHM (cedidos por la Dra. Rosa M^a Ríos (CABIMER, Sevilla)).

El DNA de los tres plásmidos se mezcló suavemente y se añadió gota a gota a un tubo con 0'5 ml de 2XHBS. Tras agitar suavemente, se añadieron, despacio y gota a gota, 30 μl de CaCl_2 2'5 M y se agitó inmediatamente. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se añadieron 0'5 ml de la mezcla a cada placa de 90 mm, gota a gota. Una vez añadida toda la solución, se movieron las placas muy suavemente, y nunca en círculos, para distribuir totalmente la solución de transfección. Las placas se dejaron en un incubador a 37°C y 5% CO_2 durante 12 horas, posteriormente se reemplazó el medio que contenía los cristales de fosfato cálcico por 8 ml de medio fresco y se incubaron bajo las mismas condiciones durante 48 horas.



Mapas de los plásmidos pMD2.G, psPAX2 y pLVTHM.

2XHBS

| | |
|----------------------|----------------------------------|
| 280 mM | NaCl |
| 100 mM | Hepes |
| 1.5 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| Ajustar el pH a 7.05 | |

2.12. RT-PCR

El RNA total se aisló utilizando el kit *NucleoSpin® Total RNA Isolation Kit* (Macherey-Nagel) o mediante Trizol (Invitrogen Molecular Probes). A partir de dicho RNA, se obtuvo el cDNA, utilizando el kit *TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit* (Roche Diagnostics) y siguiendo el protocolo establecido. Se realizó una RT-PCR de 35 ciclos y el RNAm se analizó en un gel de agarosa (1'5% agarosa, 50 ml TAE 1X,

1:20.000 Bromuro de Etidio), cargando 10 µl de la reacción de PCR a los que se añadieron 2 µl de Loading Buffer 6X (10 mM Tris-HCl pH 7'6, 0'15% Orange G (Sigma), 60% Glicerol, 60 mM EDTA pH 7'6). Las muestras corrieron en el gel de agarosa al 1% a 100 V, 80 mA durante 25 minutos en un buffer TAE 1X.

TAE 50 X

242 gr Tris Base

100 ml EDTA 0'5 M pH 8

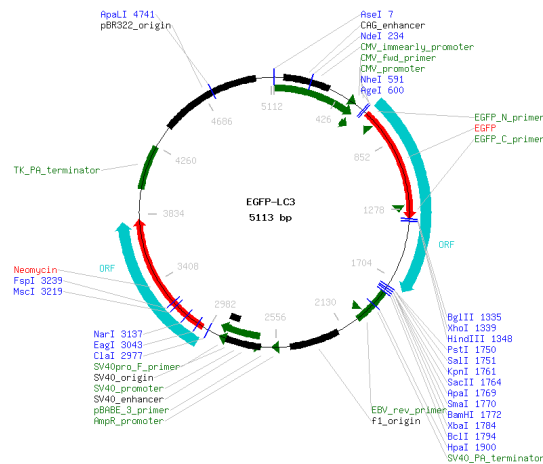
57'1 ml Ácido Acético Glaciar (Panreac)

Hasta 1 litro de Agua

2.13. INFECCIONES VIRALES

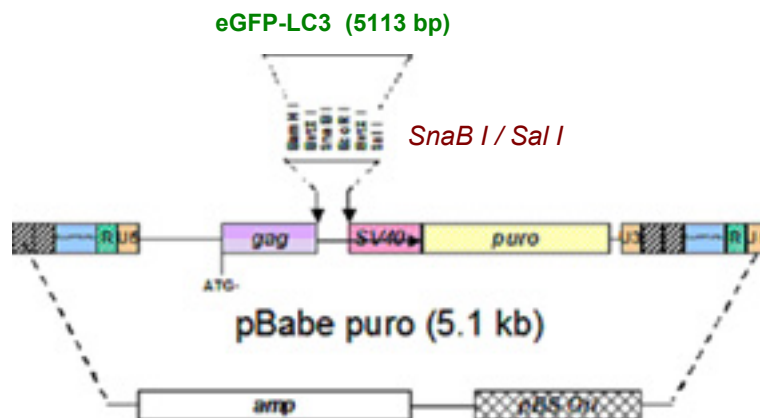
2.13.1. Infección Retroviral: MCF10A-GFP-LC3, MCF10A-GFP-LC3-Ras, MCF10A-GFP-LC3-Src, MCF10A-Ras-Mutantes

Para obtener la línea celular estable MCF10A-eGFP-LC3 se utilizó el inserto Rat-LC3 dentro del vector pEGFP-C1 (Clontech), un vector de expresión de proteínas de fusión GFP. Dicho vector se obtuvo insertando el cDNA de LC3 en los sitios *BglIII* y *EcoRI* del pEGFP-C1. El plásmido eGFP-LC3 fue amablemente cedido por el Dr. Guido Kroemer (Institut Gustave Roussy, Francia). Las células MCF10A-EcoR2, que expresan un receptor ecotrópico, fueron infectadas con los siguientes vectores retrovirales: pBabepuro vacío (cedido por Christian Holmberg) y pBabepuro-GFP-LC3. Los vectores retrovirales fueron producidos en células Phoenix 293T productoras de retrovirus ecotrópicos (cedidas por Christian Holmberg). Las células 293T fueron transfectadas utilizando el protocolo de transfección de fosfato cálcico que se ha descrito previamente (Pear, Nolan et al. 1993). Tras 24 horas de la transfección, se les cambió el medio a las células.



Mapa del plásmido EGFP-LC3, de 5113 pares de bases de tamaño.

Al día siguiente se realizó la recogida de virus 3 veces cada 6 horas, y se sembraron células MCF10A-EcoR. A continuación, se filtraron los virus con un filtro de $0.45 \mu\text{m}$, y se les añadieron 4 ng/ml de Polybrene (Sigma) para aumentar la eficiencia de infección. Se infectaron las células MCF10A-EcoR, añadiendo 4 ml de virus a la placa 3 veces cada 2 horas. Al día siguiente, se cambió el medio a las células y, 24 horas después, se inició la selección con 2 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina (Sigma) durante una semana. Para obtener las líneas celulares estables MCF10A-eGFP-LC3-Ras y MCF10A-eGFP-LC3-Src, se infectaron las células MCF10A-eGFP-LC3 con los vectores pBabe-hygro-*vHaRas* (cedido por Nikolaj Dietrich, Universidad de Copenhague, Dinamarca) y pBabe-hygro-*cSrc*^{Y527F} (cedido por Sarah Courtneidge, Van Andel Research Institute, Grand Rapids, MI, USA), producidos en 293T, utilizando el mismo protocolo y seleccionándolas con 75 U/ml de hygromicina (Sigma).



Mapa del vector retroviral *pBAbE*puro. El GFP-LC3 se subclonó en los sitios *SnaB* I y *Sal* I del vector *pBAbE*puro (Kabeya, Mizushima et al. 2000).

Los mutantes de Ras se obtuvieron infectando las células MCF10A-GFP-LC3 con virus que contenían los vectores de los tres mutantes (35S, 37G y 40C). Debido a que el antibiótico de selección era puromicina, la detección de las células que expresaban Ras se realizó mediante inmunocitoquímica (ver apartado 2.9).

2.13.2. Infección Lentiviral: MCF10A-shBeclina1, MCF10A-shTAK1, MCF10A-scrambled

Se utilizaron lentivirus para obtener células MCF10A que expresaran establemente RNA de interferencia de los genes implicados en autofagia Beclina1 y TAK1, así como con una secuencia aleatoria no interfiriente (scrambled). Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

a) Producción de los shRNAs.

En primer lugar, se identificaron los siRNAs eficientes en la interferencia de las proteínas de interés. Las secuencias de los oligos de los siRNAs utilizados, de unos 20 nucleótidos, fueron las siguientes:

siRNA-Beclina1: 5'-CAGUUUGGCACAAUCAUA-3'

siRNA-TAK1: 5'-GGAGAUCGAGGUGGAAGAG-3'

siRNA-scrambled: 5'-CGACCGAGACAAGCGCAAG-3'

En el caso de la Beclina se comprobó que el siRNA estaba fuera del dominio BH3-only.

A continuación, se diseñaron oligos para shRNAs, de unos 60 nucleótidos, cuya composición era apropiada para su inserción en el vector pSUPER, en los sitios Bgl-II / Hind-III. Los fragmentos a insertar en el pSUPER fueron:

Beclina1:

5'-GATCCCCCAGTTTGGCACAATCAATATTC AAGAGATATTGATTGTGCCAAACTGTTTTTA-3'

3'-GGGGTCAAACCGTGTTAGTTATAAGTTCTCTATAACTAACACGGTTTGACAAAAATTCGA-5'

TAK1:

5'-GATCCCCGGAGATCGAGGTGGAAGAGTTC AAGAGACTCTTCCACCTCGATCTCCTTTTTTA-3'

3'-GGGCCTCTAGCTCCACCTTCTCAAGTTCTCTGAGAAGGTGGAGCTAGAGGAAAAATTCGA-5'

Scrambled:

5'-GATCCCCGACCGAGACAAGCGCAAGTTC AAGAGACTTGCGCTTGTCTCGGTGTTTTTA-3'

3'-GGGGCTGGCTCTGTTTCGCGTTCAAGTTCTCTGAACGCGAACAGAGCCAGAAAAATTCGA-5'

Las secuencias señaladas en rojo corresponden con:

1. Sitio Bgl-II.
2. Hairpin.
3. Sitio Hind-III.

Tras comprobar que las secuencias insertadas en el pSUPER producían la interferencia deseada, los fragmentos se insertaron en el vector lentiviral pVLTHM, bajo el promotor H1, en los sitios EcoR-I / Cla-I.

- b) Transfección de células 293T por CaCl₂ (ver apartado 2.11.3).

Tras las 48 horas de transfección, se recogió el sobrenadante y se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm para eliminar los restos celulares. Posteriormente, se purificó pasándolo por filtros de 0'45 µm que contienen una membrana de acetato de

celulosa (Sartorius, Goettingen, Alemania). Los virus se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

c) Concentración del sobrenadante viral.

Una vez filtrados los virus, se concentraron utilizando filtros Vivaspin 20 Polyethersulfone 100.000 MWCO (Sartorius group-DICSA). En primer lugar, se lavó el filtro con 5 ml de agua destilada, centrifugándolo durante 5 minutos a 4°C a 1800 g. A continuación, se añadieron 20 ml de sobrenadante viral y se centrifugó entre 40 y 60 minutos a 4°C a 1800 g.

d) Titulación viral.

Para saber la eficiencia de infección, se sembraron 8×10^4 células MCF10A en placas de 6 pocillos. Al día siguiente, se cambió el medio y se añadieron cantidades crecientes de virus. A las 48 horas de la infección, se midió el porcentaje de GFP en el citómetro (FL1) para hacer una curva de infección. Con esta curva se puede saber el volumen de virus necesario para obtener una infección del 80%-100% en un número de células conocido (Multiplicity of infection -MOI- de 1).

e) Infección viral.

Una vez determinado el volumen viral necesario, se sembraron 5×10^6 células MCF10A en placas de 90 mm, a las que se añadieron los virus para que quedara a una MOI de 3, es decir de tres virus por cada célula. Para aumentar la eficiencia de infección, se añadieron 8 $\mu\text{g/ml}$ de Polybrene (Sigma). A las 12 horas de la infección se cambió el medio para eliminar el polybrene y se dejaron hasta las 72 horas.

f) Sorting.

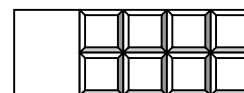
Con el objetivo de obtener una población de células 100% transfectadas, se hizo un sorting de cada línea celular utilizando un citómetro FACS Aria Cell Sorter (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) y realizando el análisis mediante el software FACSDiva (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Para recoger las células, se

tripsinizaron y se lavaron con PBS antes de resuspenderlas en 1 ml de Tampón de Sorting para células adherentes (5 mM EDTA; 25 mM HEPES pH 7 en PBS). Con el objetivo de evitar agregados, se filtraron las células en un filtro de 70 μm , proporcionados por la unidad de citometría. Las células se sortearon y se recogieron en un tubo que contenía 1 ml de FBS. Posteriormente se centrifugaron y se resuspendieron en medio completo, dejándolas crecer en el incubador hasta conseguir una población suficiente para poder trabajar.

2.14. ESTUDIOS DE MORFOGÉNESIS

2.14.1. Cultivos Tridimensionales de Células Epiteliales

2.14.1.1. Siembra de células en Matrigel



En primer lugar, se añadieron 50 μl de Matrigel (GFR BD; Ref. 354230), previamente descongelado, a cada pocillo de la placa (BD Transduction, Ref. 354118). Se dejó la placa en el incubador durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 5.000 células por pocillo en un volumen de 400 μl de medio de Resuspensión, al que se añadieron 5 ng/ml de EGF (Peprotech 100-15) y 2% de matrigel.

La placa se mantuvo en el incubador.

2.14.1.2. Cambio de medio de los acinos

El cambio de medio se realizó cada 4 días. Para ello, se eliminó el medio de los pocillos y se añadieron 400 μl de Medio 3D-Assay suplementado con 5 ng/ml de EGF y 2% de matrigel. Este proceso se realizó sucesivamente hasta el momento de la recogida de los acinos.

2.14.2. Inmunofluorescencia en 3D

El día de recogida de los acinos, éstos se fijaron con 400 μl de Formalin (Sigma HT501128) al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en agitación muy

suave. Después, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con 400 µl PBS/Glicina 1X a TA en agitación suave. El primer bloqueo se llevó a cabo añadiendo 200 µl de Buffer IF Wash 1X + 10% Goat Serum (Sigma G9023) durante 1 hora a TA en agitación suave. El segundo bloqueo se realizó con 200 µl de una solución IF Wash + 10% Goat Serum + 1:100 F(ab)₂ (Jackson ImmunoResearch 115-006-006) durante unos 30-40 minutos a TA en agitación suave. A continuación se dejó incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de Caspasa-3 (Cell Signaling 9661) en una solución IF Wash + 10% Goat Serum + 1:100 F(ab)₂ + 1:100 Caspasa-3. Al día siguiente, se lavaron los pocillos 3 veces durante 20 minutos con 400 µl del Buffer IF Wash a TA en agitación suave. Seguidamente, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario, añadiendo 200 µl de IF Wash + 10% Goat Serum + 1:500 Texas Red (Jackson ImmunoResearch 711-075-152) y dejando en agitación suave durante 50-60 minutos a TA. A partir de este momento, las muestras se mantuvieron tapadas con papel de aluminio. Se volvieron a lavar 3 veces con IF Wash durante 20 minutos y se incubaron con 20 ng/ml de una tinción nuclear (DAPI) (Sigma D9542) durante 10 minutos a TA en agitación suave. Se realizó un último lavado de 5 minutos con IF Wash. Se quitó la carcasa con cuidado y al porta con el matrigel se le colocó un cubre que contenía 8 gotas de Prolong Gold. Se dejó secar bien durante toda la noche a TA y tapado con papel de aluminio. Al día siguiente, se selló el porta con esmalte de uñas y, una vez seco, se analizaron las muestras.

2.14.3. Análisis de las muestras

Los acinos se analizaron en un microscopio confocal espectral Leica TCS-SP5, utilizando un objetivo HCXPLAPO con un aumento de 20X y una apertura numérica de 0.7 de inmersión. El software utilizado para el análisis y la captación de imágenes era LAS AF. Se contaron un mínimo de 100 acinos por muestra, analizando el

porcentaje de acinos vacíos (con 4 o menos células en su interior) así como la cantidad de acinos con activación de caspasa-3.

2.14.4. Medios de cultivo y Soluciones utilizados

2.14.4.1. Medios de cultivo utilizados

| | 3D-ASSAY | Resuspensión |
|---------------------------|-----------------|---------------------|
| DMEM F12 | 500 ml | 500 ml |
| Horse Serum | 10 ml | 100 ml |
| EGF (100 µg/ml) | - | - |
| Hydrocortisona (5 mg/ml) | 50 µl | - |
| Toxina Colérica (5 mg/ml) | 10 µl | - |
| Insulina (10 mg/ml) | 500 µl | - |
| Pen/Strep | 5ml | 5 ml |

2.14.4.2. Soluciones

PBS/Glicina 10X

38 gr NaCl (Sigma #S9625)

9'38 gr Na₂HPO₄ dibasic heptahydrate (Sigma #S9390)

2'07 gr NaH₂PO₄ monobasic monohydrate (Sigma #S9638)

37'5 gr Glicina (Merk #1.04094.1000)

500 ml volumen total

pH 7'4 Filtrar

IF Wash 10X

38 gr NaCl (Sigma #S9625)

9'38 gr Na₂HPO₄ dibasic heptahydrate (Sigma #S9390)

2'07 gr NaH₂PO₄ monobasic monohydrate (Sigma #S9638)

2'5 gr NaN₃ sodium Azide (Sigma #S8032)

5 gr BSA (Sigma #A7906)

10 ml Tritón X-100 (Sigma #T8787)

2'05 ml Tween-20 (Sigma #P1379)

50 ml volumen total

pH 7'4

Filtrar

2.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se unieron experimentos independientes cuando se asumió un coeficiente de varianza idéntico. La significación estadística se evaluó mediante el análisis de T-Test (n = número de experimentos independientes). Un valor de p menor de 0'05 se consideró significativo.

2.16. CUANTIFICACIÓN DE WESTERN BLOTS

La cuantificación de la señal del Western Blot se llevó a cabo mediante densitometría, utilizando el software Image Quant TL (HE Healthcare) tras escanear las películas en un escáner de transmisión (Image Scanner II, HE Healthcare). La expresión relativa de proteínas se normalizó utilizando la expresión de los controles de carga (Tubulina o GAPDH). La cuantificación se expresó como porcentaje de los niveles de expresión en células controles, que fueron arbitrariamente seleccionadas como el 100%.

VI. RESULTADOS

Parte I: TRAIL induce autofagia en células epiteliales de mama.

1. TRAIL induce autofagia funcional en células epiteliales de mama.

Se ha descrito que TRAIL induce la formación de vacuolas autofágicas en células epiteliales de mama y próstata, detectado mediante microscopía electrónica (Mills, Reginato et al. 2004; Thorburn, Moore et al. 2005). Con el objetivo de estudiar con mayor detalle el mecanismo de acumulación de autofagosomas inducido por TRAIL, se creó una línea celular epitelial de mama MCF10A que expresara establemente la proteína asociada a la membrana del autofagosoma (LC3) fusionada con la proteína fluorescente verde (GFP): eGFP-LC3. Utilizando este modelo, se trataron las células MCF10A-GFP-LC3 con TRAIL, TNF o Rapamicina, un inductor directo de autofagia ya que inhibe la actividad de mTOR. En la mayor parte de las células no tratadas, GFP-LC3 se encontraba con una distribución difusa en el citoplasma y núcleo. Sin embargo, y como era de esperar, el tratamiento con Rapamicina indujo un aumento en el número de células que contenían un patrón punteado de eGFP-LC3, indicativo de la formación y acumulación de autofagosomas en el citoplasma celular (Figura 1A). El tratamiento con TRAIL también incrementó el número de células con acumulación de autofagosomas hasta un nivel comparable al observado tras el tratamiento con Rapamicina (Figura 1A), siendo significativo desde las 6 horas de tratamiento e incrementándose durante 72 horas, y observándose una respuesta dependiente de la dosis en un rango de concentraciones de TRAIL de entre 10 y 500 ng/ml (Figura 1B-C, respectivamente). Por el contrario, la citoquina TNF no produjo ningún cambio en la distribución de GFP-LC3 (Figura 1A), lo que sugiere que el efecto inductor de autofagia mediado por TRAIL no es una propiedad general de los receptores de muerte. El cotratamiento con 3-Metiladenina (3-MA), un inhibidor de la PI3K clase-III y de autofagia, bloqueó la traslocación de LC3 inducida por Rapamicina y TRAIL (Figura 1A).

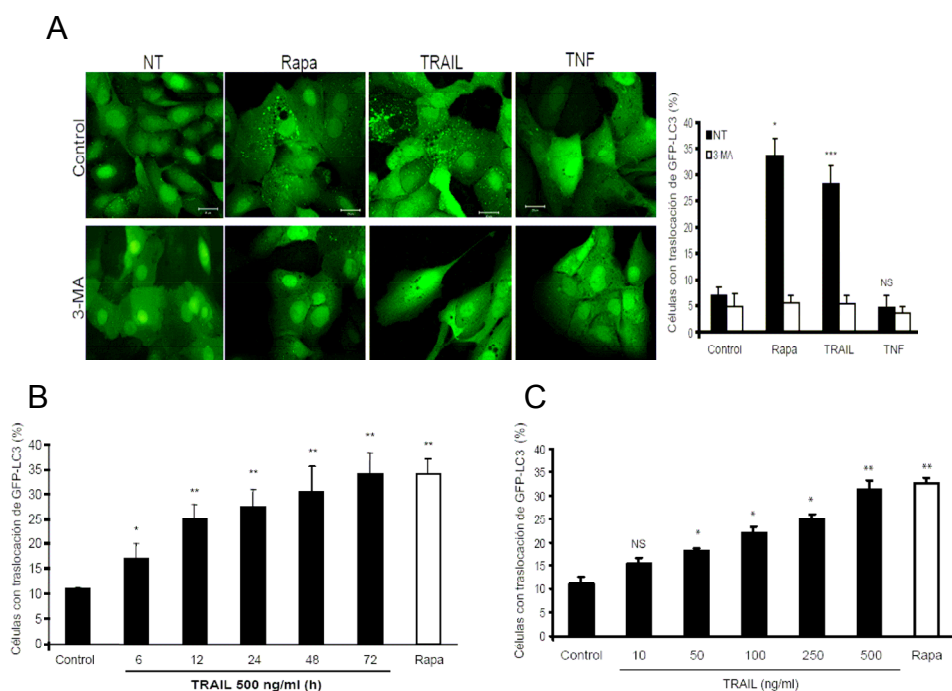


Figura 1. TRAIL induce autofagia funcional en células epiteliales de mama MCF10A (I).

(A) Las células MCF10A sin tratar o tratadas con Rapamicina (5 μ M; 24h), TRAIL (500 ng/ml; 24h) o TNF (10 ng/ml; 24h), y pretratadas 1h antes con 3-MA (10 mM), se analizaron por microscopía confocal (escala 20 μ m) para determinar la traslocación de LC3. El histograma muestra el porcentaje de células con traslocación de LC3 (punteado). Los valores representan +/- DE de tres experimentos independientes por duplicado. (B-C) Las células tratadas con TRAIL a las dosis y tiempos indicados y con Rapamicina (5 μ M; 24h) se analizaron como en (A). Los valores representan +/- DE de tres experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra sin tratar con TRAIL (A-C).

Para confirmar que el patrón punteado de expresión de LC3 correspondía a un proceso autofágico, se llevaron a cabo experimentos utilizando ARNs de interferencia (siRNAs) de proteínas de autofagia. Así, la formación de autofagosomas inducida por TRAIL se inhibió cuando se deplecionaron las células en Beclina1/Atg6 y Atg7 (Figura 1D), indicando que la traslocación de LC3 observada era dependiente de la maquinaria de autofagia. Por otro lado, TRAIL también indujo un aumento de la degradación de proteínas de vida media larga, indicando que la formación de autofagosomas reflejaba un incremento en la autofagia funcional (Figura 1E). Asimismo, TRAIL indujo acumulación de autofagosomas y autolisosomas en el citoplasma celular, analizado por microscopía electrónica (Figura 1F), indicativo

también de una autofagia funcional. Para corroborar que efectivamente el patrón punteado de GFP-LC3 que se observó tras el tratamiento con TRAIL o Rapamicina era representativo de la formación de autofagosomas, se analizaron por Western Blot las dos formas de LC3 (LC3-I y LC3-II), donde LC3-II es la proteína conjugada funcional que se asocia a la membrana de los autofagosomas maduros. Así pues, se observó que tanto TRAIL como Rapamicina indujeron un aumento en la forma LC3-II respecto a las células sin tratar (Figura 1G).

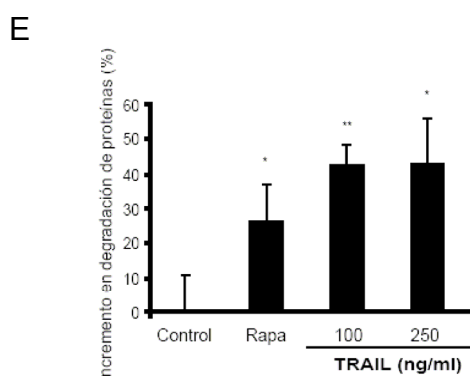
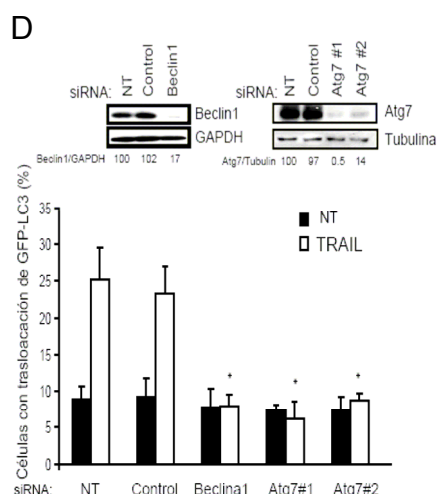
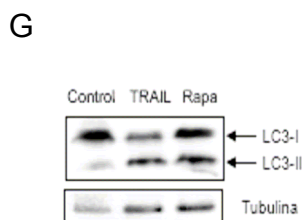
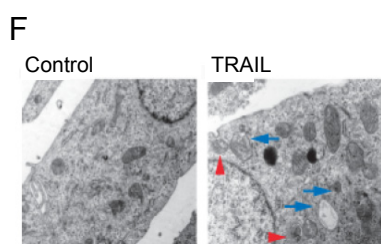


Figura 1. TRAIL induce autofagia funcional en células epiteliales de mama MCF10A (II).

(D) Las células MCF10A se transfectaron con dharmafect (NT), con un siRNA control (Control) o con siRNAs frente a Beclina1 o Atg7 (dos siRNAs diferentes) durante 48h. La expresión de las proteínas Beclina1 y Atg7 se analizó por Western Blot, utilizando GAPDH y Tubulina como control de carga. Tras las 48h de transfección, las células se trataron con TRAIL (500 ng/ml) durante 24h y se evaluaron como en (A). Los valores representan +/- DE de cuatro experimentos independientes e indican la relación Beclina1:GAPDH y Atg7:Tubulina como porcentaje frente al control. (E) Las células sin tratar o tratadas con Rapamicina (5 μM) o TRAIL (100 o 250 ng/ml) durante 24h, se analizaron para determinar la degradación de proteínas de vida media larga. La figura muestra el porcentaje del incremento en la degradación de proteínas de vida media larga en comparación con el control de células no tratadas. Los valores representan +/- DE de tres experimentos independientes. (F) La figura muestra fotografías de microscopía electrónica de células MCF10A sin tratar o tratadas con TRAIL 500 ng/ml durante 16h. Las flechas rojas y azules muestran autofagosomas y autolisosomas, respectivamente.



(G) Las proteínas sin tratar o tratadas con TRAIL (500 ng/ml) o Rapamicina (5 μM) durante 24h, se analizaron por Western Blot para determinar las formas LC3-I y LC3-II, utilizando inhibidores de proteasas E64d y Pepsatatina-A, que fueron añadidos 4 horas de recoger las células. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos diferentes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra sin tratar con TRAIL (E) o con la muestra sin transfectar tratada con TRAIL

2. La autofagia inducida por TRAIL depende de la activación de AMPK y de la inhibición de mTORC1.

Mientras que la señalización de TRAIL hacia apoptosis está bien caracterizada (Falschlehner, Emmerich et al. 2007), los mecanismos moleculares que gobiernan la autofagia inducida por TRAIL están aún sin explorar. Con el objetivo de saber si la autofagia inducida por TRAIL en células MCF10A estaba asociada con la inhibición del complejo serina/treonina quinasa mTORC1, un inhibidor de autofagia en células no estresadas (Meijer and Codogno 2006), se analizó si la actividad mTORC1 estaba disminuida en células tratadas con TRAIL. Para ello, se midieron los niveles de fosforilación de un sustrato de mTORC1, la quinasa 1 de la proteína ribosomal S6 ($p70^{S6K}$). Como era de esperar, las células tratadas con Rapamicina indujeron una disminución en la actividad mTORC1 (Figura 2A). Del mismo modo, el tratamiento con TRAIL inhibió la fosforilación de $p70^{S6K}$ (Figura 2A), indicando que la autofagia inducida por TRAIL estaba mediada por la inhibición de mTOR. La quinasa dependiente de AMP (AMPK), es una conocida quinasa que está por encima de mTORC1, regulando su inhibición y, por tanto, autofagia a través de un mecanismo que implica al complejo Tuberculosis activado por GTPasas (TSC1/2) y a su sustrato la proteína de unión a GTP RHEB (Hoyer-Hansen and Jaattela 2007). Para determinar si la inhibición de mTORC1 estaba mediada por AMPK, se analizó la actividad AMPK inducida por TRAIL mediante la fosforilación de su sustrato Acetil-CoenzimaA-Carboxilasa (ACC). Efectivamente, el tratamiento con un activador directo de AMPK (AICAR: 5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribosido), aumentó la fosforilación de ACC, mientras que la inhibición de mTORC1 por Rapamicina no afectó a la actividad de AMPK, corroborando que AMPK está por encima de mTOR (Figura 2B). Además, TRAIL también activó de forma rápida y sostenida a AMPK, demostrado por

el aumento de la fosforilación de ACC desde 1 minuto hasta 24 horas de tratamiento (Figura 2B-C y Figura 5A).

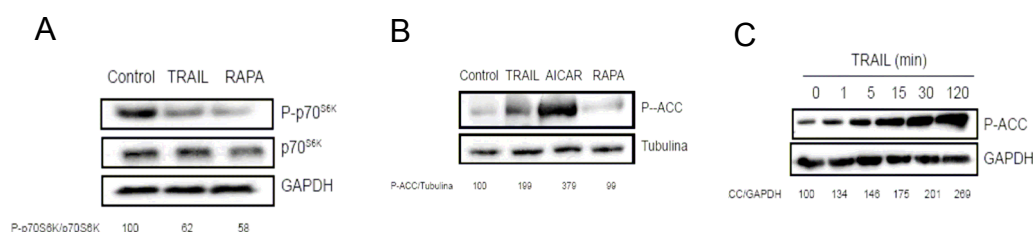


Figura 2. TRAIL activa a AMPK e inhibe a mTOR.

(A) Extractos totales de células MCF10A sin tratar o tratadas con 500 ng/ml de TRAIL o 5 μ M de Rapamicina (RAPA) durante 24h. Los niveles de p70^{S6K} fosforilada, de p70^{S6K} total y de GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes. Los valores indican el ratio P-p70^{S6K}:p70^{S6K} como porcentaje respecto al control. Resultados similares se obtuvieron en la relación p70^{S6K}:GAPDH. (B) Análisis del nivel de P-ACC y Tubulina (control de carga) en lisados totales de células MCF10A sin tratar o tratadas con TRAIL(500 ng/ml; 24h), AICAR como control positivo (1 mM; 4h) o Rapamicina como control negativo (5 μ M; 24h). Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. Los valores indican la relación P-ACC:Tubulina como porcentaje respecto al control. (C) Extractos celulares totales de células MCF10A sin tratar o tratadas con TRAIL (500 ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles de P-ACC y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot. Los valores indican la relación P-ACC:GAPDH como porcentaje respecto al control. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de evaluar el papel de AMPK en la inhibición de mTORC1 y la autofagia inducidas por TRAIL, se deplecionaron las células para la subunidad catalítica α 1 de AMPK utilizando dos siRNAs distintos (Figura 3A, panel superior). La eliminación de AMPK de la célula, reestableció la inhibición de mTORC1 inducida por TRAIL tras 2 o 24 horas de tratamiento (Figura 3A, panel inferior o panel intermedio, respectivamente), y bloqueó la activación de AMPK (Figura 3A, panel inferior). Además, la depleción de AMPK atenuó la formación de autofagosomas mediada por TRAIL en células MCF10A (Figura 3B), indicando que AMPK es necesaria para inhibir mTORC1 e inducir autofagia tras el tratamiento con TRAIL. A pesar de que se sabe que TRAIL es capaz de activar diversas quinasas (Falschlehner, Emmerich et al. 2007), estos datos son los primeros resultados que dan a TRAIL la capacidad de

activar AMPK. Además, son una evidencia de que AMPK, y más concretamente AMPK α 1, es un mediador esencial de autofagia en células epiteliales de mama.

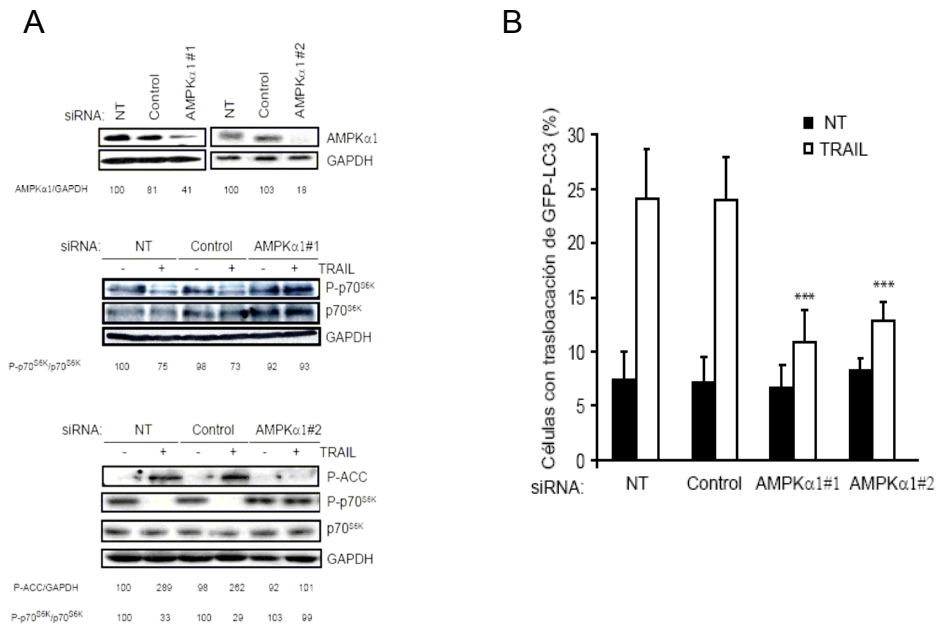


Figura 3. Papel de AMPK y mTORC1 en la autofagia inducida por TRAIL.

(A) Las células MCF10A se transfectaron con dharmafect sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con dos siRNAs frente a AMPK α 1 (AMPK α 1) durante 48h. Los niveles de AMPK α 1 se detectaron mediante Western Blot (panel superior). Tras las 48h de la transfección las células se trataron con 500 ng/ml de TRAIL durante 24h (panel intermedio) o 2h (panel inferior), y los niveles de P-p70^{S6K}, P-p70^{S6K} total y GAPDH (paneles intermedio e inferior) así como los de P-ACC (panel inferior) se detectaron por inmunoblot. Los valores indican la relación P-p70^{S6K}:p70^{S6K} y P-ACC:GAPDH como porcentaje respecto al control. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes. (B) Las células tratadas como en (A, panel intermedio) fueron analizadas para detectar traslocación de LC3 al autofagosoma. El histograma muestra el porcentaje de células con patrón punteado, contándose un mínimo de 100 células por punto. Los valores representan +/- DE de cuatro experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 comparado con la muestra sin transfectar tratada con TRAIL.

3. TAK1 media la activación de AMPK y la autofagia inducidas por TRAIL.

Está descrito que AMPK se puede fosforilar y activar a través de dos quinasas: LKB1 y CaMKK β , que median la autofagia en respuesta a la privación de aminoácidos, por un aumento en la relación AMP/ATP, y al incremento en la

concentración de calcio en el citoplasma, respectivamente (Hoyer-Hansen and Jaattela 2007; Liang, Shao et al. 2007). Por ello, se investigó si una de estas quinasas estaba mediando la activación de AMPK y autofagia en respuesta a TRAIL. Sin embargo, a pesar de que los siRNAs utilizados disminuyeron eficazmente los niveles de proteínas (LKB1) o mRNA (CaMKK β), y de que la activación de AMPK y la acumulación de autofagosomas en células con privación de aminoácidos o tratadas con Ionomicina, respectivamente, se inhibió totalmente, la depleción de estas dos quinasas no modificó la activación de AMPK ni los niveles de autofagia en respuesta a TRAIL (Figuras 4A-C).

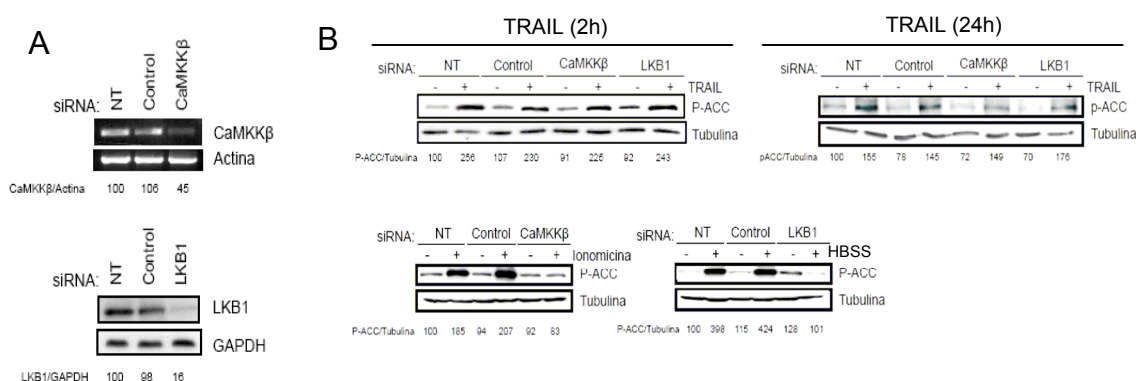


Figura 4. LKB1 y CaMKK β no están involucrados en la activación de AMPK y la autofagia inducidas por TRAIL (I).

(A) Los niveles de mRNA de CaMKK β o Actina (control de carga) en células MCF10A se analizaron por RT-PCR 48h tras la transfección sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a CaMKK β . Los niveles de proteína de LKB1 y GAPDH (control de carga) se analizaron por Western Blot en células transfectadas sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a LKB1 durante 48h. Los valores indican la relación CaMKK β :Actina o LKB1:GAPDH como porcentaje respecto a las células sin transfectar. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos diferentes. (B) Las células MCF10A se transfectaron con CaMKK β y LKB1 como en (A) y posteriormente se trataron con TRAIL (500 ng/ml; 2h o 24h), Ionomicina (10 μ M; 24h) o Medio de privación de aminoácidos y glucosa HBSS (24h). Los niveles de P-ACC y Tubulina (control de carga) fueron analizados por inmunoblot. Los valores indican la relación P-ACC:Tubulina como porcentaje del control. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Estos datos indican que TRAIL activa a AMPK por un mecanismo independiente de estas dos conocidas quinasas de AMPK.

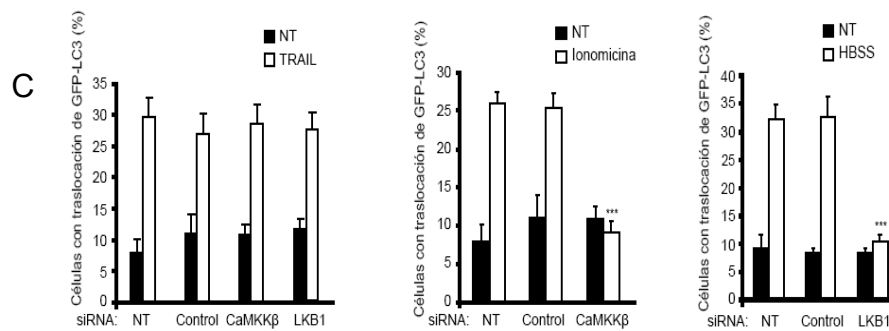


Figura 4. LKB1 y CaMKKβ no juegan ningún papel en la activación de AMPK y la autofagia inducidas por TRAIL (II).

(C) Las células se trataron como en (B) a excepción de que el tratamiento de TRAIL fueron 24h. Se analizó la traslocación de LC3. El histograma muestra los valores +/- DE de tres experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 comparado con la muestra sin transfectar tratada con TRAIL.

Es interesante destacar que TAK1, un miembro de la familia MAPK quinasa quinasa activada por citoquinas, ha sido descrito recientemente como un activador de AMPK *in vitro*, sugiriendo que podría actuar como una tercera quinasa de AMPK en mamíferos (Momcilovic, Hong et al. 2006). Para investigar el posible papel de TAK1 en la activación de AMPK y autofagia inducidas por TRAIL, primero se examinó el efecto de TRAIL sobre la activación de TAK1 en células MCF10A, determinando la fosforilación de TAK1 en los residuos Thr184/187, paso esencial para la completa activación de la quinasa (Sakurai, Miyoshi et al. 2000). Así pues, se observó una rápida activación de TAK1, que se mantenía incluso a las 24 horas, y que correlacionaba con la activación de AMPK y la inhibición de mTORC1 tras el tratamiento con TRAIL (Figura 5A). Además, esta activación era dependiente de la dosis de TRAIL (Figura 5B). A continuación, se deplecionaron las células para TAK1 utilizando dos siRNAs diferentes, y se observó que cuando las células tenían niveles reducidos de TAK1, se inhibía la activación tanto de TAK1 como de AMPK y se reestablecía la activación de mTORC1 (Figura 5C). Sin embargo, en las células deficientes en AMPK, la activación de TAK1 se mantuvo tras el tratamiento con TRAIL (Figura 5D), indicando que TAK1 está por encima de AMPK en la ruta que TRAIL señala.

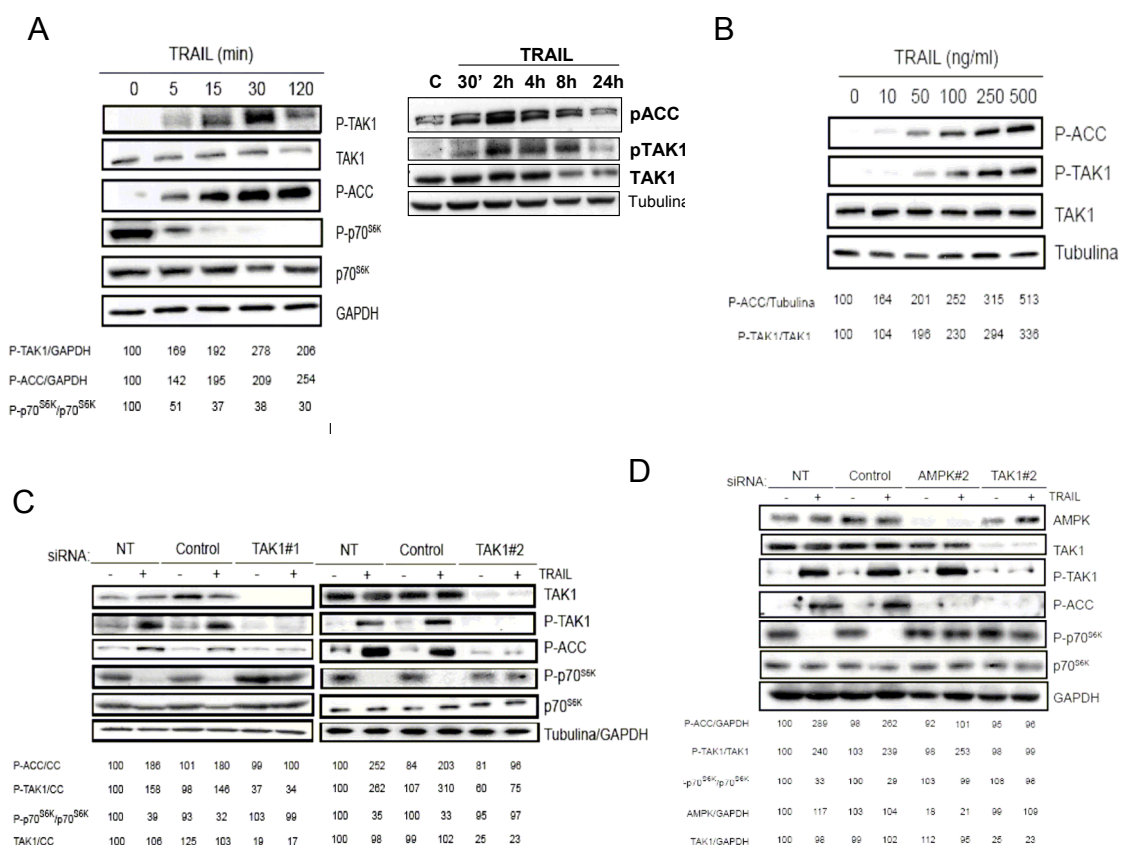


Figura 5. TAK1 media la activación de AMPK y la autofagia mediadas por TRAIL (I).

(A) Las células MCF10A sin tratar o tratadas con TRAIL (500 ng/ml) a los tiempos indicados se analizaron por Western Blot para determinar la activación de TAK1 (P-TAK1) y AMPK (P-ACC) y la inhibición de mTORC1 (P-p70^{S6K}). Los valores muestran la relación P-TAK1:GAPDH, P-ACC:GAPDH y P-p70^{S6K}:p70^{S6K} como porcentaje frente al control. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. (B) Las células tratadas con TRAIL durante 24h a las dosis indicadas fueron analizadas como en (A). Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos diferentes. (C) Las células MCF10A se transfectaron con dharmafect (NT), con un siRNA control (Control) o con dos siRNAs diferentes frente a TAK1 durante 48h, tras lo cual se trataron o no con TRAIL (500 ng/ml) durante 2h. Las proteínas totales se analizaron por inmunoblot para determinar los niveles de TAK1, P-TAK1, P-ACC, P-p70^{S6K}, p70^{S6K} total y Tubulina o GAPDH como control de carga (CC). Los valores muestran los ratios P-ACC:CC, P-TAK1:CC, TAK1:CC y P-p70^{S6K}:p70^{S6K} como porcentaje frente al control. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos diferentes. (D) Las células MCF10A se transfectaron con dharmafect (NT), con un siRNA control (Control) o con siRNAs frente a AMPK y a TAK1 durante 48h, tras lo cual se trataron con TRAIL 500 ng/ml durante 2h. Los niveles de AMPK, TAK1, P-TAK1, P-ACC, P-p70^{S6K}, p70^{S6K} y GAPDH como control de carga se determinaron por Western Blot. Los valores muestran la relación P-ACC:GAPDH, P-TAK1:GAPDH, P-p70^{S6K}:p70^{S6K}, AMPK:GAPDH y TAK1:GAPDH como porcentaje respecto del control. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

Además, la reducción en los niveles de TAK1 en la célula impidió la formación de autofagosomas tras el tratamiento con TRAIL pero no con Ionomicina o privación de aminoácidos (Figura 5E), indicando que TAK1 es una vía independiente de LKB1 y

CaMKK β , que media la autofagia inducida por TRAIL pero no por privación de aminoácidos o aumento en el calcio intracelular.

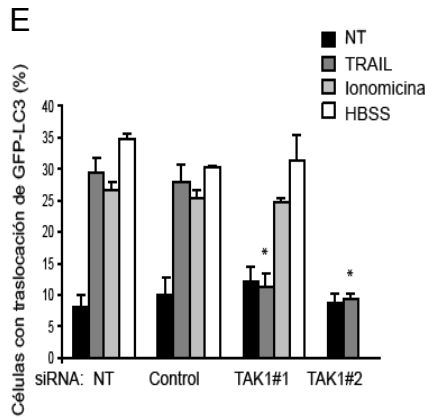


Figura 5. TAK1 media la autofagia mediada por TRAIL (II).

(E) Se transfectaron las células MCF10A como en (B) y se trataron con TRAIL (500 ng/ml; 24h), Ionicina (10 μ M; 24h) o medio de privación de glucosa y aminoácidos HBSS (24h), tras lo cual se analizaron para determinar la traslocación de LC3. El histograma muestra +/- DE de tres experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 comparado con la muestra sin transfectar tratada con TRAIL.

Con el objetivo de determinar si la capacidad de TRAIL para activar la ruta TAK1-AMPK no era un efecto específico de las células epiteliales de mama, se utilizaron otros dos modelos celulares: la línea epitelial humana de pigmento de retina hTERT-RPE1, que se transfectó establemente con eGFP-LC3, y fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), que contenían un TAK1 Δ truncado. Así pues, se observó que en ambos modelos, la depleción de TAK1 por siRNA (RPE1) o la presencia de un TAK1 inactivo (MEFs), impidió la activación de AMPK por TRAIL (Figuras 5F y 5G, respectivamente).

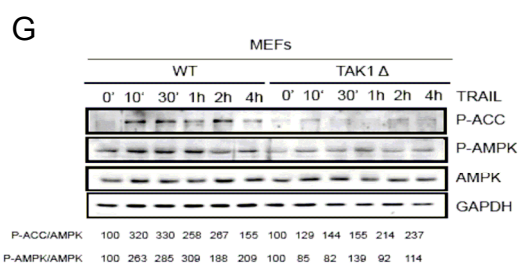
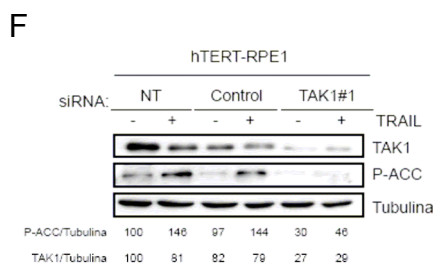


Figura 5. TAK1 media la activación de AMPK y la autofagia mediadas por TRAIL (III).

(F) Las células de pigmento de retina hTERT-RPE1 se transfectaron y trataron como en (B). Los niveles de TAK1, P-ACC y Tubulina como control de carga se determinaron por Western Blot. Los valores muestran la relación P-ACC:Tubulina y TAK1:Tubulina como porcentaje del control. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes. (G) Los fibroblastos embrionarios de ratón MEFs wild type (WT) o con TAK1 truncado (TAK1 Δ) se trataron con TRAIL (500 ng/ml) durante los tiempos indicados, y se analizaron por inmunoblot para detectar los niveles de P-ACC, P-AMPK, AMPK y GAPDH como control de carga. Los valores muestran la relación P-ACC:AMPK y P-AMPK:AMPK como porcentaje del control.

Utilizando el modelo celular RPE1-GFP-LC3, se observó que tras el tratamiento con TRAIL y Rapamicina, se indujo traslocación de GFP-LC3 a los autofagosomas (Figura 5G), así como un aumento de la relación de LC3-II respecto a LC3-I (Figura 5H), indicando que TRAIL también es capaz de inducir autofagia en otras líneas celulares normales. Además, al deplecionar estas células de pigmento de retina para TAK1, se bloqueó la autofagia inducida por TRAIL (Figura 5I), sugiriendo que TAK1 es una activador de AMPK que media la inducción de autofagia en diferentes modelos humanos no tumorales.

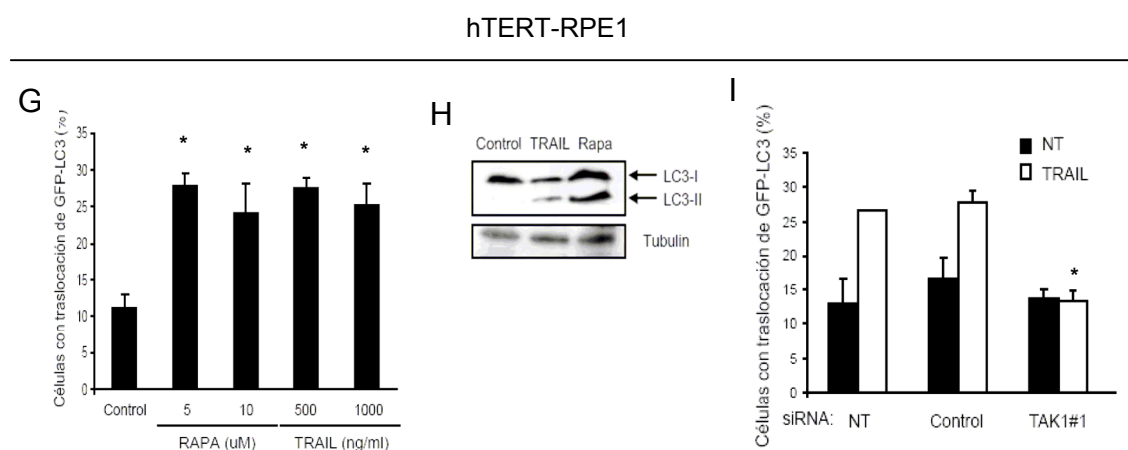


Figura 5. TAK1 media la activación de AMPK y la autofagia mediadas por TRAIL (IV).

(G) Las células RPE1 se trataron con TRAIL (500 ng/ml y 1 μ g/ml) o Rapamicina (5 y 10 μ M) durante 24h y se analizaron para determinar autofagia. El histograma muestra +/- DE de tres experimentos independientes. (H) Las células RPE1 se trataron con TRAIL (500 ng/ml) o Rapamicina (5 μ M) durante 24h y se recogieron en presencia de inhibidores de proteasas E64d y Pepstatina-A para analizar las formas LC3-I y LC3-II por Western Blot. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos diferentes. (I) Las células RPE1 se transfectaron como en (B) y se trataron con TRAIL (500 ng/ml; 24h). El histograma muestra el porcentaje de células con traslocación de LC3 +/- DE de dos experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 comparado con la muestra sin transfectar tratada con TRAIL (I) o con el control sin tratamiento (G).

4. La inducción de autofagia mediada por TRAIL requiere de los componentes del DISC.

TRAIL se une a la superficie de la membrana celular a través de los receptores TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 o TRAIL-R4, siendo TRAIL-R1 y TRAIL-R2 los receptores inductores de muerte. Así, la señalización inducida por estos receptores lleva a apoptosis pero puede resultar también en la activación de señales de supervivencia (Schaefer, Voloshanenko et al. 2007). La unión de TRAIL a los receptores inductores de muerte TRAIL-R1 y TRAIL-R2 resulta en la formación de un complejo inductor de muerte (DISC), compuesto por FADD, Caspasa-8/-10, FLIP y la quinasa RIP1 (Lin, Devin et al. 2000; Schaefer, Voloshanenko et al. 2007).

Para estudiar la posible implicación de los componentes del DISC en la autofagia inducida por TRAIL, en primer lugar se realizó un estudio de la composición del DISC en las células MCF10A. Como muestra la Figura 6A, el complejo inductor de muerte que se asocia al receptor de TRAIL cuando éste se une al mismo está formado por FLIP, FADD, Caspasa-8, RIP1 y el receptor TRAIL-R2.

A

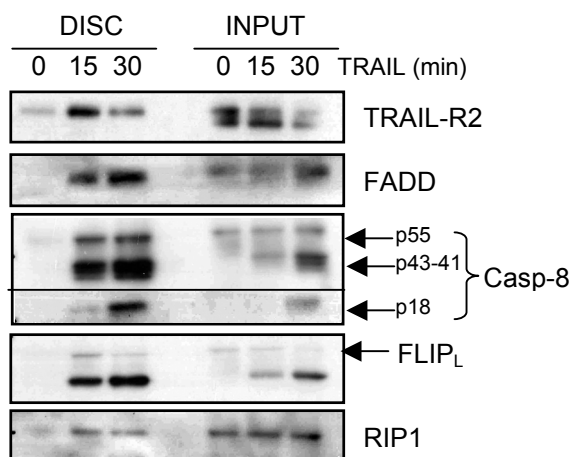


Figura 6. La inducción de autofagia mediada por TRAIL depende de los componentes del DISC (I).

(A) Las células MCF10A fueron tratadas o no con TRAIL (1 µg/ml) durante 15 o 30 minutos. El DISC se aisló como se describe en Materiales y Métodos, y sus componentes TRAIL-R2, FLIP, FADD, Caspasa-8 y RIP1 se analizaron por Western Blot. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

A continuación, se analizó la expresión de los receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2 en la superficie de las células epiteliales de mama mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron que las células MCF10A expresaban cierta cantidad de TRAIL-R2 pero no de TRAIL-R1 (Figura 6B). Con el objetivo de determinar si el receptor TRAIL-R2 estaba implicado en la señalización de autofagia mediada por TRAIL, se utilizó un anticuerpo bloqueante de la acción de TRAIL a través de dicho receptor. Para comprobar que este anticuerpo efectivamente era capaz de bloquear la acción de TRAIL mediada por TRAIL-R2, se trataron las células con Cicloheximida (CHX) para sensibilizarlas a la muerte inducida por TRAIL y se pretrataron con el anticuerpo bloqueante. Como era de esperar, el tratamiento con CHX y TRAIL indujo cerca del 100% de apoptosis tras 24 horas de tratamiento. Al utilizar el anticuerpo bloqueante de TRAIL-R2, la apoptosis se inhibió significativamente, indicando que el anticuerpo ejercía la función esperada (Figura 6C). A continuación, y utilizando este anticuerpo, se analizó el efecto del bloqueo de la acción de TRAIL-R2 en la inducción de autofagia por TRAIL, observando que la traslocación de LC3 se redujo considerablemente al bloquear TRAIL-R2 (Figura 6D), lo que indica que el mecanismo de señalización de autofagia mediado por TRAIL necesita la presencia del receptor TRAIL-R2.

Para determinar la necesidad de los componentes del DISC en la autofagia inducida por TRAIL, se deplecionaron las células MCF10A en Caspasa-8, FLIP, FADD y RIP1. Se observó que la transfección con los siRNAs efectivamente disminuyó los niveles de dichas proteínas (Figura 6E).

Debido a que los niveles de FLIP_S son casi indetectables en las células MCF10A, los niveles de FLIP_L representan la eficacia de la disminución de FLIP.

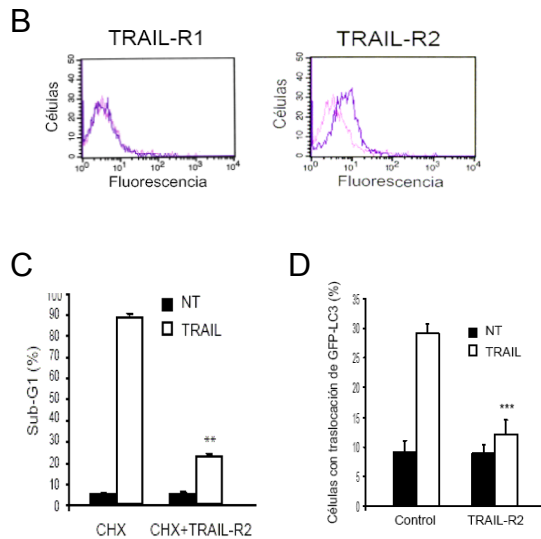


Figura 6. La inducción de autofagia mediada por TRAIL depende de los componentes del DISC (II).

(B) Los niveles de expresión de los receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2 en la superficie de células MCF10A sin tratar se determinó mediante citometría de flujo. Resultados similares se obtuvieron en cuatro experimentos independientes. **(C)** Las células MCF10A se trataron con Cicloheximida (CHX) 0.5 µg/ml o con CHX y el anticuerpo bloqueante de TRAIL-R2 (5 µg/ml) 1h antes de añadir el TRAIL (500 ng/ml; 24h). La apoptosis se determinó midiendo la población de SubG1 en el citómetro. El histograma muestra +/- DE de tres experimentos diferentes. **(D)** Las células se trataron o no con el anticuerpo bloqueante de TRAIL-R2 (5 µg/ml) 1h antes de añadirles el TRAIL (500 ng/ml; 24h). El histograma muestra la traslocación de LC3 +/- DE de cuatro experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra tratada con TRAIL (C-D).

Al tratar con TRAIL durante 24 horas las células transfectadas y analizar la autofagia mediante microscopía, se observó que la depleción de cualquiera de los componentes del DISC inhibió completamente la traslocación de LC3 inducida por TRAIL, analizado por Western blot (Figura 6E). Estos datos sugieren que la formación del DISC se requiere para que TRAIL induzca la formación del autofagosoma.

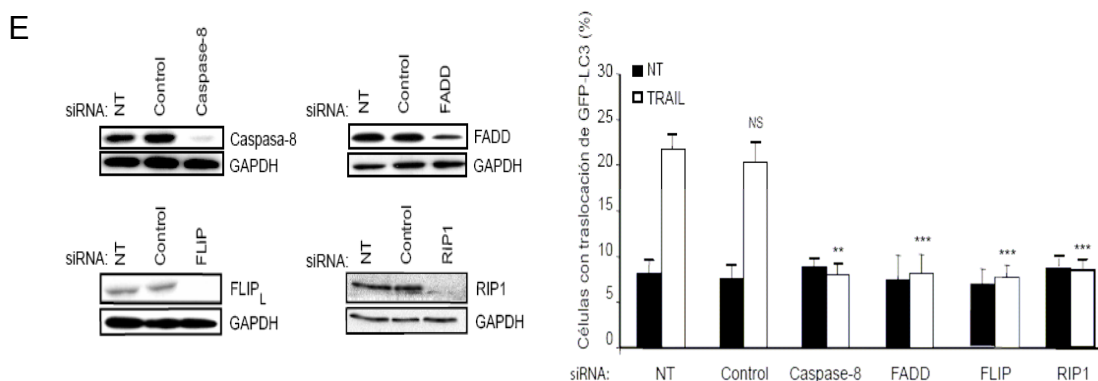


Figura 6. La inducción de autofagia mediada por TRAIL depende de los componentes del DISC (III).

(E) Las células MCF10A se transfectaron con dharmafect (NT), un siRNA control (Control) o siRNAs frente a Caspasa-8, FADD o RIP1 durante 48h o frente a FLIP durante 24h. A continuación, se añadieron 500 ng/ml de TRAIL durante 24h. Los niveles de expresión de las proteínas Caspasa-8, FADD, FLIP, RIP1 y GAPDH como control de carga se determinaron por Western Blot. Similares resultados se obtuvieron en cuatro experimentos distintos. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra tratada con TRAIL.

A consecuencia de la formación del DISC, se produce el procesamiento de la pro-caspasa-8 (p55) a las formas p43-41 y p18. Para saber si la actividad caspasa-8 y no sólo la proteína, era necesaria para la traslocación de LC3 inducida por TRAIL, se trataron las células con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. A pesar de que el z-VAD-fmk bloqueó totalmente el procesamiento de caspasa-8 tras el tratamiento con TRAIL (Figura 7A), no se inhibió la formación de autofagosomas (Figura 7B), por lo que, en un principio, parecía que la autofagia requería la pro-forma de caspasa-8 pero no su actividad catalítica.

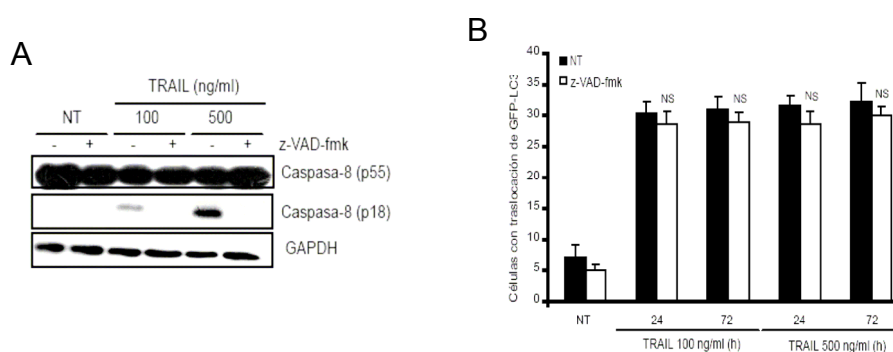


Figura 7. La inducción de autofagia mediada por TRAIL es independiente de la actividad caspasa.

(A) Las células MCF10A fueron tratadas con 50 μ M de z-VAD-fmk 1h antes de añadir el TRAIL (100 ng/ml y 500 ng/ml) durante 24h. Los lisados totales se analizaron por inmunoblot para detectar la activación de Caspasa-8, utilizando GAPDH como control de carga. Resultados parecidos se obtuvieron en dos experimentos independientes. (B) Las células se trataron como en (F) durante 24h y 72h, y se analizó la traslocación de LC3. El histograma muestra los valores +/- DE de tres experimentos independientes. NS = no significativo, comparado con la muestra tratada con TRAIL.

Considerando que los componentes del DISC son necesarios para la inducción de autofagia mediada por TRAIL, se investigó si la activación de TAK1 y de AMPK eran dependientes de caspasa-8, FADD, FLIP o RIP1. Para ello, se deplecionaron dichas proteínas mediante siRNA y se observó que las células deficientes en Caspasa-8 y FADD no indujeron activación de TAK1 ni de AMPK (analizado por P-TAK1 y P-ACC, respectivamente), mientras que el déficit de FLIP o RIP1 no afectó a la activación de ambas quinasas tras 2 horas de tratamiento con TRAIL (Figura 8). Estos datos sugieren que la ruta de señalización de autofagia mediada por TRAIL requiere la

formación del DISC, en el que Caspasa-8 y FADD son necesarios para que se active la vía TAK1-AMPK, que finalmente llevará a la inhibición de mTOR y a la autofagia.

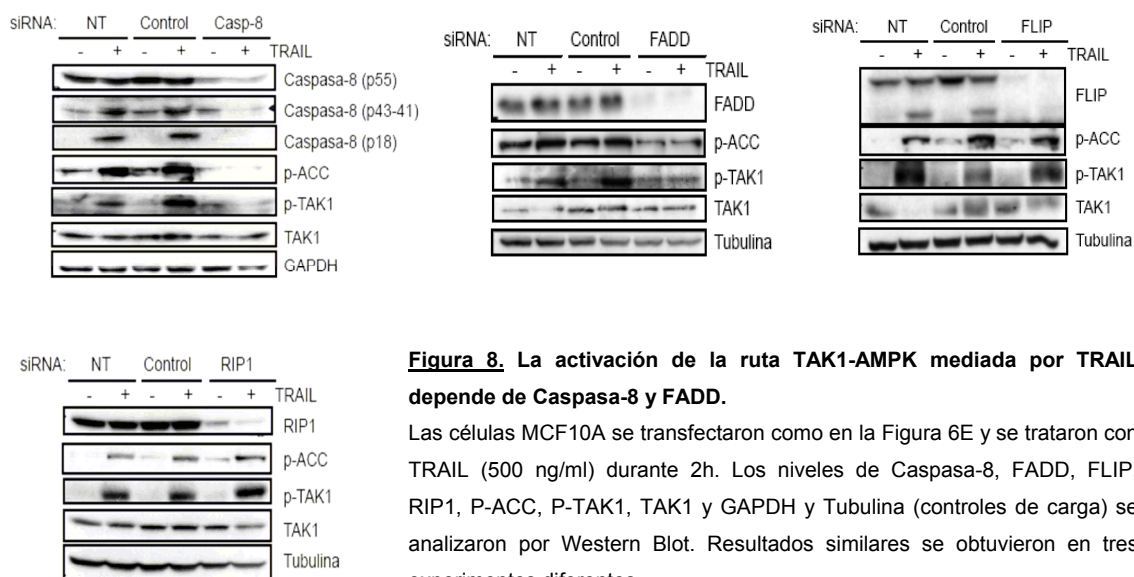


Figura 8. La activación de la ruta TAK1-AMPK mediada por TRAIL depende de Caspasa-8 y FADD.

Las células MCF10A se transfectaron como en la Figura 6E y se trataron con TRAIL (500 ng/ml) durante 2h. Los niveles de Caspasa-8, FADD, FLIP, RIP1, P-ACC, P-TAK1, TAK1 y GAPDH y Tubulina (controles de carga) se analizaron por Western Blot. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos diferentes.

5. Una ruta alternativa: la vía de JNK.

El hecho de que la activación de TAK1 y AMPK necesitara la presencia de Caspasa-8, pero que la autofagia fuera independiente de actividad caspasa, nos llevó a mirar si la actividad caspasa era necesaria para activar a AMPK. Para ello, se trataron las células MCF10A con z-VAD-fmk una hora antes de añadir el TRAIL durante 2 horas, y se observó que cuando la actividad de las caspasas en general estaba inhibida, TRAIL no era capaz de activar a AMPK (Figura 9A), lo que indica que la activación de la ruta TAK1-AMPK requiere actividad caspasa.

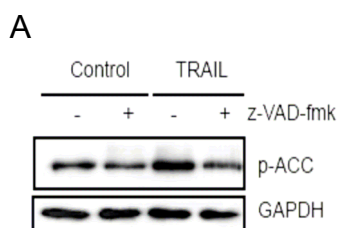


Figura 9. TRAIL induce una ruta de autofagia independiente de TAK1-AMPK-mTOR y caspasas (I).

(A) Las células MCF10A se trataron con 50 μ M de z-VAD-fmk 1h antes de añadir el TRAIL a 500 ng/ml durante 2h. La activación de AMPK se detectó mediante P-ACC, utilizando GAPDH como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Igualmente, se determinó el requerimiento de actividad caspasa para la inhibición de mTOR en células tratadas con TRAIL. Así pues, se realizó siRNA de TAK1 en las células MCF10A tratándolas o no con z-VAD-fmk, y se observó que tras 2 horas de tratamiento con TRAIL, en las células sin z-VAD-fmk, la inhibición de mTORC1 (analizada por la fosforilación de p70^{S6K}), fue dependiente de TAK1, mientras que en presencia del inhibidor general de caspasas, TRAIL no fue capaz de disminuir los niveles de la P-p70^{S6K} (Figura 9B). Estos datos, junto con los mostrados en la Figura 7B, sugieren que TRAIL está induciendo la activación de una ruta alternativa de señalización hacia autofagia, independiente de la actividad caspasa y de mTOR.

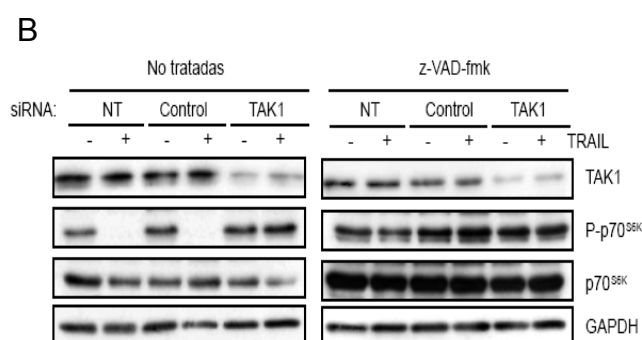


Figura 9. TRAIL induce una ruta de autofagia independiente de TAK1-AMPK-mTOR y caspasas (II).

(B) Las células MCF10A se transfectaron con dharmafect (NT), un siRNA control (Control) o siRNAs frente a TAK1#1 durante 48h. Se trataron con 50 μ M de z-VAD-fmk 1h antes de añadirles 500 ng/ml de TRAIL durante 2h. Los niveles de TAK1, P-p70^{S6K}, p70^{S6K} total y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

¿Qué otras rutas podía estar activando TRAIL? Se ha descrito que TRAIL activa distintas rutas, entre ellas la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) (Muhlenbeck, Haas et al. 1998; Hu, Johnson et al. 1999; Herr, Posovszky et al. 2000; Falschlehner, Emmerich et al. 2007). Con el objetivo de estudiar la ruta alternativa de autofagia que estaba induciendo TRAIL en el modelo epitelial de mama, en primer lugar se hizo una cinética de activación de JNK para comprobar si TRAIL era capaz de activar dicha quinasa así como los tiempos a los que esto ocurría. Como se muestra en la Figura 10A, JNK se fosforila claramente por TRAIL a las 2 horas de tratamiento. Utilizando este tiempo, se pretrataron las células con z-VAD-fmk para determinar si la activación de JNK era dependiente o no de las caspasas. Se observó que JNK mantenía su activación inducida por TRAIL a pesar de que la actividad caspasa estuviera bloqueada (Figura 10B), indicando que TRAIL estaba induciendo la activación de JNK independientemente de la actividad caspasa, por lo que parecía ser una ruta alternativa a TAK1-AMPK-mTOR. Por otro lado, se analizó el efecto del inhibidor específico de JNK, SP600125, un inhibidor competitivo reversible de ATP que inhibe selectivamente la fosforilación de c-Jun (Bennett, Sasaki et al. 2001; Han, Boyle et al. 2001), y se observó que efectivamente bloqueaba la activación de JNK inducida por TRAIL tras 2 horas de tratamiento (Figura 10C).

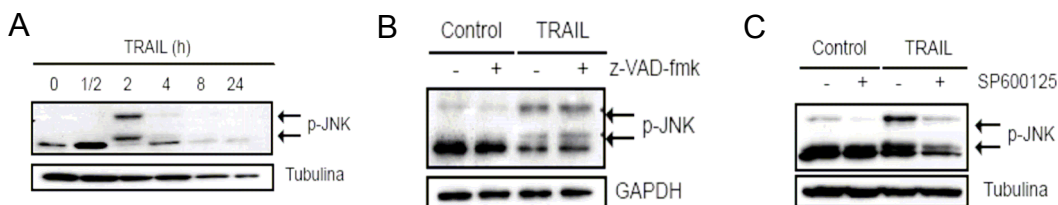


Figura 10-1. TRAIL activa JNK independientemente de caspasas.

(A) Las células MCF10A se trataron con TRAIL 500 ng/ml durante los tiempos indicados para analizar la fosforilación de JNK mediante Western Blot. Se utilizó Tubulina como control de carga. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. (B) Las células sin tratar o tratadas con TRAIL (500 ng/ml; 2h) se pretrataron con 50 μ M de z-VAD-fmk 1h antes. Los niveles de expresión de P-JNK y GAPDH como control de carga se detectaron por inmunoblot, obteniendo resultados parecidos en dos experimentos diferentes. (C) Las células se trataron con 20 μ M de SP600125 1h antes de añadir el TRAIL (500 ng/ml; 2h). La activación de JNK se analizó mediante Western Blot, utilizando Tubulina como control de carga. Estos resultados se reprodujeron en dos experimentos independientes.

Para conocer la posible implicación de JNK en autofagia, se llevó a cabo un ensayo de traslocación de LC3 tratando a las células con TRAIL en presencia o no de z-VAD-fmk y/o SP600125. Los resultados que se obtuvieron mostraron que la inhibición de cualquiera de las rutas (TAK1-AMPK-mTOR o JNK) por separado no prevenía la inducción de autofagia por TRAIL en las células MCF10A. Sin embargo, el bloqueo simultáneo de ambas rutas disminuyó significativamente la formación de autofagosomas inducida por TRAIL (Figura 10D). Estos datos sugieren que TRAIL está activando dos rutas diferentes para señalizar a autofagia, y que ambas son suficientes e independientes para la inducción del proceso autofágico.

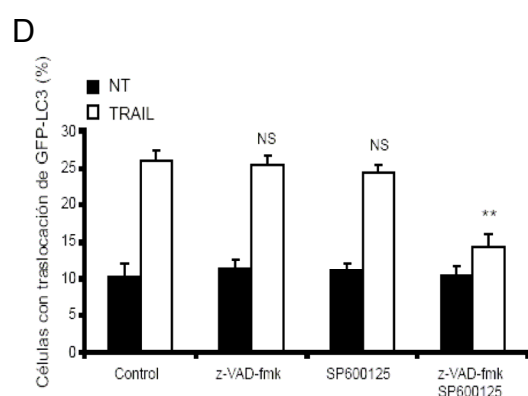


Figura 10-2. La activación de autofagia por TRAIL depende de la actividad caspasa y de la activación de JNK.

(D) Las células MCF10A se trataron con 50 μ M de z-VAD-fmk y/o 20 μ M de SP600125 1h antes de añadirles el TRAIL (500 ng/ml; 24h). La traslocación de LC3 se analizó por microscopía. El histograma muestra los valores +/- DE de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS = no significativo, comparado con la muestra tratada con TRAIL.

Finalmente, se estudiaron los requerimientos de los componentes del DISC implicados en la activación de JNK mediada por TRAIL. Para ello, se deplecionaron las células para las proteínas del DISC (Caspasa-8, FADD, FLIP y RIP1), y se trataron con TRAIL durante 2 horas. Como se observa en la Figura 10E, la activación de JNK requiere la presencia de FADD y de RIP1 pero no de Caspasa-8 ni FLIP. Estos datos concuerdan con resultados descritos previamente (Lin, Devin et al. 2000). No obstante, aún queda por determinar la señalización que lleva a autofagia tras la activación de JNK mediada por TRAIL.

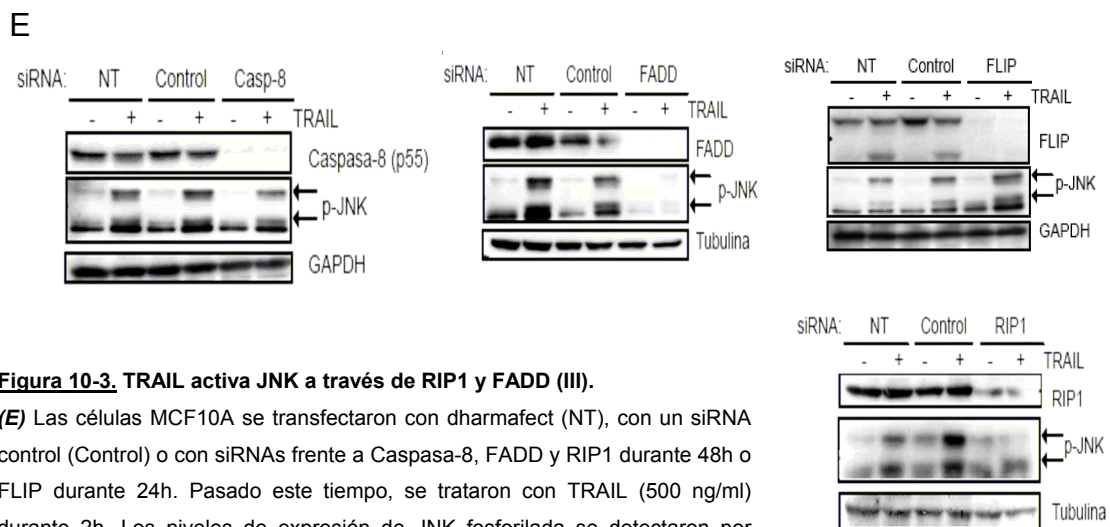


Figura 10-3. TRAIL activa JNK a través de RIP1 y FADD (III).

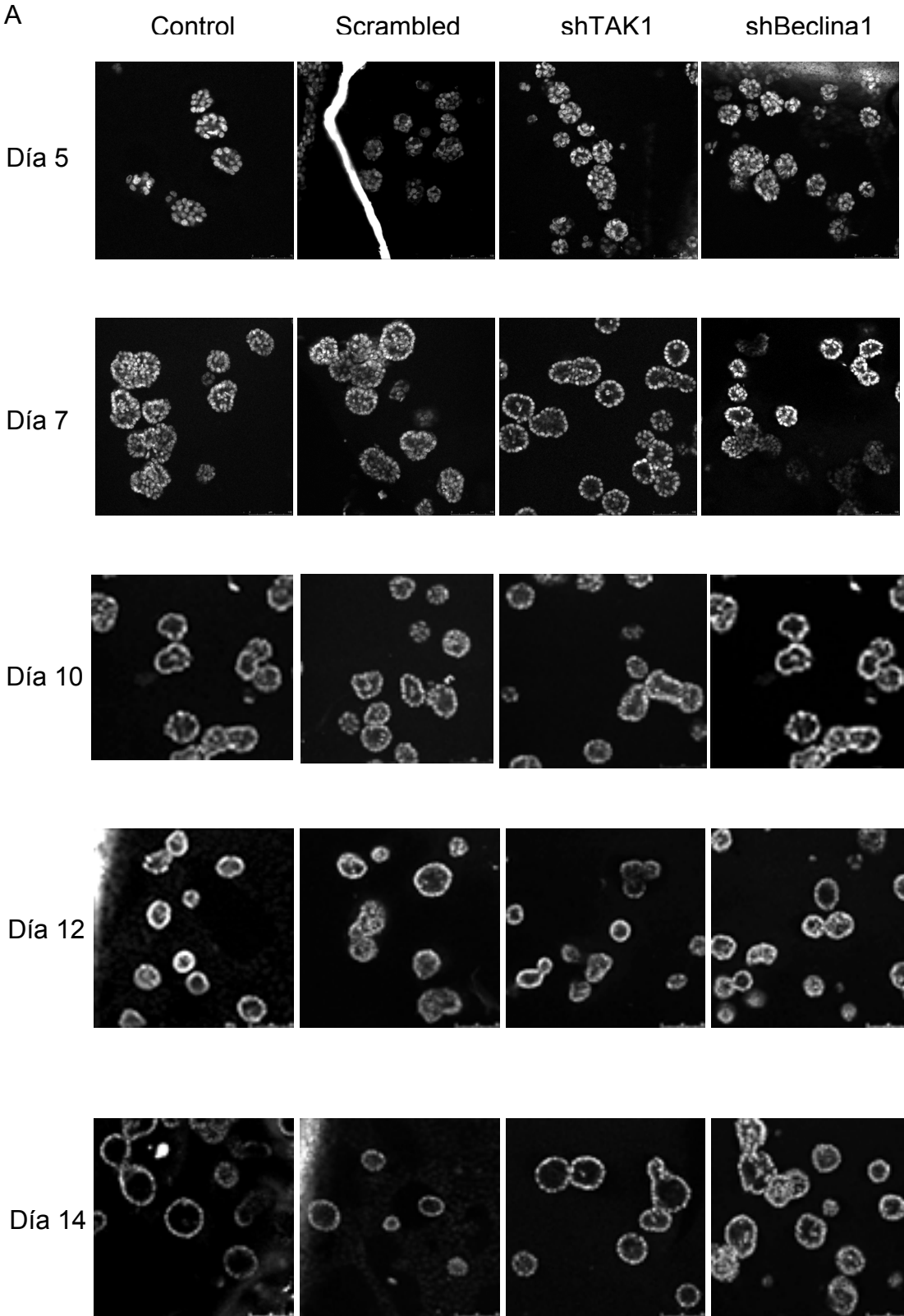
(E) Las células MCF10A se transfectoron con dharmafect (NT), con un siRNA control (Control) o con siRNAs frente a Caspasa-8, FADD y RIP1 durante 48h o FLIP durante 24h. Pasado este tiempo, se trataron con TRAIL (500 ng/ml) durante 2h. Los niveles de expresión de JNK fosforilada se detectaron por inmunoblot, utilizando GAPDH o Tubulina como controles de carga. Resultados parecidos se obtuvieron en dos experimentos independientes.

6. La autofagia juega un papel en la formación del lumen de células epiteliales de mama.

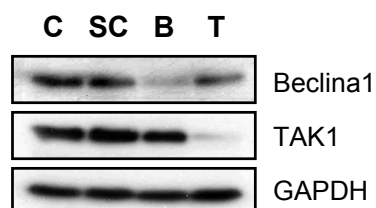
Se ha descrito recientemente que TRAIL se induce y es necesario para la formación del lumen mamario *in vitro* en células MCF10A (Mills, Reginato et al. 2004). En este mismo trabajo se describió que TRAIL inducía autofagia. También se sabe que el proceso de morfogénesis de la mama está mediado por Bim y Bmf (Reginato, Mills et al. 2005; Mailleux, Overholtzer et al. 2007; Schmelzle, Mailleux et al. 2007; Mailleux, Overholtzer et al. 2008). No obstante, no está claro el papel de la autofagia en la formación del lumen. Con la intención de aportar nuevos datos sobre este hecho, se crearon líneas estables de células MCF10A con niveles disminuidos de las proteínas TAK1 o Beclina1, mediante infecciones lentivirales con shRNAs (Figura 11B). Como control, se infectaron las células con lentivirus que expresan una secuencia aleatoria no interfiriente (scrambled). Con estas líneas, se cultivaron las células en matrigel para reproducir los ensayos de morfogénesis que se habían descrito previamente en células MCF10A (Debnath, Muthuswamy et al. 2003; Debnath

and Brugge 2005). Los resultados obtenidos mostraron diferencias entre las células MCF10A sin infectar o infectadas con la secuencia no interfiriente y las células MCF10A que tenían silenciadas las proteínas TAK1 o Beclina1, produciéndose una aceleración del proceso de formación del lumen de los acinos, efecto que se hizo más notable en los primeros días (Figuras 11A y C). Así pues, como muestran las imágenes de la Figura 11A, cuya cuantificación se representa en la Figura 11C, los acinos que formaban las células MCF10A-shRNA-TAK1 o MCF10A-shRNA-Beclina1, se vaciaron más rápidamente que los de las células MCF10A o MCF10A-shRNA-Scrambled. Estos datos pueden sugerir que la autofagia inducida por TRAIL a través de la ruta de TAK1-AMPK-mTOR está jugando algún papel en la formación del lumen, posiblemente mediante el bloqueo de la apoptosis. Sin embargo, hacen falta más estudios para esclarecer la relación entre TRAIL, autofagia y el proceso de vaciamiento de los acinos durante la morfogénesis.

Figura 11



B



C

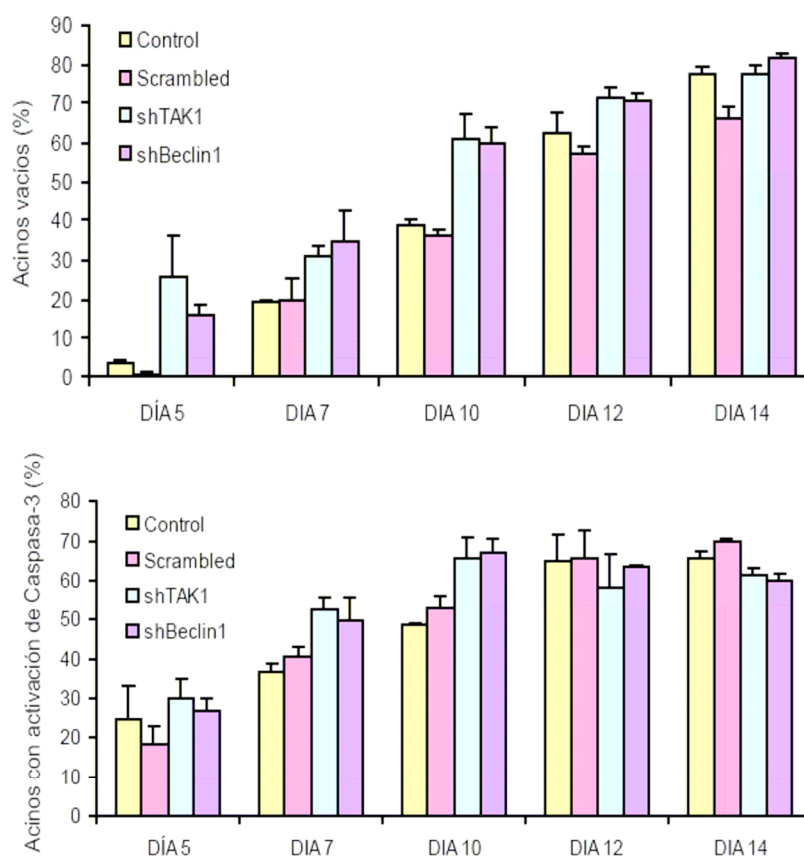


Figura 11. La autofagia juega un papel en la formación del lumen de MCF10A.

(A) Las líneas celulares estables creadas mediante infecciones lentivirales con shRNA-Scrambled, shRNA-TAK1 y shRNA-Beclina1, así como su control sin infectar, se sembraron en matrigel para llevar a cabo un ensayo de morfogénesis tal como se describe en Materiales y Métodos. El ensayo duró 14 días, recogiendo muestras en los días 5, 7, 10, 12 y 14 del proceso. Dichas muestras se fijaron y analizaron por microscopía para estudiar la formación de los acinos así como el proceso de vaciamiento de los mismos. Las imágenes muestran los núcleos teñidos con DAPI en las distintas etapas del proceso. (B) Los niveles de proteínas de TAK1 (T) y Beclina1 (B) se detectaron mediante Western Blot en las líneas estables infectadas con shRNAs tras realizar el sorting. C: Control; SC: Scrambled. (C) Para cuantificar los resultados obtenidos se contaron un mínimo de 100 acinos por punto, cuantificando tanto el vaciamiento (panel superior) como la activación de Caspasa-3 (panel inferior). Se consideraron acinos vacíos aquellos que contenían 4 células o menos en su interior.

Parte II: La transformación oncogénica bloquea la autofagia inducida por TRAIL.

1. La transformación oncogénica bloquea la señal de autofagia y sensibiliza a apoptosis.

Un alto porcentaje de tumores humanos de mama, ovario y próstata tienen un solo alelo del gen de autofagia beclina1. Además, se ha observado un incremento en la formación de tumores en ratones beclina1^{+/-}. Estos datos sugieren que beclina1 y autofagia podrían jugar algún papel en la supresión de tumores (Degenhardt, Mathew et al. 2006; Jin and White 2007). Además, se sabe que defectos en la autofagia en células tumorales, bien por contener un solo alelo de beclina1 o por otros factores, favorece la tumorigénesis (Edinger and Thompson 2003; Degenhardt, Mathew et al. 2006; Mathew, Kongara et al. 2007). Dado que las células tumorales de mama MCF7 contienen un único alelo de beclina1 (Liang, Jackson et al. 1999), se decidió estudiar si TRAIL era capaz de inducir la formación de autofagosomas en un modelo tumoral. Para ello, se utilizó la línea celular MCF7 establemente transfectada con GFP-LC3 y se trató con TRAIL y Rapamicina a distintas dosis y tiempos, como se indica en la Figura 12A. Los resultados mostraron que Rapamicina era capaz de provocar la traslocación de LC3 a la membrana del autofagosoma, ratificando datos publicados con anterioridad, en los que las células MCF7 son capaces de inducir autofagia tras numerosos estímulos como Rapamicina, agentes movilizadores de calcio, análogos de la vitamina D, etc (Hoyer-Hansen, Bastholm et al. 2005; Hoyer-Hansen, Bastholm et al. 2007). En cambio, TRAIL no fue capaz de inducir autofagia de manera significativa en estas células. Estos datos muestran una diferencia en la capacidad de TRAIL para inducir autofagia entre células normales y tumorales de mama, ya que, como se ha

descrito previamente en nuestro laboratorio, TRAIL induce apoptosis en las células MCF7 (Ruiz de Almodovar, Ruiz-Ruiz et al. 2001).

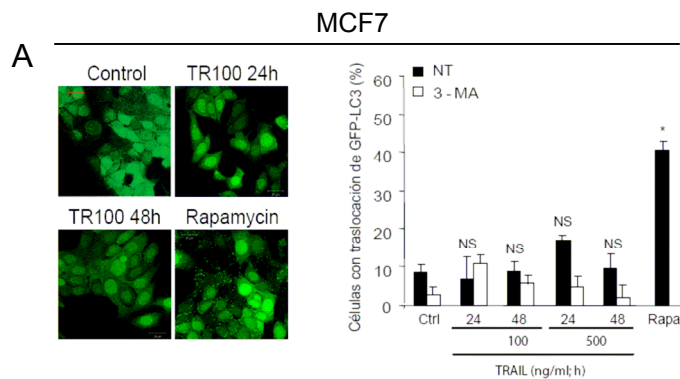


Figura 12. La transformación bloquea la autofagia inducida por TRAIL (I).

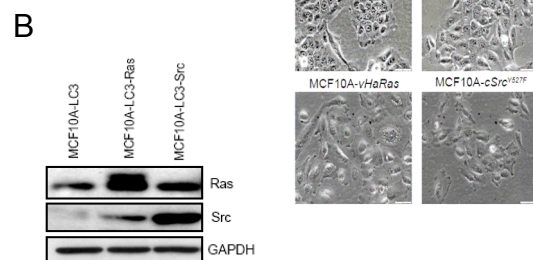
(A) Las células MCF7-GFP-LC3 se trataron con TRAIL (100 ng/ml o 500 ng/ml; 24h o 48h) o Rapamicina (5 μ M; 24h). Una hora antes de añadir el TRAIL, se incubaron con 10 mM de 3-MA. La traslocación de LC3 a los autofagosomas se determinó contando células con un patrón punteado (imagen). El histograma muestra los valores \pm DE de tres experimentos independientes. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra control (A).

El histograma muestra los valores \pm DE de tres experimentos independientes. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra control (A).

Para determinar si esta carencia de efecto de TRAIL en autofagia era una peculiaridad de esta línea o reflejaba que la transformación mediada por oncogenes era la responsable del bloqueo de la autofagia inducida por TRAIL, se obtuvieron las células MCF10A-GFP-LC3 transformadas con los oncogenes *v-Ha-Ras* o *c-Src*^{Y527F}, tal como se explica en los Materiales y Métodos. Como control se utilizaron las células MCF10A-GFP-LC3 infectadas con un vector vacío (*pBabeHygro*). El éxito de la transformación se verificó mediante Western Blot para detectar los niveles de Ras y Src, y evaluando la morfología celular con un microscopio de contraste de fase (Figura 12B).

Figura 12. La transformación bloquea la autofagia inducida por TRAIL (II).

(B) La expresión de los oncogenes Ras y Src se determinó en células MCF10A-GFP-LC3 infectadas con dichos oncogenes mediante Western Blot. Se utilizó GAPDH como control de carga. Además se muestran fotografías en contraste de fase, donde se observa el cambio de morfología que la transformación produce en las células.



Del mismo modo que ocurría en las MCF7, TRAIL no indujo traslocación de LC3 ni en las células MCF10A-Ras ni en las MCF10A-Src (Figura 12C) a distintos tiempos y dosis de tratamiento (Figura 12D). Sin embargo, esto no se debía a un bloqueo general de la maquinaria de autofagia, ya que las células eran capaces de responder al tratamiento con Rapamicina (Figura 12C).

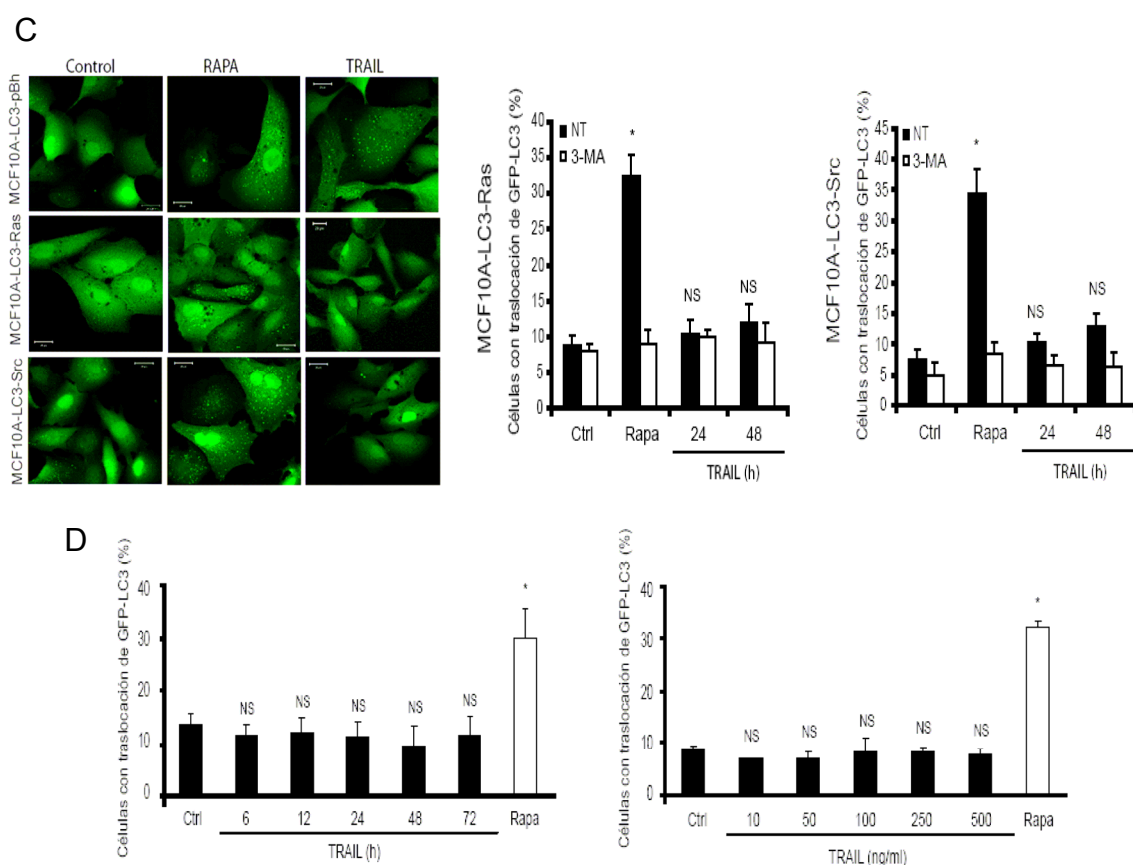


Figura 12. La transformación bloquea la autofagia inducida por TRAIL (III).

(C) Las células infectadas como en (B) se pretrataron con 10 mM de 3-MA 1h antes de añadir el TRAIL (500 ng/ml) o Rapamicina (5 μ M) durante 24h. La imagen muestra la traslocación de LC3, cuyos valores +/- DE de tres experimentos independientes están reflejados en el histograma. (D) Las células MCF10A-GFP-LC3-Ras fueron tratadas TRAIL a las dosis y tiempos indicados, o con Rapamicina 5 μ M durante 24h. Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra control (D), o con las células sin tratar (C).

Dado que TRAIL induce selectivamente apoptosis en células tumorales, se determinó la capacidad de TRAIL de inducir apoptosis en las células MCF10A transformadas. Efectivamente, TRAIL indujo apoptosis en las células transformadas

MCF10A-Ras pero no en las células normales MCF10A (Figura 13). Así pues, la transformación oncogénica parecía estar bloqueando la señalización hacia autofagia, y sensibilizando a las células de alguna manera hacia apoptosis.

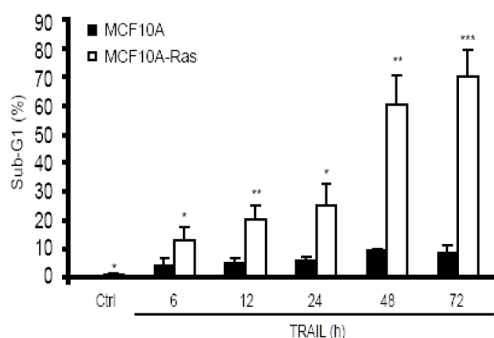


Figura 13. La transformación sensibiliza a la apoptosis .

Las células MCF10A-GFP-LC3-Ras fueron tratadas TRAIL a las dosis y tiempos indicados, o con Rapamicina 5 μ M durante 24h. Los histogramas muestran los valores \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS = no significativo, comparado con la muestra control.

Para confirmar que el oncogén Ras estaba directamente involucrado en la resistencia a autofagia de las células MCF10A-Ras, se bloqueó la actividad farnesiltransferasa, responsable de la farnesilación y activación de Ras, con el inhibidor específico BMS1 (Lackner, Kindt et al. 2005). Esta modificación es esencial para que el oncogén Ras funcione constitutivamente como transductor de señales (Crul, de Klerk et al. 2001). El cotratamiento con el inhibidor de la farnesiltransferasa reestableció la capacidad de las células MCF10A para formar autofagosomas tras el tratamiento con TRAIL (Figura 14). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión del oncogén Ras es suficiente para hacer a las células MCF10A resistentes a la autofagia inducida por TRAIL.

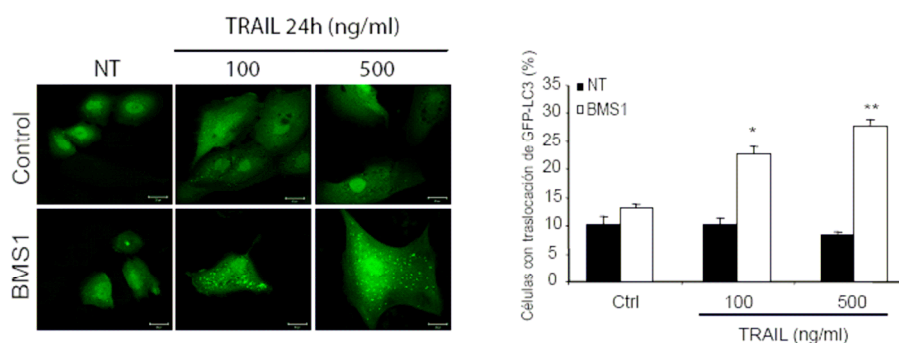


Figura 14. El bloqueo de la acción de Ras recupera la capacidad de inducir autofagia por TRAIL.

Las MCF10A-Ras fueron tratadas con el inhibidor de la farnesil transferasa BMS1 (0.5 μ M) 1h antes de añadir el TRAIL (100 o 500 ng/ml; 24h). El porcentaje de células con formación de autofagosomas se determinó cuantificando células con patrón punteado. El histograma muestra los valores \pm DE de dos experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS = no significativo, comparado con la muestra control.

2. En células transformadas por Ras, el bloqueo de la señalización de autofagia se encuentra entre AMPK y mTOR.

A continuación, nos propusimos estudiar el mecanismo por el cual el oncogén Ras bloqueaba la formación de los autofagosomas inducida por TRAIL. En primer lugar, se estudió la expresión de los receptores de TRAIL en este modelo en comparación con la expresión en la línea no transformada MCF10A. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el nivel de receptores de TRAIL tras el análisis por citometría de flujo (Figura 15A).

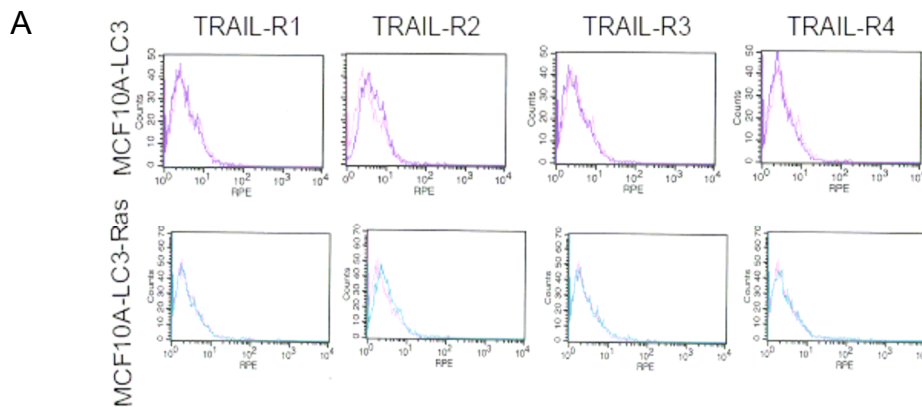


Figura 15. La transformación por Ras actúa entre AMPK y mTOR (I).

(A) Los niveles de expresión de los receptores de TRAIL en células MCF10A-GFP-LC3 y MCF10A-GFP-LC3-Ras fueron analizados mediante citometría de flujo. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Del mismo modo, el procesamiento de caspasa-8 tuvo lugar en ambas líneas celulares, indicando que el DISC se estaba formando de manera similar (Figura 15B).

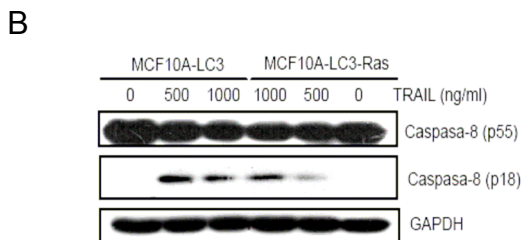


Figura 15. La transformación por Ras actúa entre AMPK y mTOR (II).

(B) La activación de Caspasa-8 en MCF10A-GFP-LC3 o MCF10A-GFP-LC3-Ras tras ser tratadas con TRAIL (500 ng/ml o 1 ug/ml; 24h) se determinó por Western Blot, utilizando GAPDH como control de carga. La figura es representativa de tres experimentos similares.

Seguidamente, se analizó la activación de la ruta AMPK-mTOR mediada por TRAIL en las células resistentes a la autofagia (MCF10A-Ras). Para ello, se trataron las células con TRAIL y AICAR como control positivo de la activación de AMPK y se analizaron los niveles de P-ACC y Tubulina. Los resultados mostraron que TRAIL era capaz de activar AMPK en células MCF10A-Ras (Figura 15C), al igual que ocurría en las células MCF10A (Figura 2B). Sin embargo, al analizar el efecto de TRAIL sobre mTORC1 en las células transformadas con Ras, se observó que, al contrario de lo que ocurría en las células normales, TRAIL no inhibió la fosforilación de la p70^{S6K} (Figura 15D). Por tanto, la transformación por Ras bloquea la autofagia inducida por TRAIL entre AMPK y mTORC1. Debido a que AMPK regula la actividad de mTORC1 a través de la vía de señalización de TSC1/2 y RHEB, estas proteínas podrían ser buenas candidatas en el estudio de la resistencia a la autofagia controlada por el oncogén Ras.

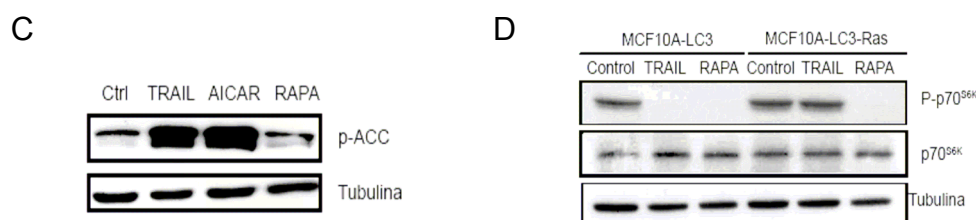
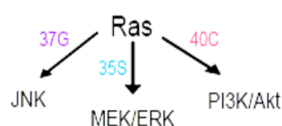


Figura 15. La transformación por Ras actúa entre AMPK y mTOR (III).

(C) Las células MCF10A-Ras fueron tratadas con TRAIL (500 ng/ml; 24h), AICAR (2 mM; 4h) como control positivo, o Rapamicina (5 μ M; 24h) como control negativo. La activación de AMPK se analizó por los niveles de fosforilación de ACC. Se utilizó Tubulina como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes. (D) El nivel de fosforilación de p70^{S6K}, la p70^{S6K} total y Tubulina como control de carga, se determinaron por inmunoblot en lisados MCF10A-GFP-LC3 y MCF10A-GFP-LC3-Ras tratadas con TRAIL (500 ng/ml) p Rapamicina (5 μ M) durante 24h. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

3. Las rutas de PI3K/Akt y MEK/Erk están implicadas en la inhibición de autofagia por TRAIL en células transformadas.

Cuando Ras se une a GTP se activa y estimula diversas rutas de señalización implicadas en el control del crecimiento celular, la supervivencia y la transformación tumoral. Entre estas rutas se encuentran la PI3K/Akt, la ruta de MAPK/ERK y Ral/JNK (Downward 1998; de Ruiter, Wolthuis et al. 2000; Mor and Philips 2006; Cully and Downward 2008). Para estudiar la posible ruta implicada en el bloqueo de la señalización de autofagia por TRAIL en las células transformadas con Ras, en primer lugar se infectaron las células MCF10A-GFP-LC3 con tres mutantes de Ras que activaban, cada uno, preferentemente una de las tres rutas para las que señala Ras. Así, el mutante 40C activa principalmente la ruta de PI3K/Akt, el mutante 35S activa Raf/MEK/ERK y el mutante 37G activa predominantemente Ral/JNK. Utilizando estos modelos, junto a las células MCF10A-GFP-LC3-pBabepuro como control de células normales, y las células MCF10A-GFP-LC3-Ras-V12 y MCF10A-GFP-LC3-vHaRas como controles de células transformadas, se realizó un estudio de traslocación de LC3. La expresión de Ras en dichos mutantes se muestra en la Figura 16A.



Debido a que los plásmidos de los mutantes tenían la misma resistencia que las células MCF10A-GFP-LC3 (puromicina), se marcaron en rojo las células que se habían infectado con Ras mediante técnicas inmunocitoquímicas. Posteriormente se cuantificó el porcentaje de células con patrón punteado en el citoplasma de aquellas células positivas en la inmunocitoquímica de Ras, observándose que en las células con el mutante donde estaba activada preferentemente la ruta Ral/JNK, TRAIL era capaz de inducir una autofagia significativa. En cambio, los mutantes en los que

estaban activadas las rutas MEK/ERK y PI3K/Akt no se observó una diferencia notable en la autofagia inducida por TRAIL (Figuras 16B y C).

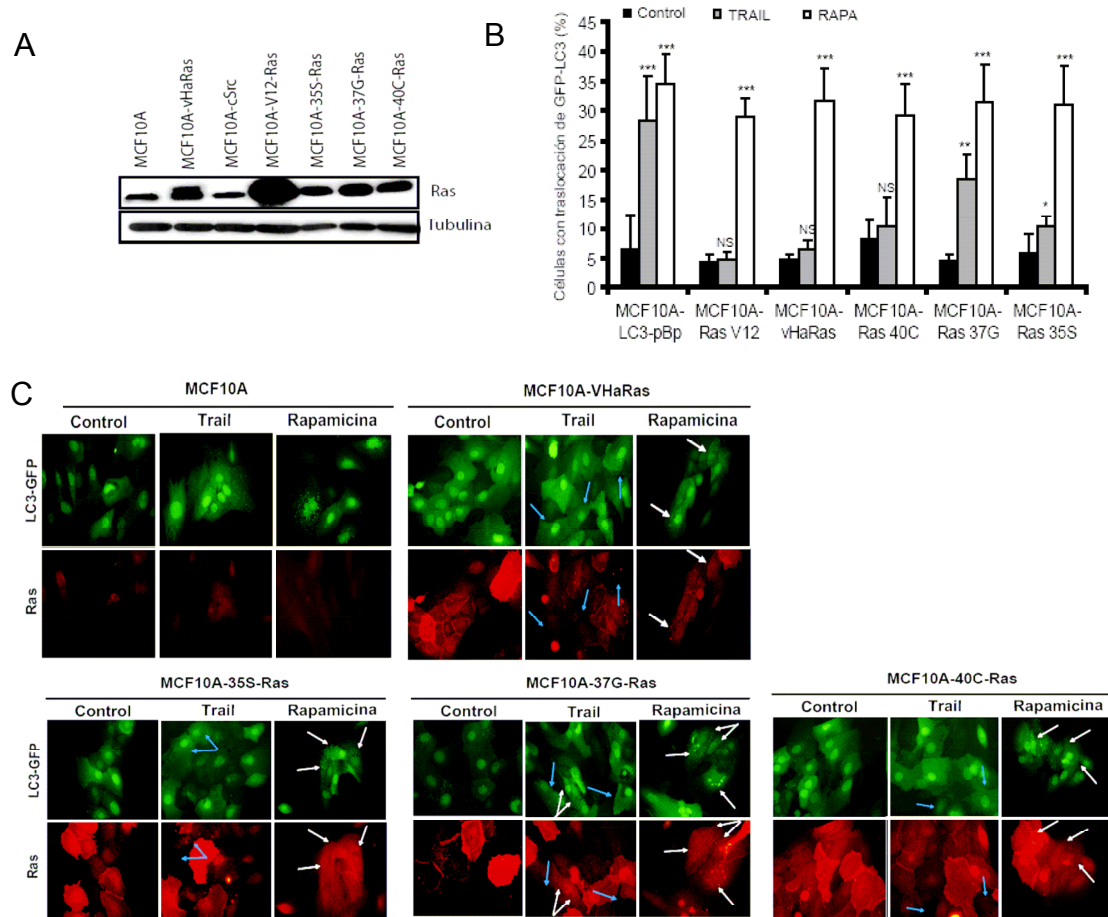


Figura 16. Las rutas de PI3K/Akt y MEK/ERK están implicadas en la inhibición de la autofagia por TRAIL en células transformadas (I).

(A) La expresión de Ras de las líneas celulares MCF10A, MCF10A-vHaRas, MCF10A-V12, MCF10A-Ras-35S, MCF10A-Ras-37G y MCF10A-Ras-40C se determinó por Western Blot, utilizando Tubulina como control de carga.

(B) Las células que expresan los oncogenes Ras (MCF10A-Ras-V12; MCF10A-vHaRas), las que expresan los mutantes de Ras (MCF10A-Ras-40C; MCF10A-Ras-37G; MCF10A-Ras-35S), así como las controles (MCF10A-LC3-pBabepuro), fueron tratadas con TRAIL (500 ng/ml) o Rapamicina (5 μ M) durante 24h. La traslocación de LC3 se analizó cuantificando las células con patrón punteado. El histograma muestra los valores \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS = no significativo, comparado con la muestra control. (C) Las células tratadas como en (B) fueron analizadas para la traslocación de LC3 (verde), que se realizó mediante captura de imágenes con el microscopio. En rojo se muestran las células teñidas con el anticuerpo anti-Ras mediante inmunocitoquímica. Las flechas azules indican células positivas para traslocación de LC3 pero que no expresan Ras. Las flechas blancas muestran células con traslocación de LC3 que además expresan el oncogén Ras.

Los mutantes de Ras utilizados en los experimentos descritos, aunque preferentemente afectaban a las rutas indicadas, pueden parcialmente actuar en otras

rutas de señalización. Por esta razón y con el objetivo de comprobar estos resultados, se llevaron a cabo estudios utilizando inhibidores farmacológicos de las tres rutas. De este modo, se trataron las células MCF10A-Ras con inhibidores de la PI3K/Akt (LY294002 y Wortmanina), de MEK/ERK (PD98059 y U0126) y de JNK (SP600125) 1 hora antes de añadir TRAIL durante 24 horas. Cuando se utilizaron los inhibidores por separado (Figura 16D), no parecía haber ningún efecto sobre la inducción de autofagia mediada por TRAIL. Sin embargo, al combinar inhibidores de las rutas PI3K/Akt y MEK/ERK, las células recuperaban la capacidad de inducir traslocación de LC3 tras el tratamiento con TRAIL (Figura 16E).

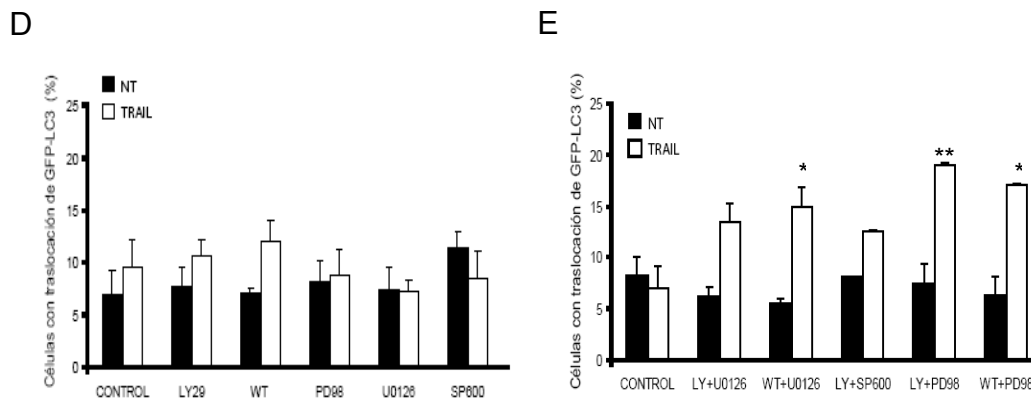


Figura 16. Las rutas de PI3K/Akt y MEK/ERK están implicadas en la inhibición de la autofagia por TRAIL en células transformadas (II).

(D y E) Las células MCF10A-vHaRas fueron tratadas con los inhibidores de PI3K/Akt: 10 μ M LY294002 (LY) o 200 nM Wortmanina (WT); de MEK/ERK: 50 μ M PD98059 (PD) o 20 μ M U0126; y de JNK: 20 μ M SP600125 (SP600) 1h antes de añadir el TRAIL (500 ng/ml; 24h) o Rapamicina (5 μ M; 24h). Los histogramas muestran los valores de traslocación de LC3 +/- DE de tres experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con las células tratadas con TRAIL (E).

Estos datos sugieren que el bloqueo de la autofagia mediado por el oncogén Ras se debe, al menos en parte, a la activación de las rutas de PI3K/Akt y MEK/ERK. Estas rutas de señalización han sido implicadas en la inhibición de autofagia por otros grupos (Furuta, Hidaka et al. 2004; Corcelle, Nebout et al. 2006; Freilinger, Rosner et al. 2008).

Parte III: Apoptosis vs. Autofagia en células de mama.

1. La autofagia inducida por TRAIL en células epiteliales de mama es un mecanismo de supervivencia.

Debido al hecho de que la autofagia funciona como una respuesta adaptativa de la célula como mecanismo de supervivencia, aunque puede también inducir muerte celular (Levine 2007), decidimos examinar si TRAIL estaba induciendo autofagia como mecanismo de muerte o de supervivencia en las células epiteliales de mama. Para ello, se realizó un ensayo de muerte celular mediante la técnica de Sytox Green, en células MCF10A. Se bloqueó la autofagia con el inhibidor 3-MA 1 hora antes de añadir el TRAIL, y se observó que a las 24 horas de tratamiento, había más de un 60 % de muerte celular (Figura 17A). Además, al deplecionar la proteína de autofagia beclina1 mediante siRNA, también se indujo muerte celular por TRAIL (Figura 17B). Estos datos demuestran que la formación de autofagosomas mediada por el ligando TRAIL es un mecanismo citoprotector.

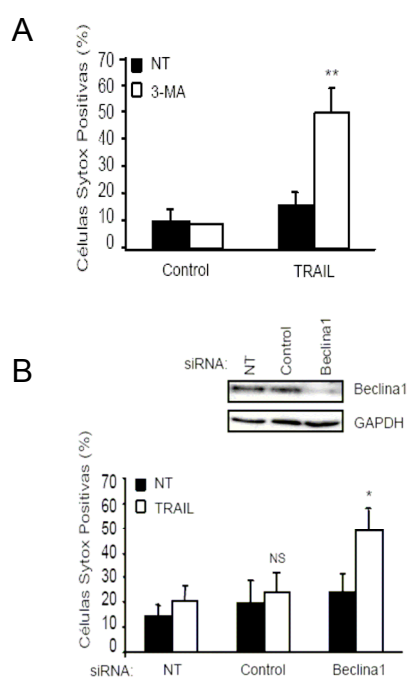


Figura 17. TRAIL induce una autofagia citoprotectora en MCF10A.

(A) Las células MCF10A fueron tratadas con 10 mM de 3-MA 1h antes de añadir el TRAIL (500 ng/ml) durante 24h. La muerte celular se determinó por el método de Sytox Green. El histograma muestra los valores +/- DE de tres experimentos independientes. (B) Las células MCF10A se transfectaron con Dharmafect (NT), con un siRNA control (Control) o con siRNA frente a Beclina1 durante 48h, tras lo cual se añadieron 500 ng/ml de TRAIL otras 24h. Los niveles de expresión de Beclina1 tras la transfección se analizaron por Western Blot, utilizando GAPDH como control de carga. La muerte celular se determinó como en (A). El histograma muestra los valores +/- DE de tres experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra tratada con 3-MA (A) o tratada con TRAIL (B).

2. La inhibición de autofagia sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por TRAIL.

Como se había descrito previamente que la inhibición de autofagia podía promover apoptosis (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005; Fung, Lock et al. 2008; Wang, Singh et al. 2008), se quiso determinar si la muerte inducida por TRAIL que se observaba cuando se bloqueaba la autofagia era apoptosis. Con este fin, se trataron las células epiteliales de mama con el inhibidor de autofagia 3-MA y se analizó la apoptosis inducida por TRAIL cuantificando la población SubG1 por citometría de flujo y la fragmentación de la cromatina mediante tinción con DAPI. Así, se observó que TRAIL sensibilizaba a la apoptosis cuando la autofagia estaba bloqueada (Figuras 18A y B).

A

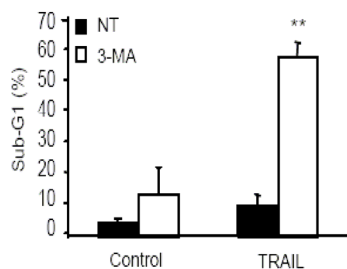
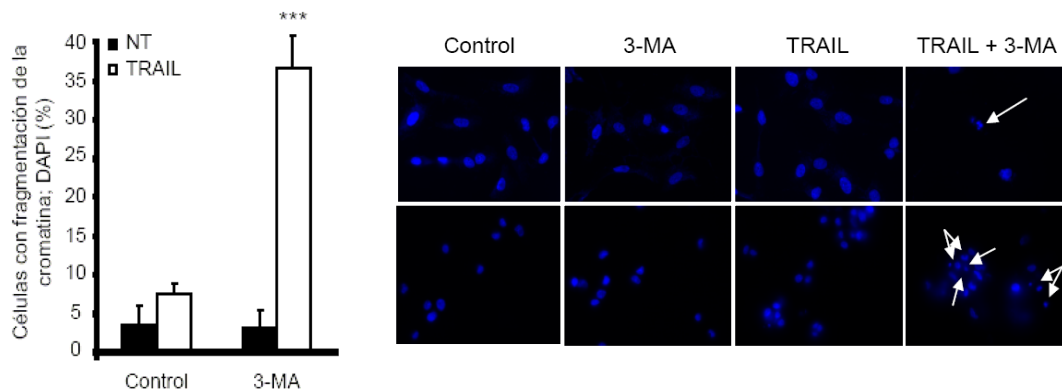


Figura 18. La inhibición de autofagia sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por TRAIL (I).

(A) Las células MCF10A se trataron con 10 mM de 3-MA 1h antes de añadir TRAIL (500 ng/ml; 24h). La apoptosis se determinó por citometría de flujo. El histograma muestra los valores +/- DE de cuatro experimentos independientes. (B) Las células tratadas como en (A) fueron teñidas con DAPI para analizar la fragmentación de la cromatina. El histograma muestra los valores +/- DE de tres experimentos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra tratada con 3-MA (A) o tratada con TRAIL (B).

B



Además, al inhibir la autofagia con siRNAs frente a Beclina1 o Atg7, también se observó un aumento en la apoptosis mediada por TRAIL en estas células (Figura

18C). Por otro lado, la disminución mediante siRNAs de la expresión de proteínas implicadas en la señalización de autofagia por TRAIL (TAK1, AMPK, FLIP o RIP1), condujo a un bloqueo en la inducción de autofagia mediada por el ligando TRAIL, y al mismo tiempo a una sensibilización a la apoptosis (Figura 18D). Es importante indicar que, en el caso de TAK1, las células tratadas con Ionomicina o bien en condiciones de privación de glucosa y aminoácidos, no se sensibilizaron a la apoptosis en ausencia de la quinasa, indicando que TAK1 está específicamente implicada en la señalización mediada por TRAIL (Figura 18D, primer panel). Estos datos sugieren que la autofagia inducida por TRAIL es responsable del bloqueo de la señalización de apoptosis.

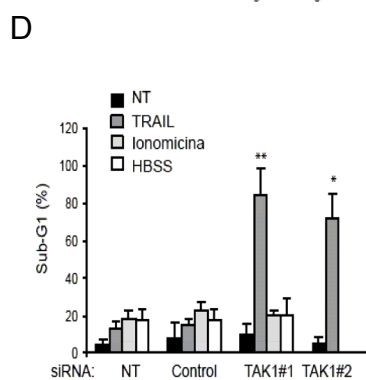
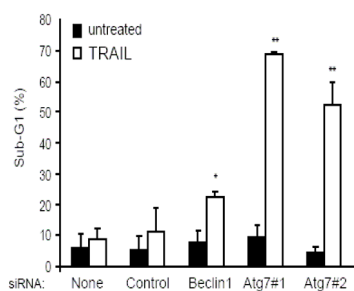
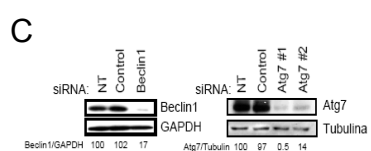
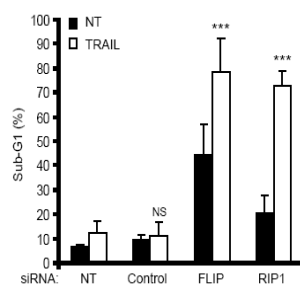
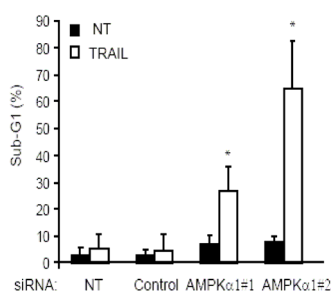


Figura 18. La inhibición de autofagia sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por TRAIL (II).

(C y D) Las células MCF10A se transfectaron con dharmafect (NT), con un siRNA control (Control) o con siRNAs frente a Beclina1 o Atg7 (C) o TAK1, AMPK, FLIP o RIP1 (D) durante 48, excepto FLIP (24h). Después, se trataron con TRAIL (500 ng/ml; 24h). El porcentaje de apoptosis se determinó como en (A). Los histogramas muestran los valores +/- DE de cuatro experimentos independientes. Los niveles de Atg7 y Beclina se determinaron mediante Western Blot. Los niveles de TAK1 y AMPK se corresponden con los de las figuras 5C y 3A respectivamente. Los niveles de FLIP y RIP1 se corresponden a los que muestran la figura 6E. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra tratada con 3-MA (A) o tratada con TRAIL.



Estos resultados se confirmaron en otros modelos no tumorales, como en células RPE1 y MEFs, donde la ausencia de la quinasa implicada en autofagia TAK1, o la presencia de una forma inactiva de la misma (en el caso de MEFs) sensibilizó a la

apoptosis inducida por TRAIL (Figuras 18E y F), indicando que es un efecto general de células normales y no sólo específico de las células epiteliales de mama MCF10A, como mecanismo citoprotector frente al ligando de muerte TRAIL.

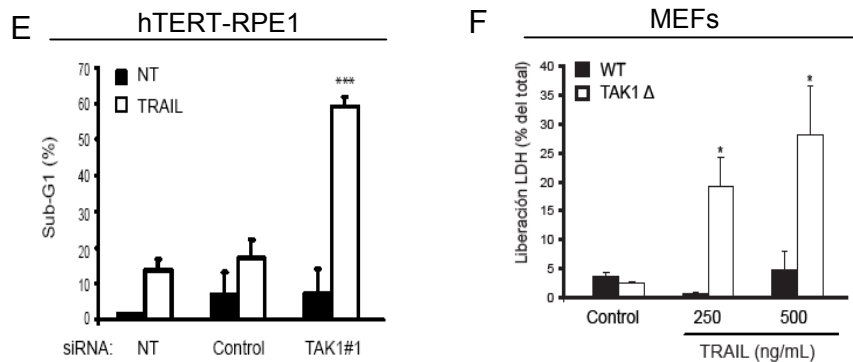


Figura 18. La inhibición de autofagia sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por TRAIL (III).

(E) Las células RPE1 se transfectaron y analizaron como en (D) frente a TAK1. El histograma muestra los valores +/- DE de cuatro experimentos independientes. Los niveles de TAK1 se corresponden con los de la figura 5F. (F) Las células MEFs con el TAK1 truncado fueron tratadas con TRAIL (250 y 500 ng/mL; 24h). La apoptosis se determinó por liberación de LDH. El histograma muestra los valores +/- SD de tres experimentos diferentes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra tratada con TRAIL (E) o con el control TAK1 truncado (F).

Para confirmar que la población en Sub-G1 correspondía a las células en apoptosis, se analizó el efecto del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. En presencia de este inhibidor, la generación de la población de Sub-G1 estaba totalmente inhibida (Figura 18G).

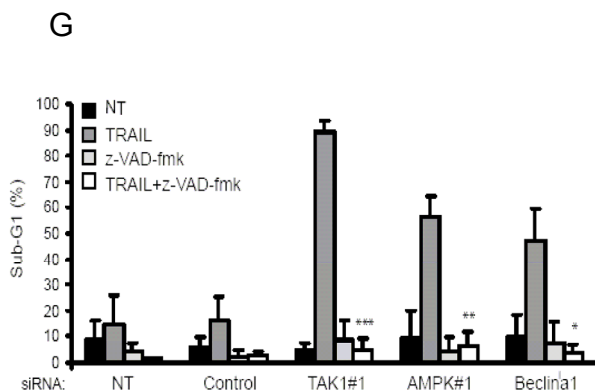


Figura 18. La inhibición de autofagia sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por TRAIL (IV).

(G) Las células MCF10A se transfectaron con dharmafect (NT), con un siRNA control (Control) o con siRNAs frente a TAK1, AMPK y Beclina1 durante 48h, tras lo cual se trataron con 50 μM de z-VAD-fmk 1h antes de añadir el TRAIL (500 ng/ml) durante 24h. La apoptosis se determinó por citometría de flujo. El histograma muestra los valores +/- DE de tres experimentos independientes. Los niveles de TAK1, AMPK y Beclina se corresponden a los mostrados en las figuras 5C, 3A, 17B, respectivamente. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra control tratada con TRAIL+z-VAD-fmk.

3. La autofagia está bloqueando la apoptosis con posterioridad a la formación del DISC.

Con la intención de profundizar en el conocimiento del mecanismo por el cual la autofagia mediada por TRAIL estaba bloqueando la apoptosis, se abordó el estudio de la vía de señalización de TRAIL que conduce a apoptosis cuando la autofagia se bloquea con 3-MA, para intentar determinar en qué punto de la ruta podían estar interconectados ambos mecanismos. TRAIL se une a sus receptores en la superficie celular para formar el complejo inductor de muerte (DISC). Sin embargo, no parecía haber ninguna diferencia entre el DISC de TRAIL cuando se pretrataba a las células con 3-MA respecto a las células sin pretratamiento (Figura 19A). No obstante, en experimentos para determinar la activación de caspasa-8 en incubaciones prolongadas con TRAIL, se observó que la activación de caspasa-8 en presencia de 3-MA era mayor que cuando la autofagia no estaba inhibida (Figura 19B).

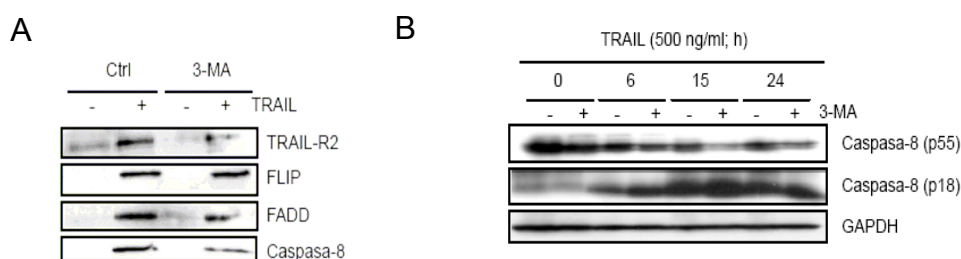


Figura 19. La autofagia bloquea la apoptosis por debajo de la formación del DISC (I).

(A) Las células MCF10A fueron tratadas o no con 10 mM de 3-MA 6h antes de añadir el TRAIL (1 ug/ml) durante 30 minutos. El DISC se aisló como se describe en Materiales y Métodos, y sus componentes TRAIL-R2, FLIP, FADD y Caspasa-8 se analizaron por Western Blot. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. (B) Las células se trataron con 10 mM de 3-MA 1h antes de añadir 500 ng/ml de TRAIL a los tiempos indicados. La activación de caspasa-8 se determinó por Western Blot, utilizando GAPDH como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

Utilizando este tiempo de tratamiento (1 hora con 3-MA y 6 horas de TRAIL), se analizó el resto de la ruta y se vio que el co-tratamiento con 3-MA y TRAIL indujo una disminución de Bid total (Figura 19C), indicando que se estaba produciendo Bid

truncado (tBid); un aumento de la activación de Caspasa-9 (Figura 19D), indicando la implicación de la mitocondria; un aumento en la activación de Caspasa-3 y en el procesamiento de PARP (Figuras 19E y F, respectivamente) y una disminución de XIAP pero no de Bcl2 (Figura 19G). Estos resultados se confirmaron en experimentos en los que TRAIL estuvo presente durante 24 horas, observándose una disminución de Bid y un aumento de la activación de las Caspasas-9 y -3 (Figuras 19C-E).

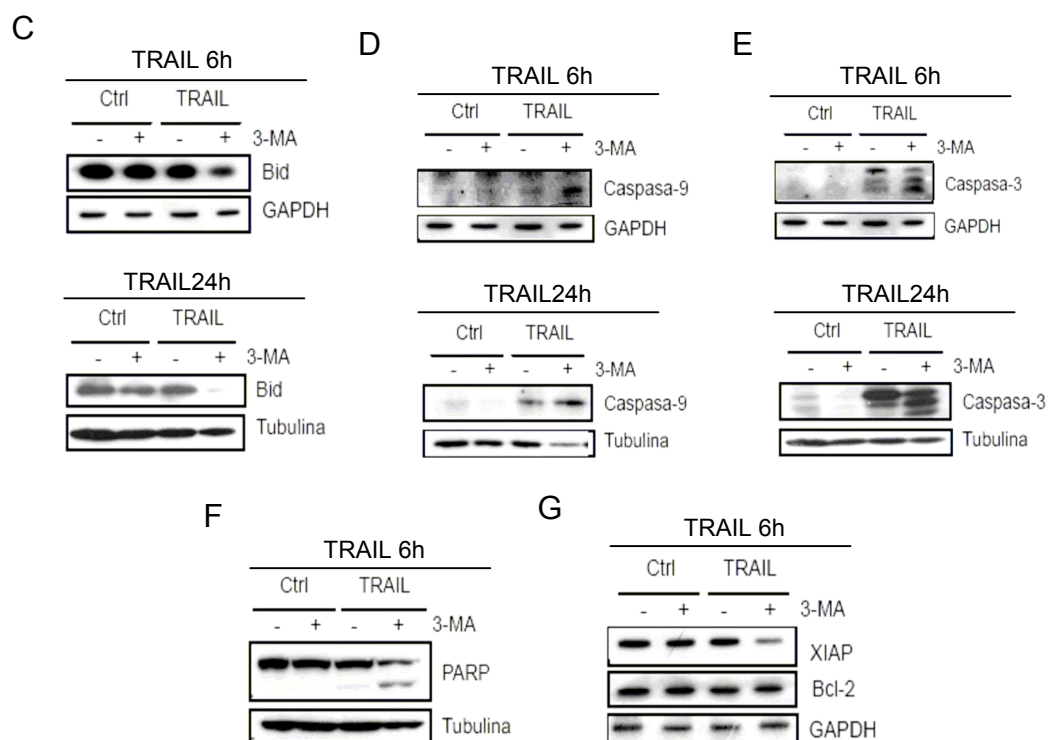


Figura 19. La autofagia bloquea la apoptosis a nivel mitocondrial (II).

(C-G) Las MCF10A se trataron con 3.MA (10 mM) 1h antes de tratarlas con TRAIL (500 ng/ml) durante 6 o 24h. Los niveles de expresión de Bid, Caspasa-9, Caspasa-3, PARP, XIAP y Bcl2 se analizaron por inmunoblot, utilizando GAPDH y Tubulina como controles de carga. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

Estos datos podrían sugerir que la autofagia está bloqueando la apoptosis a nivel postmitocondrial, manteniendo los niveles de XIAP, lo que favorece el secuestro de Caspasa-9 y Caspasa-3, evitando así la apoptosis. Así, el aumento en la activación de Caspasa-8 y la formación de tBid podrían deberse a un mecanismo de

retroalimentación mediado por la activación de Caspasa-3. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual tiene lugar este proceso queda aún por resolver.

4. Relación autofagia-apoptosis en células normales y transformadas de mama

Como se había visto, el efecto que TRAIL inducía en células normales y transformadas de mama era diferente (Figura 13), señalizando para autofagia en células epiteliales normales y para apoptosis en células transformadas (Figura 20A).

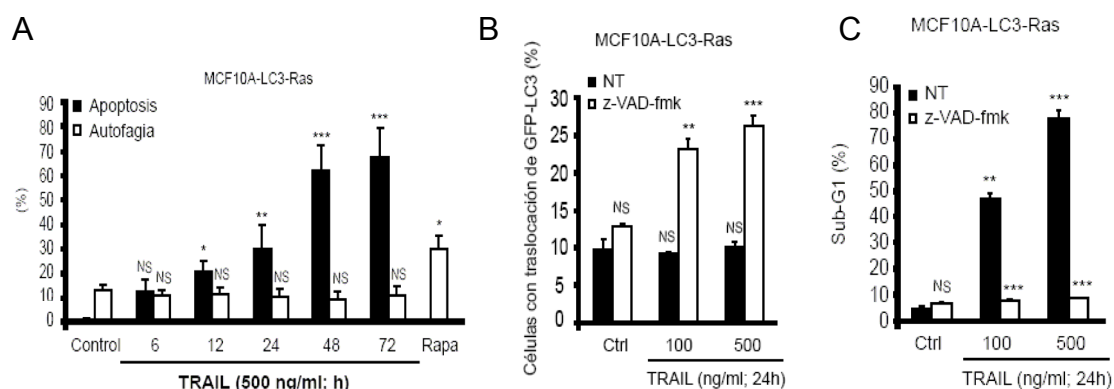


Figura 20. Relación entre apoptosis y autofagia.

(A) Las células MCF10A-Ras tratadas con TRAIL (500 ng/ml) a los tiempos indicados o con Rapamicona (5 μM) durante 24h se analizaron para determinar apoptosis y autofagia mediante citometría de flujo y traslocación de LC3, respectivamente. El histograma muestra los valores +/- DE de tres experimentos independientes. (B y C) Las células MCF10A-Ras fueron tratadas con z-VAD-fmk (50 μM) 1h antes de añadir TRAIL (500 ng/ml) durante 24h. La autofagia y la apoptosis se determinaron mediante traslocación de LC3 y citometría de flujo, (B y C respectivamente). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos diferentes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra control.

Además, cuando se bloqueaba la autofagia inducida por TRAIL en las células normales, las células se sensibilizaban a apoptosis, como se ha visto en los apartados anteriores. Asimismo, en el modelo de células transformadas por Ras se analizó la relación entre apoptosis y autofagia tras el tratamiento con TRAIL. En estas células, al

bloquear la apoptosis utilizando z-VAD-fmk, se recuperaba la capacidad de responder a TRAIL con un proceso autofágico (Figuras 20B y C).

Estos datos sugieren que apoptosis y autofagia son dos procesos estrechamente relacionados en respuesta a TRAIL y que, a pesar de que la autofagia esté inhibiendo la apoptosis, debe existir algún mecanismo por el cual la apoptosis regule el proceso de autofagia. No obstante, estudios más exhaustivos serían necesarios para aclarar esta relación.

VII. DISCUSIÓN

1. Inducción de autofagia mediada por TRAIL en células epiteliales de mama

En los últimos años, algunos estudios han apuntado que el ligando de la súperfamilia de TNF, TRAIL, es capaz de inducir autofagia en células epiteliales de mama y de próstata (Mills, Reginato et al. 2004; Thorburn, Moore et al. 2005). No obstante, hasta el momento no se conocen datos sobre los mecanismos moleculares por los que TRAIL induce la formación de autofagosomas en la célula. Los datos presentados demuestran que la formación de vacuolas autofágicas (observadas por microscopía confocal, de fluorescencia y electrónica) tras el tratamiento con TRAIL en células epiteliales de mama, es dependiente de Beclina1 y de Atg7, dos proteínas implicadas en la maquinaria de autofagia. Además, la traslocación de LC3 a la membrana de los autofagosomas se inhibe por 3-Metiladenina (3-MA), un inhibidor de la unión PI3K-III/Beclina1, ratificando que el efecto observado tras el tratamiento con TRAIL es autofagia. Por otro lado, se demuestra que el ligando de muerte TRAIL induce una autofagia funcional, ya que se aumenta la degradación de proteínas de vida media larga. Sin embargo, no se observan características de autofagia tras el tratamiento con TNF, lo que sugiere que la autofagia inducida en células epiteliales de mama no es un efecto general de los ligandos de muerte. No obstante, se ha descrito que TNF induce autofagia en linfocitos T y preadipocitos (Jia, Dourmashkin et al. 1997; Prins, Ledgerwood et al. 1998), por lo que TNF es capaz de inducir autofagia, aunque parece ser un efecto dependiente del tipo celular.

Al profundizar en el estudio de los mecanismos que llevan a TRAIL a inducir autofagia, se demuestra por primera vez que TRAIL activa a la quinasa AMPK. La relación entre la ruta AMPK-mTOR y autofagia se conoce bastante bien. Para demostrar que la activación de AMPK por TRAIL está relacionada con la inducción de

autofagia en células epiteliales de mama, se ha bloqueado la proteína AMPK mediante siRNA y se ha observado que la autofagia mediada por TRAIL se inhibe. Estos datos confirman otros datos publicados en los que el bloqueo de la actividad de AMPK por inhibidores farmacológicos (Compuesto-C) o dominantes negativos de AMPK inhiben la autofagia por privación de nutrientes y por aumento del calcio intracelular (Meley, Bauvy et al. 2006; Hoyer-Hansen, Bastholm et al. 2007). Sin embargo, a pesar de que la activación de AMPK por TRAIL induce autofagia, se ha visto que AICAR, un activador directo de AMPK, no es capaz de inducir autofagia en células epiteliales de mama (datos no mostrados). No obstante, AICAR interviene en otras rutas además de activar a AMPK. Se sabe que AICAR inhibe la ruta PI3K/Akt (Jhun, Jin et al. 2004), que a su vez es capaz de inhibir autofagia. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que AICAR inhibe autofagia a través de un mecanismo independiente de la actividad AMPK, que inhibe la PI3K-III/Beclina1, contrarrestando el efecto de AMPK de activar autofagia, y que es capaz de inhibir la degradación proteosomal mediante un mecanismo dependiente de AMPK (Viana, Aguado et al. 2008). Estudios anteriores también demuestran que AICAR inhibe autofagia en hepatocitos (Samari and Seglen 1998). Por tanto, no parece estar muy claro el efecto del activador directo de AMPK, AICAR, aunque parece que podría estar bloqueando la autofagia por mecanismos independientes de su función activadora de AMPK.

La activación de AMPK conlleva la activación del complejo TSC1/TSC2 que a su vez inhibe a la proteína Rheb, la cual activa mTOR y da lugar a la inhibición de autofagia. A pesar de que se conoce bastante bien la implicación tanto de AMPK como de mTOR en la inducción de autofagia, no hay evidencias de que TSC1/TSC2 y Rheb tengan algún papel directamente relacionado con autofagia en mamíferos. Sin embargo, estudios en *Drosophila* apoyan el papel tanto del complejo TSC1/TSC2

como de Rheb como activador e inhibidora, respectivamente, de autofagia (Scott, Schuldiner et al. 2004).

La cuestión de cómo se activa AMPK por TRAIL llevó a estudiar las quinasas de AMPK conocidas. Así pues, se demuestra que ni CaMKK β , activada por aumento en la concentración de calcio intracelular, ni LKB1, activada por un aumento en la relación AMP/ATP, son responsables de la activación de AMPK inducida por TRAIL. No obstante, se sabía que la quinasa activada por TGF- β , TAK1, era capaz de fosforilar a AMPK *in vitro* (Momcilovic, Hong et al. 2006; Xie, Zhang et al. 2006). Los datos publicados en esta tesis muestran que TAK1 activa a AMPK independientemente de CaMKK β y de LKB1. Estos datos concuerdan con datos en los que fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) deficientes en TAK1 no son capaces de activar AMPK tras estímulos con oligomicina, AICAR o metformina (Xie, Zhang et al. 2006). Sin embargo, este mismo estudio sugiere que LKB1 media la activación de AMPK por TAK1, lo cual no concuerda con nuestros datos de que TAK1 es un activador directo de AMPK, o que al menos no está mediado por ninguna de las otras dos quinasas de AMPK conocidas. Además, en dicho estudio no se ha analizado si TAK1 activa a AMPK y a LKB1 en paralelo. Por otro lado, hay otro estudio que demuestra que AICAR es capaz de activar a AMPK en MEFs y en hepatocitos embrionarios de ratón, y que esta activación se inhibe cuando estos modelos son deficientes en AMPK o LKB1 pero no en TAK1 (Goransson, McBride et al. 2007). Además, este mismo estudio muestra que AICAR es capaz de activar a AMPK en células de carcinoma de cérvix deficientes en LKB1, pero que no activa a AMPK en células de músculo deficientes en LKB1. Estos datos apuntan a que TAK1 no está implicada en la activación de AMPK mediada por AICAR, lo cual podría concordar con el hecho de que TAK1 está por encima de AMPK y que AICAR, al ser un activador directo de AMPK no necesite la presencia de TAK1. Sin embargo, estos datos se

contradicen con los publicados por Xie et al., en los que AICAR, metformina y oligomicina activan a AMPK a través de TAK1 y LKB1. Por lo tanto, faltan muchos estudios por realizar para esclarecer esta cuestión, aunque parece que los requerimientos para que AMPK se active podrían ser específicos del tipo celular.

Una vez conocido que AMPK se activa a través de TAK1 en células epiteliales de mama tras el estímulo con TRAIL, queda por resolver cómo TRAIL activa a TAK1. En un primer lugar, se pensó en que TRAIL podría estar induciendo la expresión de TGF- β y que éste era el responsable de activar a TAK1 de forma autocrina, como está descrito. Sin embargo se observó que ni TGF- β era capaz de inducir autofagia, ni un inhibidor farmacológico de TGF- β bloqueaba la autofagia inducida por TRAIL (Figuras S1A y S1B), por lo que esta hipótesis se descartó. Además, el hecho de que TRAIL activara a TAK1 en tiempos tan cortos (desde los 5 minutos), no concordaba con este posible mecanismo, ya que es muy poco tiempo para inducir una proteína y que ésta sea excretada para unirse a su receptor e inducir la activación de TAK1 y del resto de la ruta que lleva a autofagia.

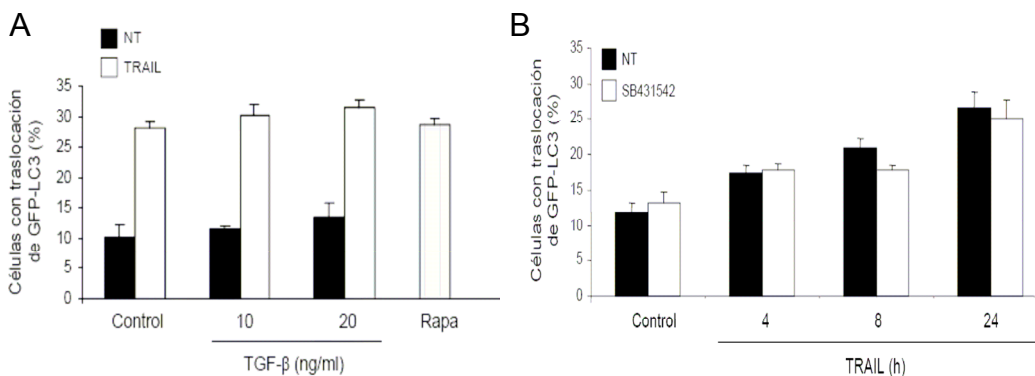


Figura S1. TGF- β no induce autofagia en células epiteliales de mama MCF10A. (A) Las células MCF10A se trataron con TGF- β (10 o 20 ng/ml) 8 horas antes del tratamiento con TRAIL (500 ng/ml; 24h) o con Rapamicina como control positivo (5 μ M; 24h). Las células con traslocación de LC3 al autofagosoma se determinaron por microscopía. Los valores muestran +/- DE de dos experimentos diferentes. (B) Las células MCF10A se trataron con el inhibidor de TGF- β SB43152 (10 μ M) 1 hora antes de añadir TRAIL (500 ng/ml; 4, 8 o 24h). Mediante microscopía se cuantificaron las células con traslocación de LC3. Los valores muestran +/- DE de dos experimentos independientes.

Hay datos en la literatura que demuestran que la expresión ectópica de las formas truncadas de TRAIL-R1 y TRAIL-R2 inhibe la señalización de TRAIL en células epiteliales de mama, bloqueando la autofagia durante el proceso de morfogénesis de la mama (Mills, Reginato et al. 2004), lo que sugiere que la transmisión de la autofagia puede estar mediada por los receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2. Por otro lado, se ha observado que TRAIL induce muerte celular autofágica en células epiteliales normales a través del dominio de muerte de FADD (Thorburn, Moore et al. 2005), sugiriendo que la formación del DISC de TRAIL podría ser necesaria para que TRAIL induzca autofagia. No obstante, hasta el momento no se han encontrado evidencias acerca de esto. En esta tesis se aportan datos que ratifican que la autofagia mediada por TRAIL requiere de su unión al receptor TRAIL-R2 así como de la formación del DISC, compuesto por TRAIL-R2, FADD, Caspasa-8, FLIP y RIP1. Pero, ¿cómo se relaciona la formación del DISC con la activación de TAK1? Los datos aportados en esta tesis, demuestran que tan sólo Caspasa-8 y FADD, pero no FLIP ni RIP1, son necesarios para que se activen TAK1 y AMPK y se inhiba mTOR tras el tratamiento con TRAIL en células epiteliales de mama. Un posible mecanismo por el que TRAIL podría activar a TAK1 se basa en datos publicados en los que TAK1 es capaz de asociarse a TRAF2 y de activarse por autofosforilación (Takaesu, Surabhi et al. 2003). Además, se sabe, por un lado, que TRAIL induce la formación de un segundo complejo intracelular tras la formación del DISC, compuesto por RIP1, FADD, Caspasa-8 y TRADD (Jin and El-Deiry 2006), y, por otro, que TRAF2 se une a TRADD en el complejo intracelular que forma TNF α (Micheau and Tschopp 2003). Por tanto, TRAIL podría inducir la formación del segundo complejo, en el que se encuentran FADD, Caspasa-8 y TRADD. A esta última molécula adaptadora, se le uniría TRAF2, que reclutaría a TAK1 induciendo su activación. Otro posible mecanismo de activación de TAK1 podría ser que TRAF2 se uniera a la Caspasa-8 o al FLIP del DISC, induciendo la posterior

asociación con TAK1. Esta hipótesis se basa en que se ha observado que Caspasa-8 juega un papel en la activación de NFκB al reclutar a RIP1, NIK y TRAF2, uniéndose al prodominio de unión de IKK (Chaudhary, Eby et al. 2000). Además, el dominio efector de muerte (DED) de vFLIP contiene una secuencia de interacción con TRAF (PYQLT), cuya unión está implicada en la activación de NFκB. Así, vFLIP se asocia a TRAF2 (Guasparri, Wu et al. 2006). Por tanto, aunque TRAF2 preferentemente se une a TRADD, también podría unirse a Caspasa-8 o FLIP del DISC y así inducir la activación de TAK1 mediante su unión a TRAF2. Para resolver esta cuestión, habría que demostrar, en primer lugar, que TRADD y TRAF2 son necesarios para que se active TAK1 por TRAIL, y en segundo lugar, estudios de inmunoprecipitaciones para esclarecer, por una parte, si en este modelo de células epiteliales de mama, se forma el segundo complejo de TRAIL; por otra parte, si TRAF2 es capaz de asociarse a caspasa-8 o FLIP del DISC y, finalmente, si TAK1 se une a TRAF2 y se activa mediante esta unión. Otra posible vía de activación de TAK1 a través de Caspasa-8 es que ésta corte algún inhibidor de TAK1, permitiendo que la quinasa quede libre y se active, tal vez mediante autofosforilación. Así pues, hacen falta muchos estudios que realizar para responder a todas estas cuestiones.

Por otro lado, estudios recientes han mostrado que RIP1 es necesario para que TAK1 se reclute al complejo inductor de muerte de TNFα, para activar a NFκB (Blonska, Shambharkar et al. 2005; Shim, Xiao et al. 2005; Jackson-Bernitsas, Ichikawa et al. 2007). Sin embargo, los datos que presentamos apuntan a que la activación de TAK1 no está mediada por RIP1 sino por FADD y Caspasa-8, y a que parece que la ruta que señaliza RIP1 es distinta a la de TAK1-AMPK-mTOR, por lo que la implicación de RIP1 en la activación de TAK1 puede depender del estímulo.

El hecho de que la autofagia inducida por TRAIL en células epiteliales de mama sea independiente de la actividad caspasa (no se inhibe al tratar las células con el

inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk), pero no de la proteína caspasa-8 (al disminuir sus niveles mediante siRNA, se bloquea la autofagia), parecía un dato contradictorio que llevó a pensar en la existencia de otra ruta de señalización a autofagia que fuera independiente de actividad caspasa. Así pues, se demuestra que TRAIL también activa a JNK independientemente de las caspasas (tanto de su actividad como de la proteína caspasa-8), ya que requiere la presencia de RIP1 y FADD para activarse. Además, la activación de JNK inducida por TRAIL media la formación de autofagosomas de forma independiente de mTOR. Recientemente se ha descrito que algunas drogas inducen autofagia a través de una ruta cíclica independiente de mTOR, en la que AMPc regula los niveles de IP3, que a su vez regula la actividad calpaína, completando el ciclo mediante la activación de G(s) α , que regula los niveles de AMPc (Sarkar, Ravikumar et al. 2008; Williams, Sarkar et al. 2008). Además, también se ha descrito que en células tumorales de mama MCF7, resveratrol, un polifenol que se utiliza en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y obesidad, induce autofagia independiente de beclina1 y de actividad caspasa (Scarlatti, Maffei et al. 2008). Estos nuevos datos sugieren que la autofagia puede inducirse a través de otras rutas no canónicas que no impliquen la inhibición de mTOR ni el requerimiento de beclina1.

Por otro lado, no se sabe cómo TRAIL activa a JNK en células epiteliales de mama. Un estudio reciente demuestra que TAK1 es necesario para la activación de JNK por IL-1 en artritis reumatoide, induciendo la fosforilación de JNK (Hammaker, Boyle et al. 2007). Sin embargo esto no parece ocurrir en el modelo de MCF10A, ya que al inhibir por separado, por una parte, la ruta de TAK1-AMPK-mTOR utilizando z-VAD-fmk o, por otra, la activación de JNK mediante su inhibidor farmacológico SP600125, sigue habiendo autofagia. Y sólo cuando se inhiben ambas rutas se bloquea la señalización de autofagia mediada por TRAIL. Estos datos sugieren que

ambas rutas son independientes pero suficientes, ya que la ausencia de una no impide que la otra actúe. Otro estudio publicado en los últimos años muestra que un fragmento de cadena simple de la región variable del anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor 2 de TRAIL, HW1, induce autofagia a través de la activación de JNK, que a su vez está mediada por el reclutamiento de TRADD y TRAF2, pero no de FADD, Caspasa-8 ni RIP en células tumorales sensibles y resistentes a TRAIL (Park, Lee et al. 2007). No obstante, en células epiteliales de mama tratadas con TRAIL, la activación de JNK requiere la presencia de RIP1 y de FADD, aunque no hay datos sobre el requerimiento de TRADD o de TRAF2 en este modelo. Pero sí se conoce que TRAIL puede inducir la activación de JNK a través del segundo complejo que forma TRAIL, y que contiene RIP1 (Kruyt 2008). Además, se ha visto recientemente en *Xenopus*, que la interacción de FADD y RIP1 activan sinérgicamente a JNK (Ishizawa, Tamura et al. 2006), lo que correlaciona con nuestros datos obtenidos en células epiteliales de mama tratadas con TRAIL.

No hay evidencias, no obstante, de cómo la activación de JNK inducida por TRAIL en células epiteliales de mama lleva a la formación de autofagosomas. En los últimos meses se ha descrito un posible mecanismo que daría una explicación a esta cuestión. Así pues, en células tumorales de mama MCF7, la activación de JNK1 por privación de aminoácidos induce una triple fosforilación de Bcl-2 en las serinas 70 y 87 y en la treonina 69, lo que implica que éste se disocie del complejo que forma con Beclina1 en condiciones normales, liberando a Beclina1 para que pueda iniciar el proceso de formación de vacuolas autofágicas (Wei, Pattingre et al. 2008). Habría que demostrar que en el modelo de células epiteliales de mama, tras el estímulo con TRAIL, la activación de JNK es capaz de inducir la fosforilación de Bcl-2 para explicar la ruta que lleva de JNK a autofagia, de forma independiente de mTOR.

En resumen, y como muestra la Figura S2, en células epiteliales de mama, TRAIL induce la formación del DISC, que se compone de TRAIL-R2, FADD, Caspasa-8, FLIP y RIP. Todos los componentes son necesarios para que la autofagia tenga lugar. Por un lado, FADD y Caspasa-8 señalizan hacia la ruta de TAK1-AMPK-mTOR, siendo necesaria la actividad caspasa para activar la quinasa AMPK. Por otro lado, FADD y RIP1 son necesarios para la activación de JNK, que induce autofagia de forma independiente de la ruta TAK1-AMPK-mTOR. Así pues, ambas rutas parecen ser independientes pero suficientes para la formación de vesículas autofágicas. El papel que está jugando FLIP en la autofagia inducida por TRAIL se discutirá más adelante.

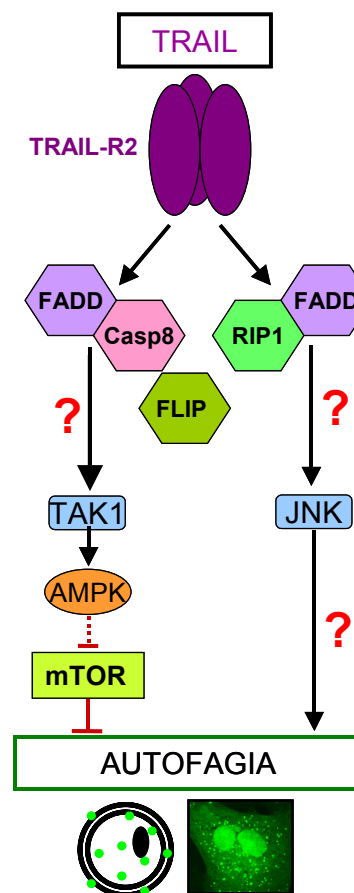


Figura S2. Mecanismos de inducción de autofagia mediada por TRAIL en células epiteliales de mama.

2. Inhibición de la autofagia por transformación oncogénica

Al transformar una célula normal en tumoral, ésta tiende a desarrollar mecanismos de supervivencia y a bloquear mecanismos de muerte para favorecer el desarrollo y progresión del tumor. Se sabe que muchos genes supresores de tumores y algunos oncogenes, además de regular el proceso de cáncer, activan o inhiben autofagia, respectivamente (Gozuacik and Kimchi 2004). Esto sugiere que el potencial de autofagia está disminuido en cánceres. En este sentido, hay estudios que muestran una disminución de la capacidad de inducir autofagia en células tumorales de páncreas de rata durante la transición de adenoma a carcinoma (Toth, Nagy et al. 2002).

En una célula dañada o mutada, se ponen en marcha mecanismos de reparación para intentar que la célula continúe su ciclo vital sin ninguna alteración que pueda llevar a un desarrollo tumoral posterior. Pero en caso de fallar estos mecanismos, se desencadena un programa de muerte celular programada para evitar que la célula dañada o mutada se siga dividiendo y dé lugar a un tumor. No obstante, muchas células tumorales son resistentes a este proceso, lo que aumenta su capacidad invasiva y tumorogénica. Además, si en una célula falla la apoptosis como mecanismo reparador, se pone en marcha la autofagia para evitar que se produzcan inestabilidad genómica y mutaciones, como mecanismo de salvaguarda de la situación de normalidad. Se ha demostrado en esta tesis que la transformación oncogénica de células epiteliales de mama MCF10A con los oncogenes Ras o Src inhibe la capacidad de TRAIL para inducir autofagia citoprotectora y sensibiliza a las células transformadas a la apoptosis inducida por el ligando de muerte. Estos datos concuerdan con los datos publicados de que células tumorales tienen disminuida la capacidad de inducir autofagia.

Se ha descrito que el oncogén Ras también regula autofagia (Chi, Kitanaka et al. 1999; Budovskaya, Stephan et al. 2004; Furuta, Hidaka et al. 2004). Aunque algunos autores apuntan a que Ras bloquea la autofagia inducida por privación de aminoácidos mediante la activación de la ruta PI3K-I/Akt, que inhibe autofagia, en células NIH3T3 (Furuta, Hidaka et al. 2004), otros autores describen que la sobreexpresión de Ras induce muerte celular autofágica en células de glioma y de cáncer de próstata, como mecanismo de prevención de neoplasia (Chi, Kitanaka et al. 1999). Sin embargo, en células epiteliales de mama, la sobreexpresión de Ras inhibe la formación de vesículas autofágicas a la vez que sensibiliza a las células a la muerte celular apoptótica, sugiriendo que la resistencia a autofagia puede deberse a que en estas células TRAIL es capaz de inducir su ruta canónica de muerte: apoptosis. Lo curioso es que estas células no han perdido su capacidad de inducir autofagia, ya que Rapamicina es capaz de activar la traslocación de LC3 al autofagosoma, sino que la transformación, de alguna manera, impide la señalización hacia autofagia inducida por el ligando de muerte TRAIL.

¿Qué hace que la transformación tumoral impida a la célula señalizar hacia autofagia? En células epiteliales de mama transformadas con Ras, TRAIL sigue activando la quinasa activadora de autofagia, AMPK, pero no se produce la inhibición de mTOR. La inhibición de mTOR favorece la unión de la PI3K-III con Beclina1 para dar lugar a la formación de vacuolas autofágicas. La inhibición de mTOR mediada por AMPK implica a otras proteínas, como son el complejo TSC1/TSC2 y Rheb, por tanto, parece que los mecanismos de señalización de Ras podrían estar regulando la autofagia a través de estas proteínas. Así pues, habría que estudiar la implicación de TSC1/TSC2 y de Rheb en la inhibición de la autofagia mediada por el oncogén Ras. Además, Ras activa tres rutas de señalización que parecen estar involucradas en la resistencia de las células de mama transformadas a la autofagia inducida por TRAIL.

De esta forma, Ras activa las rutas PI3K/Akt y MEK/ERK, que son inhibidoras de autofagia, y la ruta de JNK, que es capaz de inducir autofagia. Los resultados obtenidos muestran que la inhibición simultánea de las rutas PI3K/Akt y MEK/ERK restaura la capacidad de las células transformadas de inducir autofagia por TRAIL, mientras que la inhibición de la ruta de JNK no tiene ningún efecto. Además, utilizando mutantes que activan preferentemente cada una de las rutas, se han obtenido los mismos resultados. Por lo tanto, podría ser que la activación de las rutas inhibidoras de autofagia PI3K/Akt y MEK/ERK por Ras den lugar a una posterior inhibición de la ruta AMPK-mTOR, actuando posterior e indirectamente sobre las proteínas TSC1/TSC2 y/o Rheb. De esta forma, podría relacionarse la señalización de TRAIL que lleva a autofagia con la sensibilización a apoptosis en las células transformadas. Ahora falta por determinar cómo están relacionadas las rutas activadas por Ras con la vía de señalización de TRAIL en estas células. Tampoco se sabe si TRAIL activa AMPK a través de TAK1 en células tumorales o transformadas de mama, MCF7 o MCF10A-Ras, respectivamente. Recientemente se ha publicado que en células EpH4 de epitelio de mama de ratón, TGF- β coopera con el oncogén Ras para inducir transformación y progresión tumoral, lo que requiere la activación de TAK1 (y sus efectores JNK y p38) así como de la PI3K/Akt (Erdogan, Pozzi et al. 2008). En el caso de que TRAIL activara AMPK a través de TAK1, podría ser que Ras estuviera induciendo oncogenicidad y proliferación mediante esta quinasa, pero al estar bloqueando la ruta de autofagia por debajo de AMPK y mediante la activación de otras rutas (PI3K/Akt y MEK/ERK), la célula se vuelve resistente a autofagia y sensible a apoptosis, y acaba muriendo.

En definitiva, y como muestra la Figura S3, lo que está ocurriendo tras la transformación oncogénica por el oncogén Ras en las células epiteliales de mama MCF10A es que, por un lado, la activación de las rutas PI3K/Akt y MEK/ERK inducida

por Ras sea más fuerte que la activación de JNK. Y por otro lado, que estas rutas estén actuando indirectamente a nivel del complejo TSC1/TSC2 o de Rheb, bloqueando la señalización hacia autofagia mediada por la ruta AMPK-mTOR que induce TRAIL en las células normales de mama. Dichos efectos tienen como resultado final la inhibición de la autofagia. Pero, ¿TRAIL activa JNK en estas células? ¿Cómo afecta la transformación a la ruta de autofagia que se ha descrito que TRAIL induce en células normales? ¿Cómo inhibe Ras el paso entre AMPK y mTOR? Todas estas son preguntas cuyas respuestas necesitan de más estudios para ser resueltas, y que ayudarán a comprender la relación entre la transformación tumoral y la resistencia a la autofagia inducida por TRAIL.

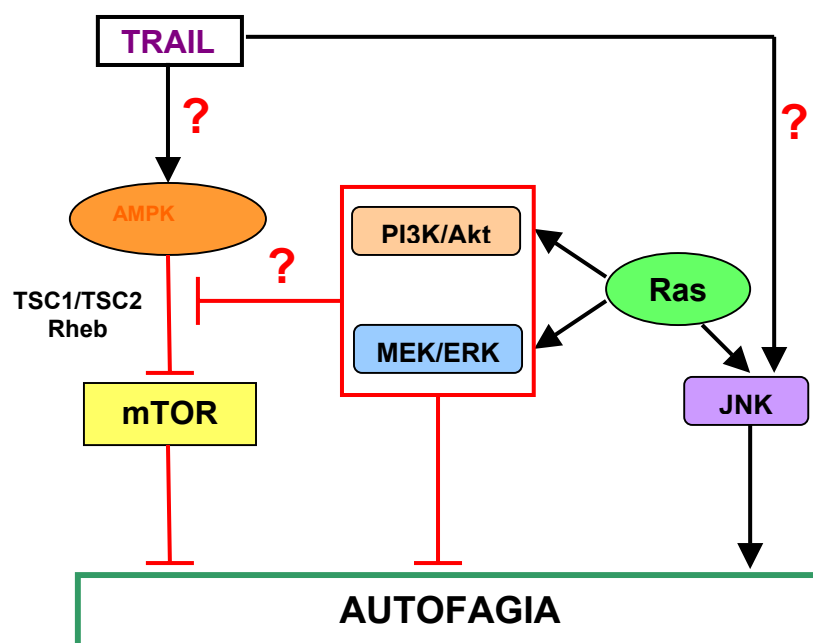


Figura S3. Transformación oncogénica por Ras en células epiteliales de mama. El esquema muestra la acción de Ras sobre sus distintas rutas de señalización y su relación con autofagia, así como el efecto del oncogén en la ruta que señala TRAIL hacia autofagia. Faltan algunas incógnitas por resolver, como por ejemplo, cómo TRAIL activa a AMPK en estas células, si TRAIL es capaz de activar a JNK, o si Ras está actuando indirectamente sobre el complejo TSC1/TSC2 o Rheb para bloquear la señalización entre AMPK y mTOR a través de las rutas PI3K/Akt y MEK/ERK, activadas por Ras.

3. Relación entre autofagia y apoptosis en células normales y tumorales de mama

Hay varios indicios que indican que autofagia y apoptosis están estrechamente relacionadas. Así, diversos autores han publicado estudios sobre la sensibilización a la apoptosis tras la inhibición de la autofagia por diversos estímulos y en distintos tipos celulares (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005; Gonzalez-Polo, Boya et al. 2005; Amaravadi, Yu et al. 2007; Apel, Herr et al. 2008; Pallet, Bouvier et al. 2008; Wang, Singh et al. 2008). En concordancia con estos datos, se ha demostrado en esta tesis que al inhibir autofagia en células epiteliales de mama MCF10A, mediante la disminución por siRNAs de los niveles de proteínas implicadas en la ruta de señalización de autofagia por TRAIL (Beclina1, Atg7, FLIP, RIP1, TAK1 y AMPK), las células se sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL. También las células epiteliales pigmentadas de retina RPE1 así como fibroblastos embrionarios de ratón se sensibilizan a la apoptosis cuando se inhibe la autofagia con siRNA de TAK1. Estos datos sugieren que la autofagia inducida por TRAIL es un mecanismo de supervivencia en este modelo de células normales. En sentido opuesto, al bloquear la señalización de apoptosis mediada por TRAIL utilizando el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk en células transformadas de mama MCF10A-Ras, las células recuperan la capacidad de inducir autofagia por TRAIL, por lo que la apoptosis, en este caso, parece estar bloqueando la señalización hacia autofagia. Estos datos concuerdan con datos anteriormente publicados por otros autores en los que al bloquear la apoptosis se favorece la autofagia (Lamparska-Przybysz, Gajkowska et al. 2005; Kim, Mutter et al. 2006). De esta forma, parece que TRAIL induce diferentes mecanismos según el tipo celular, señalizando hacia un mecanismo de supervivencia en células normales y hacia un mecanismo de muerte en células tumorales como un

mecanismo de salvaguarda para evitar la progresión tumoral. Es importante destacar que no parecen existir diferencias importantes en la expresión de receptores para TRAIL entre células normales y transformadas. En ambos tipos celulares el principal receptor expresado es el receptor proapoptótico TRAIL-R2. No obstante, parece que los niveles de expresión de TRAIL-R2 en las células transformadas son suficientes para que el ligando TRAIL induzca apoptosis, mientras que en las células normales existe una clara resistencia a la apoptosis frente a una sensibilidad a la ruta de autofagia.

Por otro lado, hemos observado que el bloqueo de la actividad caspasa en células MCF10A donde se ha silenciado la expresión de TAK1, FLIP o RIP1, permite la inducción de autofagia por TRAIL (Figura S4).

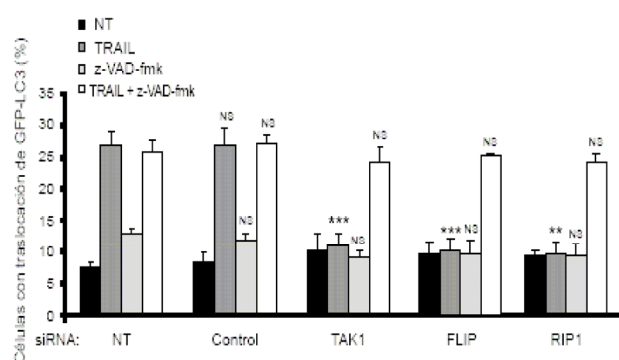


Figura S4. TAK1, FLIP y RIP1 están impidiendo la apoptosis. Las células MCF10A se transfectaron con dharmafect (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a TAK1#1, y RIP1 durante 48h o frente a FLIP durante 24h. A continuación, las células se trataron con TRAIL (500 ng/ml; 24h) y se analizó la formación de autofagosomas. El histograma muestra los valores +/- DE de cuatro experimentos diferentes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS = no significativo, comparado con la muestra transfectada con dharmafect.

Estos datos sugieren que estas proteínas desempeñan un papel permisivo de la autofagia bloqueando la inducción de apoptosis. Además, el hecho de que al disminuir los niveles de FLIP se inhiba la autofagia y las células se sensibilicen a la apoptosis por TRAIL, pero que FLIP no sea necesario para la activación por TRAIL de las rutas TAK1-AMPK-mTOR o JNK, sugiere que el papel de FLIP en la señalización por TRAIL en células epiteliales de mama es el de contribuir indirectamente a la autofagia por estar inhibiendo la apoptosis. En el caso de RIP1, además, es necesario

para que se active JNK, y en el de TAK1 para activar la ruta AMPK-mTOR. Al mismo tiempo, las proteínas TAK1 y AMPK también parecen estar impidiendo la apoptosis de alguna forma, además de señalizar hacia autofagia. Hay datos en la literatura en los que la inducción de autofagia con Rapamicina da lugar a una resistencia a apoptosis (Ravikumar, Berger et al. 2006), que se correlaciona con los datos presentados. En este sentido, podría ser de interés estudiar en el modelo de células transformadas de mama MCF10A-Ras o MCF10A-Src si Rapamicina protege a las células transformadas de la apoptosis inducida por TRAIL, lo que confirmaría que la inducción de autofagia es un mecanismo de supervivencia en este modelo. Respecto al papel de AMPK en la regulación de autofagia y apoptosis, se ha demostrado en esta tesis que AMPK se activa tras el tratamiento con TRAIL tanto en células normales como en transformadas de mama. Sin embargo, en las células normales se induce un mecanismo de supervivencia mientras que en las células transformadas se induce muerte celular programada. ¿Está jugando AMPK algún papel en la relación entre autofagia y apoptosis? Por un lado, como se ha mencionado anteriormente, AICAR, un activador directo de AMPK, no es capaz de inducir autofagia en células MCF10A. Esto puede deberse a que, como se ha publicado en los últimos años, AICAR puede inducir apoptosis independientemente de AMPK en células Jurkat, donde AICAR no activa AMPK (Lopez, Santidrian et al. 2003). Estos datos podrían explicar el hecho de que AICAR no induzca autofagia porque esté induciendo apoptosis en las células epiteliales de mama, de forma independiente de AMPK, lo que bloquearía la señalización hacia autofagia. Por otro lado, se ha visto recientemente que AMPK está fosforilando a Raptor en las serinas 722 y 729 de forma dependiente de AMPK y de LKB1 en fibroblastos embrionarios de ratón. Esta fosforilación da lugar a la unión de la proteína 14-3-3 (implicada en numerosos procesos celulares como supervivencia celular) a Raptor, previniendo la apoptosis. Así, la inhibición del complejo mTORC1 y

su capacidad de reclutar sustratos impide que la apoptosis tenga lugar (Gwinn, Shackelford et al. 2008; Hardie 2008). Estos datos dan una posible explicación a la hipótesis de que AMPK está bloqueando de alguna manera la apoptosis y por ello induce autofagia.

Recientemente se ha publicado que el silenciamiento o la inhibición de TAK1 aumenta la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales HeLa a través de la activación de la cascada de caspasas (Choo, Kawasaki et al. 2006). En este sentido, se ha sugerido que podrían utilizarse inhibidores de TAK1 como agentes quimioterápicos en combinación con TRAIL. Dado que esto mismo ocurre en las células normales epiteliales al deplecionarlas en TAK1, esta aproximación terapéutica debe ser considerada con bastante precaución. En estas células, al inhibir la autofagia con 3-Metiladenina, las células aumentan la activación de caspasas tras la adición de TRAIL, así como la formación de Bid truncado.

En línea con esto, hay algunos datos en la literatura que demuestran que la inhibición de autofagia promueve apoptosis dependiendo del estímulo (Wang, Singh et al. 2008), o que la autofagia citoprotectora está implicada en la resistencia a la apoptosis (Han, Hou et al. 2008). Además, en los últimos meses se ha publicado que los genes de autofagia Atg5 y Beclina1 son requeridos para la generación de las señales de fagocitosis de las células en apoptosis. De esta forma, la falta de Atg5 produce defectos en la ingestión de cuerpos apoptóticos durante el desarrollo embrionario debido a que no se libera LPC (Lisofosfatidilcolina) de los cuerpos apoptóticos ni se expone PS (Fosfatidilserina) en la superficie de la célula (Qu, Zou et al. 2007). Todos estos datos apuntan a que existe una relación entre apoptosis y autofagia, no sólo en la ejecución del proceso de muerte celular sino también en la eliminación de células apoptóticas.

Otro punto de regulación entre la apoptosis y la autofagia se encuentra a nivel de mTOR. En los últimos años se ha visto que mTOR induce la sobreexpresión de FLIP_S en células de glioblastoma multiforme, lo que conlleva a la resistencia de dichas células a la muerte inducida por TRAIL. De esta forma, la inhibición de mTOR favorece la sensibilización de estas células a la muerte por apoptosis (Panner, James et al. 2005). Estos datos implican una relación translacional entre FLIP_S y mTOR. En nuestro modelo, la inhibición de mTOR, bien por Rapamicina o por la activación de AMPK por TRAIL induce autofagia, que probablemente esté inhibiendo la apoptosis. En estas células, los niveles de expresión de FLIP_S son muy bajos y prácticamente indetectables y no hemos observado una regulación por mTOR. Además, para que estas células se sensibilicen a la apoptosis es suficiente con bloquear la expresión de FLIP_L, por lo que no está muy claro si FLIP_S juega algún papel en la resistencia a la señalización de apoptosis y, en su caso, si tiene alguna relación con mTOR.

Por otra parte, durante este año se ha publicado que la autofagia que se induce durante la formación del lumen acinar. La morfogénesis de la mama es una estrategia de supervivencia para mitigar el estrés de la falta de adhesión a la matriz extracelular (Fung, Lock et al. 2008). De esta forma, al deplecionar Atg5 y Atg7 en células epiteliales de mama en condiciones de falta de adhesión al sustrato, hay una disminución de la autofagia y se induce activación de caspasa-3 y apoptosis. En este sentido, si el lumen se forma porque las células privadas de contacto con la matriz extracelular se mueren por apoptosis (proceso conocido como anoikis (Frisch and Francis 1994)), y en las mismas células del lumen se produce autofagia como mecanismo de supervivencia, ¿puede darse la apoptosis y la autofagia al mismo tiempo y en la misma célula? ¿Podría ser que en las células del interior del acino se induzca apoptosis y/o autofagia, y en las que están en contacto con la matriz extracelular tenga lugar un proceso de autofagia como mecanismo de supervivencia?

Los datos presentados en esta tesis apuntan a que la autofagia que tiene lugar durante la formación del lumen en células epiteliales de mama, parece ser un mecanismo de supervivencia que, al inhibirlo, hace que las células se sensibilicen a la apoptosis y el lumen se forma más rápidamente. Estos datos, además, confirman que el proceso de autofagia está inhibiendo la apoptosis también durante la formación del lumen. Sería interesante analizar si la disminución de la expresión de AMPK tiene los mismos efectos que la de Beclina1 y TAK1, lo cual confirmaría que la señalización de autofagia por TRAIL en células epiteliales de mama durante la morfogénesis está inhibiendo la apoptosis. No obstante, queda mucho por estudiar para dilucidar si una misma célula puede estar induciendo apoptosis y autofagia la mismo tiempo, y qué lleva a que predomine un proceso u otro. Además, se sabe que un déficit en la autofagia durante la morfogénesis de la mama acelera la formación del lumen (Karantza-Wadsworth, Patel et al. 2007; Karantza-Wadsworth and White 2007).

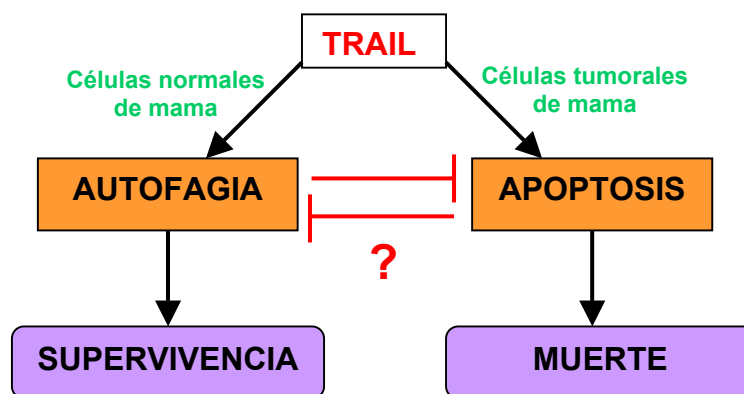


Figura S5. Relación entre apoptosis y autofagia en células epiteliales normales y tumorales de mama tratadas con TRAIL.

En resumen, y como muestra la Figura S5, TRAIL es capaz de inducir autofagia en células epiteliales normales de mama y apoptosis en células transformadas. En las células normales el proceso de autofagia es un mecanismo de

supervivencia, posiblemente en respuesta al estrés que induce el ligando de muerte TRAIL, que a su vez está bloqueando la señalización de muerte celular. Por otro lado, en células tumorales, la transformación oncogénica induce cambios en la célula que la hacen sensible a la apoptosis y resistente a la autofagia. Ambos mecanismos están relacionados, ya que al inhibir autofagia en células MCF10A, éstas se sensibilizan a la apoptosis y al bloquear la apoptosis en células transformadas, éstas recuperan la capacidad de inducir autofagia. Sin embargo, aún hay que determinar cómo están interconectados ambos mecanismos.

VIII. CONCLUSIONES

1. TRAIL induce un proceso de autofagia en células epiteliales normales de mama MCF10A y de retina RPE1.
2. El mecanismo de inducción de autofagia mediado por TRAIL en células MCF10A implica la activación de, al menos, dos mecanismos: la ruta de señalización TAK1-AMPK-mTOR y la activación de JNK.
3. La formación de vesículas autofágicas requiere el reclutamiento de Caspasa-8, FADD, FLIP y RIP1 al complejo inductor de muerte (DISC) de TRAIL.
4. Caspasa-8 y FADD son necesarios para la activación de la ruta TAK1-AMPK-mTOR, mientras que RIP1 y FADD se requieren para la activación de JNK.
5. TRAIL induce apoptosis y no autofagia en células tumorales o transformadas de mama MCF7, MCF10A-Ras y MCF10A-Src.
6. La transformación oncogénica bloquea la señalización a autofagia inducida por TRAIL mediante: 1) la activación de las rutas de PI3K/Akt y MEK/Erk, y 2) el bloqueo de la señalización entre AMPK y mTOR.
7. El bloqueo de la ruta de inducción de autofagia en modelos de células normales MCF10A, RPE1 o MEFs sensibiliza a la apoptosis mediada por TRAIL.

8. La autofagia está bloqueando la apoptosis después de la formación del DISC de TRAIL en células transformadas.

9. La inhibición de la autofagia mediante siRNA de Beclina1 interfiere en la formación del lumen durante la morfogénesis de acinos en cultivos tridimensionales de células MCF10A. Del mismo modo, el silenciamiento de la proteína quinasa TAK1, que participa en la señalización de autofagia por TRAIL, acelera la formación del lumen en células MCF10A.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, A., M. Xu, et al. (2007). "Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK." *Oncogene* 26(22): 3214-26.
- Aita, V. M., X. H. Liang, et al. (1999). "Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21." *Genomics* 59(1): 59-65.
- Almasan, A. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(3-4): 337-48.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* 87(2): 171.
- Alper, O. and E. T. Bowden (2005). "Novel insights into c-Src." *Curr Pharm Des* 11(9): 1119-30.
- Amaravadi, R. K., D. Yu, et al. (2007). "Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma." *J Clin Invest* 117(2): 326-36.
- Apel, A., I. Herr, et al. (2008). "Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy." *Cancer Res* 68(5): 1485-94.
- Arico, S., A. Petiot, et al. (2001). "The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway." *J Biol Chem* 276(38): 35243-6.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* 281(5381): 1305-8.
- Ashkenazi, A. and R. S. Herbst (2008). "To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists." *J Clin Invest* 118(6): 1979-90.
- Baas, A. F., L. Smit, et al. (2004). "LKB1 tumor suppressor protein: PARtaker in cell polarity." *Trends Cell Biol* 14(6): 312-9.
- Badorff, C., H. Ruetten, et al. (2002). "Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload." *J Clin Invest* 109(3): 373-81.
- Baker, S. J. and E. P. Reddy (1998). "Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily." *Oncogene* 17(25): 3261-70.
- Baliga, B. C. and S. Kumar (2002). "Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy." *Hematol Oncol* 20(2): 63-74.
- Banner, D. W., A. D'Arcy, et al. (1993). "Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation." *Cell* 73(3): 431-45.

- Barbacid, M. (1987). "ras genes." *Annu Rev Biochem* 56: 779-827.
- Barnhart, B. C., P. Legembre, et al. (2004). "CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells." *Embo J* 23(15): 3175-85.
- Baud, V. and M. Karin (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." *Trends Cell Biol* 11(9): 372-7.
- Beg, Z. H., D. W. Allmann, et al. (1973). "Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol." *Biochem Biophys Res Commun* 54(4): 1362-9.
- Bennett, B. L., D. T. Sasaki, et al. (2001). "SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13681-6.
- Berg, T. O., M. Fengsrud, et al. (1998). "Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes." *J Biol Chem* 273(34): 21883-92.
- Bertazza, L. and S. Mocellin (2008). "Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death." *Front Biosci* 13: 2736-43.
- Bertelsen, M. and A. Sanfridson (2007). "TAB1 modulates IL-1alpha mediated cytokine secretion but is dispensable for TAK1 activation." *Cell Signal* 19(3): 646-57.
- Bertin, J., R. C. Armstrong, et al. (1997). "Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(4): 1172-6.
- Bishop, J. M., B. Baker, et al. (1978). "Genesis of a virus-transforming gene." *Natl Cancer Inst Monogr*(48): 219-23.
- Bjornsti, M. A. and P. J. Houghton (2004). "The TOR pathway: a target for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 4(5): 335-48.
- Blommaart, E. F., U. Krause, et al. (1997). "The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes." *Eur J Biochem* 243(1-2): 240-6.
- Blonska, M., P. B. Shambharkar, et al. (2005). "TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation." *J Biol Chem* 280(52): 43056-63.
- Boatright, K. M., C. Deis, et al. (2004). "Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L)." *Biochem J* 382(Pt 2): 651-7.
- Boatright, K. M., M. Renatus, et al. (2003). "A unified model for apical caspase activation." *Mol Cell* 11(2): 529-41.

- Bodmer, J. L., P. Schneider, et al. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." *Trends Biochem Sci* 27(1): 19-26.
- Borner, C. (2003). "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions." *Mol Immunol* 39(11): 615-47.
- Bossy-Wetzel, E., D. D. Newmeyer, et al. (1998). "Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization." *Embo J* 17(1): 37-49.
- Bouillet, P., D. Metcalf, et al. (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." *Science* 286(5445): 1735-8.
- Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, et al. (2005). "Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis." *Mol Cell Biol* 25(3): 1025-40.
- Bredesen, D. E. (1995). "Neural apoptosis." *Ann Neurol* 38(6): 839-51.
- Brenman, J. E. (2007). "AMPK/LKB1 signaling in epithelial cell polarity and cell division." *Cell Cycle* 6(22): 2755-9.
- Brown, E. J., M. W. Albers, et al. (1994). "A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex." *Nature* 369(6483): 756-8.
- Budovskaya, Y. V., J. S. Stephan, et al. (2004). "The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 279(20): 20663-71.
- Bursch, W., A. Ellinger, et al. (1996). "Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy." *Carcinogenesis* 17(8): 1595-607.
- Campbell, I. K., L. J. Roberts, et al. (2003). "Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis." *Immunol Cell Biol* 81(5): 354-66.
- Cao, Y. and D. J. Klionsky (2007). "Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein." *Cell Res* 17(10): 839-49.
- Carlson, C. A. and K. H. Kim (1973). "Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation." *J Biol Chem* 248(1): 378-80.
- Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." *Anat Embryol (Berl)* 181(3): 195-213.

- Cohen, G. M., X. M. Sun, et al. (1994). "Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes." *J Immunol* 153(2): 507-16.
- Conus, S., T. Kaufmann, et al. (2000). "Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints." *Embo J* 19(7): 1534-44.
- Cookson, B. T. and M. A. Brennan (2001). "Pro-inflammatory programmed cell death." *Trends Microbiol* 9(3): 113-4.
- Corallini, F., E. Rimondi, et al. (2008). "TRAIL and osteoprotegerin: a role in endothelial physiopathology?" *Front Biosci* 13: 135-47.
- Corcelle, E., M. Nebout, et al. (2006). "Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity." *Cancer Res* 66(13): 6861-70.
- Corradetti, M. N. and K. L. Guan (2006). "Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?" *Oncogene* 25(48): 6347-60.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* 2(9): 647-56.
- Cory, S., D. C. Huang, et al. (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." *Oncogene* 22(53): 8590-607.
- Coultas, L. and A. Strasser (2003). "The role of the Bcl-2 protein family in cancer." *Semin Cancer Biol* 13(2): 115-23.
- Cretney, E., A. Shanker, et al. (2006). "TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer." *Immunol Cell Biol* 84(1): 87-98.
- Cretney, E., K. Takeda, et al. (2002). "Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice." *J Immunol* 168(3): 1356-61.
- Crighton, D., S. Wilkinson, et al. (2006). "DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis." *Cell* 126(1): 121-34.
- Criollo, A., M. C. Maiuri, et al. (2007). "Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor." *Cell Death Differ* 14(5): 1029-39.
- Crompton, M. (2003). "On the involvement of mitochondrial intermembrane junctional complexes in apoptosis." *Curr Med Chem* 10(16): 1473-84.
- Crul, M., G. J. de Klerk, et al. (2001). "Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey." *Anticancer Drugs* 12(3): 163-84.
- Cryns, V. and J. Yuan (1998). "Proteases to die for." *Genes Dev* 12(11): 1551-70.

- Cui, Q., S. Tashiro, et al. (2007). "Oridonin induced autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells through Ras, JNK, and P38 regulation." *J Pharmacol Sci* 105(4): 317-25.
- Cully, M. and J. Downward (2008). "SnapShot: Ras Signaling." *Cell* 133(7): 1292-1292 e1.
- Chan, F. K., H. J. Chun, et al. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." *Science* 288(5475): 2351-4.
- Chang, D. W., Z. Xing, et al. (2002). "c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis." *Embo J* 21(14): 3704-14.
- Chang, E. H., M. E. Furth, et al. (1982). "Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus." *Nature* 297(5866): 479-83.
- Chaudhary, P. M., M. T. Eby, et al. (2000). "Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs." *Oncogene* 19(39): 4451-60.
- Chen, E. J. and C. A. Kaiser (2003). "LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway." *J Cell Biol* 161(2): 333-47.
- Cheng, J., T. Zhou, et al. (1994). "Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule." *Science* 263(5154): 1759-62.
- Chernomordik, L. V. and M. M. Kozlov (2005). "Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps." *Cell* 123(3): 375-82.
- Cheung, P. C., A. R. Nebreda, et al. (2004). "TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1." *Biochem J* 378(Pt 1): 27-34.
- Chi, S., C. Kitanaka, et al. (1999). "Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells." *Oncogene* 18(13): 2281-90.
- Choo, M. K., N. Kawasaki, et al. (2006). "Blockade of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 activity enhances TRAIL-induced apoptosis through activation of a caspase cascade." *Mol Cancer Ther* 5(12): 2970-6.
- Daido, S., T. Kanzawa, et al. (2004). "Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells." *Cancer Res* 64(12): 4286-93.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* 116(2): 205-19.
- Dann, S. G. and G. Thomas (2006). "The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals." *FEBS Lett* 580(12): 2821-9.

- Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* 417(6892): 949-54.
- Davies, S. P., S. A. Hawley, et al. (1994). "Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure." *Eur J Biochem* 223(2): 351-7.
- De Duve, C. and R. Wattiaux (1966). "Functions of lysosomes." *Annu Rev Physiol* 28: 435-92.
- de Ruiter, N. D., R. M. Wolthuis, et al. (2000). "Ras-dependent regulation of c-Jun phosphorylation is mediated by the Ral guanine nucleotide exchange factor-Ral pathway." *Mol Cell Biol* 20(22): 8480-8.
- Debnath, J. (2008). "Detachment-induced autophagy during anoikis and lumen formation in epithelial acini." *Autophagy* 4(3): 351-3.
- Debnath, J. and J. S. Brugge (2005). "Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures." *Nat Rev Cancer* 5(9): 675-88.
- Debnath, J., K. R. Mills, et al. (2002). "The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini." *Cell* 111(1): 29-40.
- Debnath, J., S. K. Muthuswamy, et al. (2003). "Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures." *Methods* 30(3): 256-68.
- Degenhardt, K., R. Mathew, et al. (2006). "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis." *Cancer Cell* 10(1): 51-64.
- Degli-Esposti, M. A., W. C. Dougall, et al. (1997). "The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain." *Immunity* 7(6): 813-20.
- Degli-Esposti, M. A., P. J. Smolak, et al. (1997). "Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family." *J Exp Med* 186(7): 1165-70.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* 22(53): 8543-67.
- Degterev, A., Z. Huang, et al. (2005). "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury." *Nat Chem Biol* 1(2): 112-9.
- Demarchi, F., C. Bertoli, et al. (2006). "Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells." *J Cell Biol* 175(4): 595-605.

- Der, C. J., T. G. Krontiris, et al. (1982). "Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(11): 3637-40.
- Desagher, S. and J. C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." *Trends Cell Biol* 10(9): 369-77.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* 13(3): 239-52.
- Dirsch, V. M., I. M. Muller, et al. (2003). "Cephalostatin 1 selectively triggers the release of Smac/DIABLO and subsequent apoptosis that is characterized by an increased density of the mitochondrial matrix." *Cancer Res* 63(24): 8869-76.
- Djavaheri-Mergny, M., M. Amelotti, et al. (2006). "NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy." *J Biol Chem* 281(41): 30373-82.
- Donepudi, M., A. Mac Sweeney, et al. (2003). "Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation." *Mol Cell* 11(2): 543-9.
- Downward, J. (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 262-7.
- DuBridge, R. B., P. Tang, et al. (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." *Mol Cell Biol* 7(1): 379-87.
- Dufner, A. and G. Thomas (1999). "Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation." *Exp Cell Res* 253(1): 100-9.
- Duiker, E. W., C. H. Mom, et al. (2006). "The clinical trail of TRAIL." *Eur J Cancer* 42(14): 2233-40.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2003). "Defective autophagy leads to cancer." *Cancer Cell* 4(6): 422-4.
- Edlund, S., S. Bu, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3." *Mol Biol Cell* 14(2): 529-44.
- Eguchi, Y., S. Shimizu, et al. (1997). "Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis." *Cancer Res* 57(10): 1835-40.

- Erdogan, M., A. Pozzi, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and TGF-beta-associated kinase 1 are required for R-Ras-mediated transformation of mammary epithelial cells." *Cancer Res* 68(15): 6224-31.
- Falschlehner, C., C. H. Emmerich, et al. (2007). "TRAIL signalling: decisions between life and death." *Int J Biochem Cell Biol* 39(7-8): 1462-75.
- Feng, Z., H. Zhang, et al. (2005). "The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(23): 8204-9.
- Ferraro, E. and F. Cecconi (2007). "Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells." *Arch Biochem Biophys* 462(2): 210-9.
- Ferri, K. F. and G. Kroemer (2001). "Organelle-specific initiation of cell death pathways." *Nat Cell Biol* 3(11): E255-63.
- Fimia, G. M., A. Stoykova, et al. (2007). "Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system." *Nature* 447(7148): 1121-5.
- Finnberg, N., A. J. Klein-Szanto, et al. (2008). "TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis." *J Clin Invest* 118(1): 111-23.
- Foghsgaard, L., D. Wissing, et al. (2001). "Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor." *J Cell Biol* 153(5): 999-1010.
- Freilinger, A., M. Rosner, et al. (2008). "Ras mediates cell survival by regulating tuberin." *Oncogene* 27(14): 2072-83.
- Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." *J Cell Biol* 124(4): 619-26.
- Frisch, S. M. and R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." *Curr Opin Cell Biol* 13(5): 555-62.
- Fujita, N., T. Itoh, et al. (2008). "The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy." *Mol Biol Cell* 19(5): 2092-2100.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." *Oncogene* 25(34): 4798-811.
- Fulda, S., E. Meyer, et al. (2001). "Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis." *Oncogene* 20(9): 1063-75.
- Fung, C., R. Lock, et al. (2008). "Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival." *Mol Biol Cell* 19(3): 797-806.

- Furuta, S., E. Hidaka, et al. (2004). "Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase." *Oncogene* 23(22): 3898-904.
- Furuya, N., J. Yu, et al. (2005). "The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function." *Autophagy* 1(1): 46-52.
- Galluzzi, L., N. Joza, et al. (2008). "No death without life: vital functions of apoptotic effectors." *Cell Death Differ* 15(7): 1113-23.
- Gingras, A. C., S. P. Gygi, et al. (1999). "Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism." *Genes Dev* 13(11): 1422-37.
- Goldberg, A. L. (2003). "Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins." *Nature* 426(6968): 895-9.
- Golks, A., D. Brenner, et al. (2005). "c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis." *J Biol Chem* 280(15): 14507-13.
- Golstein, P. (2000). "Signal transduction. FasL binds preassembled Fas." *Science* 288(5475): 2328-9.
- Gonzalez-Polo, R. A., P. Boya, et al. (2005). "The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death." *J Cell Sci* 118(Pt 14): 3091-102.
- Goransson, O., A. McBride, et al. (2007). "Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem* 282(45): 32549-60.
- Gozuacik, D. and A. Kimchi (2004). "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism." *Oncogene* 23(16): 2891-906.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Green, D. R. (2000). "Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors." *Cell* 102(1): 1-4.
- Green, D. R. and G. I. Evan (2002). "A matter of life and death." *Cancer Cell* 1(1): 19-30.
- Grinberg, M., R. Sarig, et al. (2002). "tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis." *J Biol Chem* 277(14): 12237-45.
- Grosse-Wilde, A., O. Voloshanenko, et al. (2008). "TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development." *J Clin Invest* 118(1): 100-10.

- Gruss, H. J. and S. K. Dower (1995). "The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases." *Cytokines Mol Ther* 1(2): 75-105.
- Guasparri, I., H. Wu, et al. (2006). "The KSHV oncoprotein vFLIP contains a TRAF-interacting motif and requires TRAF2 and TRAF3 for signalling." *EMBO Rep* 7(1): 114-9.
- Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, et al. (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." *Mol Cell* 30(2): 214-26.
- Hamad, N. M., J. H. Elconin, et al. (2002). "Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells." *Genes Dev* 16(16): 2045-57.
- Hammaker, D. R., D. L. Boyle, et al. (2007). "Regulation of the JNK pathway by TGF-beta activated kinase 1 in rheumatoid arthritis synoviocytes." *Arthritis Res Ther* 9(3): R57.
- Hampe, J., A. Franke, et al. (2007). "A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1." *Nat Genet* 39(2): 207-11.
- Han, J., W. Hou, et al. (2008). "Involvement of Protective Autophagy in TRAIL Resistance of Apoptosis-defective Tumor Cells." *J Biol Chem* 283(28): 19665-77.
- Han, Z., D. L. Boyle, et al. (2001). "c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis." *J Clin Invest* 108(1): 73-81.
- Hanada, T., N. N. Noda, et al. (2007). "The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy." *J Biol Chem* 282(52): 37298-302.
- Hanafusa, H., J. Ninomiya-Tsuji, et al. (1999). "Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression." *J Biol Chem* 274(38): 27161-7.
- Hara, K., K. Yonezawa, et al. (1998). "Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism." *J Biol Chem* 273(23): 14484-94.
- Hardie, D. G. (2008). "AMPK and Raptor: matching cell growth to energy supply." *Mol Cell* 30(3): 263-5.
- Hardie, D. G., S. A. Hawley, et al. (2006). "AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept." *J Physiol* 574(Pt 1): 7-15.
- Hardie, D. G., I. P. Salt, et al. (1999). "AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge." *Biochem J* 338 (Pt 3): 717-22.

- Harper, N., S. N. Farrow, et al. (2001). "Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases." *J Biol Chem* 276(37): 34743-52.
- Harvey, A. J., H. Soliman, et al. (1997). "Anti- and pro-apoptotic activities of baculovirus and *Drosophila* IAPs in an insect cell line." *Cell Death Differ* 4(8): 733-44.
- Harvey, J. J. (1964). "An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice." *Nature* 204: 1104-5.
- Hawley, S. A., J. Boudeau, et al. (2003). "Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade." *J Biol* 2(4): 28.
- Hawley, S. A., M. Davison, et al. (1996). "Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem* 271(44): 27879-87.
- Hawley, S. A., D. A. Pan, et al. (2005). "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase." *Cell Metab* 2(1): 9-19.
- He, H., Y. Dang, et al. (2003). "Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B." *J Biol Chem* 278(31): 29278-87.
- Hemelaar, J., V. S. Lelyveld, et al. (2003). "A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L." *J Biol Chem* 278(51): 51841-50.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-6.
- Henry-Mowatt, J., C. Dive, et al. (2004). "Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer." *Oncogene* 23(16): 2850-60.
- Herr, I., C. Posovszky, et al. (2000). "Autoamplification of apoptosis following ligation of CD95-L, TRAIL and TNF-alpha." *Oncogene* 19(37): 4255-62.
- Hinds, M. G., R. S. Norton, et al. (1999). "Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat." *Nat Struct Biol* 6(7): 648-51.
- Holler, N., R. Zaru, et al. (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." *Nat Immunol* 1(6): 489-95.
- Homsí, J., C. Cubitt, et al. (2007). "The Src signaling pathway: a potential target in melanoma and other malignancies." *Expert Opin Ther Targets* 11(1): 91-100.

- Hoyer-Hansen, M., L. Bastholm, et al. (2005). "Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death." *Cell Death Differ* 12(10): 1297-309.
- Hoyer-Hansen, M., L. Bastholm, et al. (2007). "Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2." *Mol Cell* 25(2): 193-205.
- Hoyer-Hansen, M. and M. Jaattela (2007). "AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy?" *Autophagy* 3(4): 381-3.
- Hsu, H., J. Xiong, et al. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." *Cell* 81(4): 495-504.
- Hsu, S. Y., A. Kaipia, et al. (1997). "Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12401-6.
- Hu, S., C. Vincenz, et al. (1997). "I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis." *J Biol Chem* 272(28): 17255-7.
- Hu, W. H., H. Johnson, et al. (1999). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways." *J Biol Chem* 274(43): 30603-10.
- Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." *Cell* 103(6): 839-42.
- Huang, H., C. A. Joazeiro, et al. (2000). "The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7." *J Biol Chem* 275(35): 26661-4.
- Hudson, E. R., D. A. Pan, et al. (2003). "A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias." *Curr Biol* 13(10): 861-6.
- Hunter, A. M., E. C. LaCasse, et al. (2007). "The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets." *Apoptosis* 12(9): 1543-68.
- Hymowitz, S. G., M. P. O'Connell, et al. (2000). "A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL." *Biochemistry* 39(4): 633-40.
- Ichimura, Y., T. Kirisako, et al. (2000). "A ubiquitin-like system mediates protein lipidation." *Nature* 408(6811): 488-92.
- Inoki, K., T. Zhu, et al. (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." *Cell* 115(5): 577-90.

- Ionov, Y., H. Yamamoto, et al. (2000). "Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10872-7.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* 388(6638): 190-5.
- Iseli, T. J., M. Walter, et al. (2005). "AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270)." *J Biol Chem* 280(14): 13395-400.
- Ishizawa, Y. H., K. Tamura, et al. (2006). "Xenopus death-domain-containing proteins FADD and RIP1 synergistically activate JNK and NF-kappaB." *Biol Cell* 98(8): 465-78.
- Itoh, N., S. Yonehara, et al. (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." *Cell* 66(2): 233-43.
- Itoh, T., N. Fujita, et al. (2008). "Golgi-resident Small GTPase Rab33B Interacts with Atg16L and Modulates Autophagosome Formation." *Mol Biol Cell* 19(7): 2916-2925.
- Iwamaru, A., Y. Kondo, et al. (2007). "Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells." *Oncogene* 26(13): 1840-51.
- Jacinto, E., R. Loewith, et al. (2004). "Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive." *Nat Cell Biol* 6(11): 1122-8.
- Jackson-Bernitsas, D. G., H. Ichikawa, et al. (2007). "Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma." *Oncogene* 26(10): 1385-97.
- Jadrich, J. L., M. B. O'Connor, et al. (2006). "The TGF beta activated kinase TAK1 regulates vascular development in vivo." *Development* 133(8): 1529-41.
- Jhun, B. S., Q. Jin, et al. (2004). "5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside suppresses lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation in RAW 264.7 murine macrophages." *Biochem Biophys Res Commun* 318(2): 372-80.
- Jia, L., R. R. Dourmashkin, et al. (1997). "Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells." *Br J Haematol* 98(3): 673-85.

- Jiang, R. and M. Carlson (1997). "The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex." *Mol Cell Biol* 17(4): 2099-106.
- Jiang, Y., J. D. Woronicz, et al. (1999). "Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains." *Science* 283(5401): 543-6.
- Jiang, Z., J. Ninomiya-Tsuji, et al. (2002). "Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol." *Mol Cell Biol* 22(20): 7158-67.
- Jin, S. and E. White (2007). "Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress." *Autophagy* 3(1): 28-31.
- Jin, Z. and W. S. El-Deiry (2006). "Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis." *Mol Cell Biol* 26(21): 8136-48.
- Jo, M., T. H. Kim, et al. (2000). "Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." *Nat Med* 6(5): 564-7.
- Johnson, D. E. (2000). "Noncaspase proteases in apoptosis." *Leukemia* 14(9): 1695-703.
- Jozwiak, J., S. Jozwiak, et al. (2005). "Positive and negative regulation of TSC2 activity and its effects on downstream effectors of the mTOR pathway." *Neuromolecular Med* 7(4): 287-96.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, et al. (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." *Embo J* 19(21): 5720-8.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, et al. (2004). "LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation." *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2805-12.
- Kahn, B. B., T. Alquier, et al. (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." *Cell Metab* 1(1): 15-25.
- Kahn, B. B. and M. G. Myers, Jr. (2006). "mTOR tells the brain that the body is hungry." *Nat Med* 12(6): 615-7.
- Kajino, T., E. Omori, et al. (2007). "TAK1 MAPK kinase kinase mediates transforming growth factor-beta signaling by targeting SnoN oncoprotein for degradation." *J Biol Chem* 282(13): 9475-81.

- Kamada, Y., T. Funakoshi, et al. (2000). "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." *J Cell Biol* 150(6): 1507-13.
- Kametaka, S., T. Okano, et al. (1998). "Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 273(35): 22284-91.
- Kandasamy, K., S. M. Srinivasula, et al. (2003). "Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release." *Cancer Res* 63(7): 1712-21.
- Kanzawa, T., Y. Kondo, et al. (2003). "Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide." *Cancer Res* 63(9): 2103-8.
- Karantza-Wadsworth, V., S. Patel, et al. (2007). "Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis." *Genes Dev* 21(13): 1621-35.
- Karantza-Wadsworth, V. and E. White (2007). "Role of autophagy in breast cancer." *Autophagy* 3(6): 610-3.
- Katajisto, P., T. Vollenius, et al. (2007). "The LKB1 tumor suppressor kinase in human disease." *Biochim Biophys Acta* 1775(1): 63-75.
- Kawai, T., S. Akira, et al. (2003). "ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains." *Mol Cell Biol* 23(17): 6174-86.
- Keith, C. T. and S. L. Schreiber (1995). "PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints." *Science* 270(5233): 50-1.
- Kelley, S. K. and A. Ashkenazi (2004). "Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL." *Curr Opin Pharmacol* 4(4): 333-9.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-57.
- Kihara, A., Y. Kabeya, et al. (2001). "Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network." *EMBO Rep* 2(4): 330-5.
- Kihara, A., T. Noda, et al. (2001). "Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* 152(3): 519-30.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, et al. (2003). "GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR." *Mol Cell* 11(4): 895-904.

- Kim, J., W. P. Huang, et al. (2001). "Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex." *J Cell Biol* 152(1): 51-64.
- Kim, K. W., R. W. Mutter, et al. (2006). "Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and mammalian target of rapamycin signaling." *J Biol Chem* 281(48): 36883-90.
- Kimberley, F. C. and G. R. Screaton (2004). "Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors." *Cell Res* 14(5): 359-72.
- Kirisako, T., M. Baba, et al. (1999). "Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast." *J Cell Biol* 147(2): 435-46.
- Kirisako, T., Y. Ichimura, et al. (2000). "The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway." *J Cell Biol* 151(2): 263-76.
- Kirkegaard, K., M. P. Taylor, et al. (2004). "Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms." *Nat Rev Microbiol* 2(4): 301-14.
- Kisen, G. O., L. Tessitore, et al. (1993). "Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells." *Carcinogenesis* 14(12): 2501-5.
- Klionsky, D. J., A. M. Cuervo, et al. (2007). "Methods for monitoring autophagy from yeast to human." *Autophagy* 3(3): 181-206.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." *Science* 290(5497): 1717-21.
- Ko, Y. H., S. Park, et al. (2007). "Granzyme B leakage-induced apoptosis is a crucial mechanism of cell death in nasal-type NK/T-cell lymphoma." *Lab Invest* 87(3): 241-50.
- Kochl, R., X. W. Hu, et al. (2006). "Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes." *Traffic* 7(2): 129-45.
- Koenig, U., L. Eckhart, et al. (2001). "Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene." *Biochem Biophys Res Commun* 285(5): 1150-4.
- Kohlhaas, S. L., A. Craxton, et al. (2007). "Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis." *J Biol Chem* 282(17): 12831-41.
- Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, et al. (2004). "The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore." *Nature* 427(6973): 461-5.

- Kreuz, S., D. Siegmund, et al. (2004). "NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP." *J Cell Biol* 166(3): 369-80.
- Kreuz, S., D. Siegmund, et al. (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." *Mol Cell Biol* 21(12): 3964-73.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, et al. (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1463-7.
- Krueger, A., I. Schmitz, et al. (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* 276(23): 20633-40.
- Kruyt, F. A. (2008). "TRAIL and cancer therapy." *Cancer Lett* 263(1): 14-25.
- Kunz, J., R. Henriquez, et al. (1993). "Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression." *Cell* 73(3): 585-96.
- Lackner, M. R., R. M. Kindt, et al. (2005). "Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors." *Cancer Cell* 7(4): 325-36.
- Lamparska-Przybysz, M., B. Gajkowska, et al. (2005). "Cathepsins and BID are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin." *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 3: 159-79.
- Land, H., L. F. Parada, et al. (1983). "Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes." *Nature* 304(5927): 596-602.
- Lawrence, J. C., Jr. and G. J. Brunn (2001). "Insulin signaling and the control of PHAS-I phosphorylation." *Prog Mol Subcell Biol* 26: 1-31.
- LeBlanc, H. N. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." *Cell Death Differ* 10(1): 66-75.
- Leicht, D. T., V. Balan, et al. (2007). "Raf kinases: function, regulation and role in human cancer." *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1196-212.
- Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8): 589-98.

- Lemasters, J. J. (1999). "V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis." *Am J Physiol* 276(1 Pt 1): G1-6.
- Letai, A. (2005). "Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death." *J Clin Invest* 115(10): 2648-55.
- Leverkus, M., M. Neumann, et al. (2000). "Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes." *Cancer Res* 60(3): 553-9.
- Levine, B. (2007). "Cell biology: autophagy and cancer." *Nature* 446(7137): 745-7.
- Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." *Dev Cell* 6(4): 463-77.
- Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." *Cell* 132(1): 27-42.
- Levine, B., S. Sinha, et al. (2008). "Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy." *Autophagy* 4(5): 600-6.
- Levine, B. and J. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" *J Clin Invest* 115(10): 2679-88.
- Li, D., Q. Cui, et al. (2007). "Inactivation of ras and changes of mitochondrial membrane potential contribute to oridonin-induced autophagy in a431 cells." *J Pharmacol Sci* 105(1): 22-33.
- Li, M., T. Kondo, et al. (2000). "Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca²⁺-calpain and caspase-mitochondria- dependent pathways." *J Biol Chem* 275(50): 39702-9.
- Liang, C., P. Feng, et al. (2006). "Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG." *Nat Cell Biol* 8(7): 688-99.
- Liang, C., J. S. Lee, et al. (2008). "Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking." *Nat Cell Biol* 10(7): 776-87.
- Liang, J., S. H. Shao, et al. (2007). "The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis." *Nat Cell Biol* 9(2): 218-24.
- Liang, X. H., S. Jackson, et al. (1999). "Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1." *Nature* 402(6762): 672-6.

- Liang, X. H., L. K. Kleeman, et al. (1998). "Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein." *J Virol* 72(11): 8586-96.
- Liang, X. H., J. Yu, et al. (2001). "Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function." *Cancer Res* 61(8): 3443-9.
- Lin, B., S. K. Kolluri, et al. (2004). "Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3." *Cell* 116(4): 527-40.
- Lin, Y., A. Devin, et al. (2000). "The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of I κ B kinase and c-Jun N-terminal kinase." *Mol Cell Biol* 20(18): 6638-45.
- Lindenboim, L., J. Yuan, et al. (2000). "Bcl-xS and Bax induce different apoptotic pathways in PC12 cells." *Oncogene* 19(14): 1783-93.
- Loewith, R., E. Jacinto, et al. (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." *Mol Cell* 10(3): 457-68.
- Lopez-Anton, N., A. Rudy, et al. (2006). "The marine product cephalostatin 1 activates an endoplasmic reticulum stress-specific and apoptosome-independent apoptotic signaling pathway." *J Biol Chem* 281(44): 33078-86.
- Lopez, J. M., A. F. Santidrian, et al. (2003). "5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in Jurkat cells, but the AMP-activated protein kinase is not involved." *Biochem J* 370(Pt 3): 1027-32.
- Lorberg, A. and M. N. Hall (2004). "TOR: the first 10 years." *Curr Top Microbiol Immunol* 279: 1-18.
- Lum, J. J., D. E. Bauer, et al. (2005). "Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis." *Cell* 120(2): 237-48.
- Lum, J. J., R. J. DeBerardinis, et al. (2005). "Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6): 439-48.
- Luo, J. and S. J. Elledge (2008). "Cancer: Deconstructing oncogenesis." *Nature* 453(7198): 995-6.
- Luo, S. and D. C. Rubinsztein (2007). "Atg5 and Bcl-2 provide novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy." *Cell Death Differ* 14(7): 1247-50.
- MacFarlane, M. (2003). "TRAIL-induced signalling and apoptosis." *Toxicol Lett* 139(2-3): 89-97.

- MacFarlane, M., N. Harper, et al. (2002). "Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia." *Oncogene* 21(44): 6809-18.
- MacFarlane, M., S. Inoue, et al. (2005). "Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1." *Cell Death Differ* 12(7): 773-82.
- Mailleux, A. A., M. Overholtzer, et al. (2008). "Lumen formation during mammary epithelial morphogenesis: insights from in vitro and in vivo models." *Cell Cycle* 7(1): 57-62.
- Mailleux, A. A., M. Overholtzer, et al. (2007). "BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms." *Dev Cell* 12(2): 221-34.
- Maiuri, M. C., G. Le Toumelin, et al. (2007). "Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1." *Embo J* 26(10): 2527-39.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9): 741-52.
- Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *Am J Pathol* 146(1): 3-15.
- Mann, S. S. and J. A. Hammarback (1994). "Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B." *J Biol Chem* 269(15): 11492-7.
- Mariani, S. M. and P. H. Krammer (1998). "Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage." *Eur J Immunol* 28(3): 973-82.
- Marignani, P. A. (2005). "LKB1, the multitasking tumour suppressor kinase." *J Clin Pathol* 58(1): 15-9.
- Martin, S. J. (2001). "Dealing the CARDs between life and death." *Trends Cell Biol* 11(5): 188-9.
- Martin, S. J. and D. R. Green (1995). "Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?" *Cell* 82(3): 349-52.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, et al. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." *J Exp Med* 182(5): 1545-56.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2004). "Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases." *Cell* 117(5): 561-74.

- Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." *Cell Death Differ* 14(1): 10-22.
- Marx, J. (2006). "Autophagy: is it cancer's friend or foe?" *Science* 312(5777): 1160-1.
- Mathew, R., S. Kongara, et al. (2007). "Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability." *Genes Dev* 21(11): 1367-81.
- Matsuura, A., M. Tsukada, et al. (1997). "Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* 192(2): 245-50.
- Mayer, C. and I. Grummt (2006). "Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases." *Oncogene* 25(48): 6384-91.
- McMurray, H. R., E. R. Sampson, et al. (2008). "Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype." *Nature* 453(7198): 1112-6.
- Medema, J. P., C. Scaffidi, et al. (1997). "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." *Embo J* 16(10): 2794-804.
- Meier, P., A. Finch, et al. (2000). "Apoptosis in development." *Nature* 407(6805): 796-801.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2006). "Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease." *Mol Aspects Med* 27(5-6): 411-25.
- Meijer, A. J. and P. F. Dubbelhuis (2004). "Amino acid signalling and the integration of metabolism." *Biochem Biophys Res Commun* 313(2): 397-403.
- Meley, D., C. Bauvy, et al. (2006). "AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis." *J Biol Chem* 281(46): 34870-9.
- Micheau, O., M. Thome, et al. (2002). "The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* 277(47): 45162-71.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* 114(2): 181-90.
- Mills, K. R., M. Reginato, et al. (2004). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3438-43.
- Miracco, C., E. Cosci, et al. (2007). "Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours." *Int J Oncol* 30(2): 429-36.
- Mirouse, V., L. L. Swick, et al. (2007). "LKB1 and AMPK maintain epithelial cell polarity under energetic stress." *J Cell Biol* 177(3): 387-92.

- Mizushima, N., A. Kuma, et al. (2003). "Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate." *J Cell Sci* 116(Pt 9): 1679-88.
- Mizushima, N., T. Noda, et al. (1998). "A protein conjugation system essential for autophagy." *Nature* 395(6700): 395-8.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, et al. (2001). "Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells." *J Cell Biol* 152(4): 657-68.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, et al. (2004). "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker." *Mol Biol Cell* 15(3): 1101-11.
- Momcilovic, M., S. P. Hong, et al. (2006). "Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro." *J Biol Chem* 281(35): 25336-43.
- Mor, A. and M. R. Philips (2006). "Compartmentalized Ras/MAPK signaling." *Annu Rev Immunol* 24: 771-800.
- Mordier, S., C. Deval, et al. (2000). "Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway." *J Biol Chem* 275(38): 29900-6.
- Mortimore, G. E. and A. R. Poso (1987). "Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply." *Annu Rev Nutr* 7: 539-64.
- Mortimore, G. E. and A. R. Poso (1988). "Amino acid control of intracellular protein degradation." *Methods Enzymol* 166: 461-76.
- Motyl, T., B. Gajkowska, et al. (2006). "Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy." *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 7: 17-32.
- Muhlenbeck, F., E. Haas, et al. (1998). "TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways." *J Biol Chem* 273(49): 33091-8.
- Muthuswamy, S. K., D. Li, et al. (2001). "ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini." *Nat Cell Biol* 3(9): 785-92.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." *Cell* 85(6): 817-27.

- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." *Mol Cell* 7(3): 683-94.
- Nakatogawa, H., Y. Ichimura, et al. (2007). "Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion." *Cell* 130(1): 165-78.
- Nechushtan, A., C. L. Smith, et al. (1999). "Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death." *Embo J* 18(9): 2330-41.
- Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, et al. (1999). "The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway." *Nature* 398(6724): 252-6.
- Noble, C. G., J. M. Dong, et al. (2008). "BCL-XL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in beclin1." *J Biol Chem*.
- Nobukuni, T., S. C. Kozma, et al. (2007). "hvps34, an ancient player, enters a growing game: mTOR Complex1/S6K1 signaling." *Curr Opin Cell Biol* 19(2): 135-41.
- Oberstein, A., P. D. Jeffrey, et al. (2007). "Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein." *J Biol Chem* 282(17): 13123-32.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* 288(5468): 1053-8.
- Ohsumi, Y. (2001). "Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 211-6.
- Oltersdorf, T., S. W. Elmore, et al. (2005). "An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours." *Nature* 435(7042): 677-81.
- Oppermann, H., A. D. Levinson, et al. (1979). "Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4): 1804-8.
- Orlinick, J. R., A. K. Vaishnav, et al. (1999). "Structure and function of Fas/Fas ligand." *Int Rev Immunol* 18(4): 293-308.
- Ortega-Camarillo, C., M. Diaz-Flores, et al. (2001). "[Apoptosis and its biomedical significance]." *Gac Med Mex* 137(6): 563-77.
- Orvedahl, A., D. Alexander, et al. (2007). "HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein." *Cell Host Microbe* 1(1): 23-35.
- Ozoren, N. and W. S. El-Deiry (2002). "Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL." *Neoplasia* 4(6): 551-7.

- Paglin, S., T. Hollister, et al. (2001). "A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles." *Cancer Res* 61(2): 439-44.
- Paglin, S., N. Y. Lee, et al. (2005). "Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells." *Cancer Res* 65(23): 11061-70.
- Pallet, N., N. Bouvier, et al. (2008). "Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity." *Autophagy* 4(6): 783-91.
- Panner, A., C. D. James, et al. (2005). "mTOR controls FLIPs translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells." *Mol Cell Biol* 25(20): 8809-23.
- Park, K. J., S. H. Lee, et al. (2007). "A human scFv antibody against TRAIL receptor 2 induces autophagic cell death in both TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant cancer cells." *Cancer Res* 67(15): 7327-34.
- Pattingre, S., A. Tassa, et al. (2005). "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy." *Cell* 122(6): 927-39.
- Pauley, R. J., H. D. Soule, et al. (1993). "The MCF10 family of spontaneously immortalized human breast epithelial cell lines: models of neoplastic progression." *Eur J Cancer Prev* 2 Suppl 3: 67-76.
- Pear, W. S., G. P. Nolan, et al. (1993). "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8392-6.
- Petiot, A., E. Ogier-Denis, et al. (2000). "Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells." *J Biol Chem* 275(2): 992-8.
- Petros, A. M., A. Medek, et al. (2001). "Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3012-7.
- Pettit, G. R., J. P. Xu, et al. (1994). "Isolation and structure of cephalostatins 10 and 11." *J Nat Prod* 57(1): 52-63.
- Pistritto, G., M. Jost, et al. (2002). "Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia." *Cell Death Differ* 9(9): 995-1006.
- Polekhina, G., A. Gupta, et al. (2003). "AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen." *Curr Biol* 13(10): 867-71.
- Prindull, G. (1995). "Apoptosis in the embryo and tumorigenesis." *Eur J Cancer* 31A(1): 116-23.
- Prins, J. B., E. C. Ledgerwood, et al. (1998). "Tumor necrosis factor-induced cytotoxicity is not related to rates of mitochondrial morphological abnormalities

- or autophagy-changes that can be mediated by TNFR-I or TNFR-II." *Biosci Rep* 18(6): 329-40.
- Proskuryakov, S. Y., V. L. Gabai, et al. (2002). "Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death." *Biochemistry (Mosc)* 67(4): 387-408.
- Puthalakath, H. and A. Strasser (2002). "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins." *Cell Death Differ* 9(5): 505-12.
- Puthalakath, H., A. Villunger, et al. (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." *Science* 293(5536): 1829-32.
- Pyo, J. O., M. H. Jang, et al. (2005). "Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death." *J Biol Chem* 280(21): 20722-9.
- Qu, X., J. Yu, et al. (2003). "Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene." *J Clin Invest* 112(12): 1809-20.
- Qu, X., Z. Zou, et al. (2007). "Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development." *Cell* 128(5): 931-46.
- Raff, M. C., B. A. Barres, et al. (1993). "Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system." *Science* 262(5134): 695-700.
- Raff, M. C., A. V. Whitmore, et al. (2002). "Axonal self-destruction and neurodegeneration." *Science* 296(5569): 868-71.
- Rasper, D. M., J. P. Vaillancourt, et al. (1998). "Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex." *Cell Death Differ* 5(4): 271-88.
- Ravikumar, B., Z. Berger, et al. (2006). "Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis." *Hum Mol Genet* 15(7): 1209-16.
- Reed, J. C. (1999). "Dysregulation of apoptosis in cancer." *J Clin Oncol* 17(9): 2941-53.
- Refaeli, Y., L. Van Parijs, et al. (1998). "Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis." *Immunity* 8(5): 615-23.
- Reggiori, F. (2006). "1. Membrane origin for autophagy." *Curr Top Dev Biol* 74: 1-30.
- Reggiori, F. and D. J. Klionsky (2005). "Autophagosomes: biogenesis from scratch?" *Curr Opin Cell Biol* 17(4): 415-22.

- Reggiori, F., K. A. Tucker, et al. (2004). "The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure." *Dev Cell* 6(1): 79-90.
- Reginato, M. J., K. R. Mills, et al. (2005). "Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes." *Mol Cell Biol* 25(11): 4591-601.
- Rez, G., S. Toth, et al. (1999). "Cellular autophagic capacity is highly increased in azaserine-induced premalignant atypical acinar nodule cells." *Carcinogenesis* 20(10): 1893-8.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11): 897-907.
- Rioux, J. D., R. J. Xavier, et al. (2007). "Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis." *Nat Genet* 39(5): 596-604.
- Rothe, M., M. G. Pan, et al. (1995). "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." *Cell* 83(7): 1243-52.
- Rothe, M., S. C. Wong, et al. (1994). "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor." *Cell* 78(4): 681-92.
- Rubinsztein, D. C., M. DiFiglia, et al. (2005). "Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair." *Autophagy* 1(1): 11-22.
- Rudy, A., N. Lopez-Anton, et al. (2008). "The cephalostatin way of apoptosis." *J Nat Prod* 71(3): 482-6.
- Ruiz de Almodovar, C., C. Ruiz-Ruiz, et al. (2001). "The differential sensitivity of Bc1-2-overexpressing human breast tumor cells to TRAIL or doxorubicin-induced apoptosis is dependent on Bc1-2 protein levels." *Oncogene* 20(48): 7128-33.
- Ruley, H. E. (1983). "Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture." *Nature* 304(5927): 602-6.
- Safina, A., M. Q. Ren, et al. (2008). "TAK1 is required for TGF-beta 1-mediated regulation of matrix metalloproteinase-9 and metastasis." *Oncogene* 27(9): 1198-207.
- Sakurai, H., H. Miyoshi, et al. (2000). "Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1." *FEBS Lett* 474(2-3): 141-5.

- Salomoni, P. and P. P. Pandolfi (2002). "The role of PML in tumor suppression." *Cell* 108(2): 165-70.
- Samari, H. R. and P. O. Seglen (1998). "Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, and N6-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of amp-activated protein kinase." *J Biol Chem* 273(37): 23758-63.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, et al. (2004). "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton." *Curr Biol* 14(14): 1296-302.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, et al. (2005). "Growing roles for the mTOR pathway." *Curr Opin Cell Biol* 17(6): 596-603.
- Sarkar, S., J. E. Davies, et al. (2007). "Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein." *J Biol Chem* 282(8): 5641-52.
- Sarkar, S., R. A. Floto, et al. (2005). "Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase." *J Cell Biol* 170(7): 1101-11.
- Sarkar, S., B. Ravikumar, et al. (2008). "Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies." *Cell Death Differ*.
- Sato, S., H. Sanjo, et al. (2005). "Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses." *Nat Immunol* 6(11): 1087-95.
- Sato, S., H. Sanjo, et al. (2006). "TAK1 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation of regulatory T cells." *Int Immunol* 18(10): 1405-11.
- Sattler, M., H. Liang, et al. (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." *Science* 275(5302): 983-6.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." *Nature* 407(6805): 784-8.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, et al. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." *J Biol Chem* 274(3): 1541-8.
- Scarlati, F., R. Maffei, et al. (2008). "Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells." *Cell Death Differ* 15(8): 1318-1329.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, et al. (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis." *Science* 300(5616): 135-9.

- Scott, J. W., S. A. Hawley, et al. (2004). "CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations." *J Clin Invest* 113(2): 274-84.
- Scott, R. C., O. Schuldiner, et al. (2004). "Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body." *Dev Cell* 7(2): 167-78.
- Schaefer, U., O. Voloshanenko, et al. (2007). "TRAIL: a multifunctional cytokine." *Front Biosci* 12: 3813-24.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, et al. (2007). "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4." *Embo J* 26(7): 1749-60.
- Schmelzle, T. and M. N. Hall (2000). "TOR, a central controller of cell growth." *Cell* 103(2): 253-62.
- Schmelzle, T., A. A. Mailloux, et al. (2007). "Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10): 3787-92.
- Schneider, P. and J. Tschopp (2000). "Apoptosis induced by death receptors." *Pharm Acta Helv* 74(2-3): 281-6.
- Schwarze, P. E. and P. O. Seglen (1985). "Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats." *Exp Cell Res* 157(1): 15-28.
- Schweichel, J. U. and H. J. Merker (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." *Teratology* 7(3): 253-66.
- Secchiero, P., A. Gonelli, et al. (2003). "TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways." *Circulation* 107(17): 2250-6.
- Secchiero, P. and G. Zauli (2008). "Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand and the regulation of hematopoiesis." *Curr Opin Hematol* 15(1): 42-8.
- Sefton, B. M., I. S. Trowbridge, et al. (1982). "The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid." *Cell* 31(2 Pt 1): 465-74.
- Seglen, P. O. and P. B. Gordon (1982). "3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(6): 1889-92.

- Shakib, M. and K. M. Zinn (1973). "Fine structure and function of ocular tissues. The choroid, Bruch's membrane, and the retinal pigment epithelium." *Int Ophthalmol Clin* 13(3): 189-204.
- Shaw, R. J., N. Bardeesy, et al. (2004). "The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling." *Cancer Cell* 6(1): 91-9.
- Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." *Nature* 441(7092): 424-30.
- Shaw, R. J., M. Kosmatka, et al. (2004). "The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3329-35.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Mol Cell* 9(3): 459-70.
- Shibata, M., T. Lu, et al. (2006). "Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1." *J Biol Chem* 281(20): 14474-85.
- Shibuya, H., H. Iwata, et al. (1998). "Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early *Xenopus* development." *Embo J* 17(4): 1019-28.
- Shields, J. M., K. Pruitt, et al. (2000). "Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'." *Trends Cell Biol* 10(4): 147-54.
- Shim, J. H., C. Xiao, et al. (2005). "TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo." *Genes Dev* 19(22): 2668-81.
- Shimizu, K., M. Goldfarb, et al. (1983). "Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(8): 2112-6.
- Shintani, T. and D. J. Klionsky (2004). "Autophagy in health and disease: a double-edged sword." *Science* 306(5698): 990-5.
- Shintani, T., N. Mizushima, et al. (1999). "Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast." *Embo J* 18(19): 5234-41.
- Siegel, R. M., F. K. Chan, et al. (2000). "The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity." *Nat Immunol* 1(6): 469-74.
- Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, et al. (2000). "Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations." *Science* 288(5475): 2354-7.
- Singhirunnusorn, P., S. Suzuki, et al. (2005). "Critical roles of threonine 187 phosphorylation in cellular stress-induced rapid and transient activation of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (TAK1) in a signaling

- complex containing TAK1-binding protein TAB1 and TAB2." *J Biol Chem* 280(8): 7359-68.
- Smyth, M. J., E. Cretney, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis." *J Exp Med* 193(6): 661-70.
- Soule, H. D., J. Vazquez, et al. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1409-16.
- Spierings, D. C., E. G. de Vries, et al. (2004). "Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors." *J Histochem Cytochem* 52(6): 821-31.
- Srinivasula, S. M. and J. D. Ashwell (2008). "IAPs: what's in a name?" *Mol Cell* 30(2): 123-35.
- Srivastava, A. K., X. Qin, et al. (2007). "Tumor necrosis factor-alpha augments matrix metalloproteinase-9 production in skeletal muscle cells through the activation of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (TAK1)-dependent signaling pathway." *J Biol Chem* 282(48): 35113-24.
- Strasser, A., L. O'Connor, et al. (2000). "Apoptosis signaling." *Annu Rev Biochem* 69: 217-45.
- Stromhaug, P. E. and P. O. Seglen (1993). "Evidence for acidity of prelysosomal autophagic/endocytic vacuoles (amphisomes)." *Biochem J* 291 (Pt 1): 115-21.
- Suzuki, K., T. Kirisako, et al. (2001). "The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation." *Embo J* 20(21): 5971-81.
- Suzuki, K., Y. Kubota, et al. (2007). "Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization." *Genes Cells* 12(2): 209-18.
- Suzuki, K. and Y. Ohsumi (2007). "Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 581(11): 2156-61.
- Takaesu, G., R. M. Surabhi, et al. (2003). "TAK1 is critical for I κ B kinase-mediated activation of the NF- κ B pathway." *J Mol Biol* 326(1): 105-15.
- Takahashi, Y., D. Coppola, et al. (2007). "Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis." *Nat Cell Biol* 9(10): 1142-51.
- Takeda, K., Y. Hayakawa, et al. (2001). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells." *Nat Med* 7(1): 94-100.

- Tamas, P., S. A. Hawley, et al. (2006). "Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca²⁺ in T lymphocytes." *J Exp Med* 203(7): 1665-70.
- Tanida, I., N. Minematsu-Ikeguchi, et al. (2005). "Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy." *Autophagy* 1(2): 84-91.
- Tanida, I., N. Mizushima, et al. (1999). "Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy." *Mol Biol Cell* 10(5): 1367-79.
- Tanida, I., Y. S. Sou, et al. (2004). "HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates." *J Biol Chem* 279(35): 36268-76.
- Tanida, I., Y. S. Sou, et al. (2006). "Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3." *Febs J* 273(11): 2553-62.
- Tanida, I., E. Tanida-Miyake, et al. (2002). "Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p." *J Biol Chem* 277(16): 13739-44.
- Tanida, I., E. Tanida-Miyake, et al. (2001). "The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3." *J Biol Chem* 276(3): 1701-6.
- Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, et al. (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." *Cell* 74(5): 845-53.
- Tassa, A., M. P. Roux, et al. (2003). "Class III phosphoinositide 3-kinase--Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes." *Biochem J* 376(Pt 3): 577-86.
- Templeton, G. W. and G. B. Moorhead (2005). "The phosphoinositide-3-OH-kinase-related kinases of *Arabidopsis thaliana*." *EMBO Rep* 6(8): 723-8.
- Terada, N., H. R. Patel, et al. (1994). "Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(24): 11477-81.
- Thomas, G. and M. N. Hall (1997). "TOR signalling and control of cell growth." *Curr Opin Cell Biol* 9(6): 782-7.

- Thome, M., P. Schneider, et al. (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." *Nature* 386(6624): 517-21.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science* 267(5203): 1456-62.
- Thorburn, J., F. Moore, et al. (2005). "Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells." *Mol Biol Cell* 16(3): 1189-99.
- Thornberry, N. A. (1997). "The caspase family of cysteine proteases." *Br Med Bull* 53(3): 478-90.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* 281(5381): 1312-6.
- Thornberry, N. A., T. A. Rano, et al. (1997). "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis." *J Biol Chem* 272(29): 17907-11.
- Toth, S., K. Nagy, et al. (2002). "Cellular autophagic capacity changes during azaserine-induced tumour progression in the rat pancreas. Up-regulation in all premalignant stages and down-regulation with loss of cycloheximide sensitivity of segregation along with malignant transformation." *Cell Tissue Res* 309(3): 409-16.
- Truneh, A., S. Sharma, et al. (2000). "Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor." *J Biol Chem* 275(30): 23319-25.
- Tsujimoto, Y. (2003). "Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria." *J Cell Physiol* 195(2): 158-67.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 333(1-2): 169-74.
- Upton, J. P., K. Austgen, et al. (2008). "Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress." *Mol Cell Biol* 28(12): 3943-51.
- Urano, T., R. Emkey, et al. (1996). "Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation." *Embo J* 15(4): 810-6.

- Varfolomeev, E., J. W. Blankenship, et al. (2007). "IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis." *Cell* 131(4): 669-81.
- Varfolomeev, E., H. Maecker, et al. (2005). "Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." *J Biol Chem* 280(49): 40599-608.
- Varfolomeev, E., S. M. Wayson, et al. (2006). "The inhibitor of apoptosis protein fusion c-IAP2.MALT1 stimulates NF-kappaB activation independently of TRAF1 AND TRAF2." *J Biol Chem* 281(39): 29022-9.
- Varfolomeev, E. E. and A. Ashkenazi (2004). "Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?" *Cell* 116(4): 491-7.
- Varmus, H., H. Hirai, et al. (1989). "Function, location, and regulation of the src protein-tyrosine kinase." *Princess Takamatsu Symp* 20: 63-70.
- Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer (1999). "Cell death in development." *Cell* 96(2): 245-54.
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." *Science* 294(5545): 1299-304.
- Vezina, C., A. Kudelski, et al. (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle." *J Antibiot (Tokyo)* 28(10): 721-6.
- Viana, R., C. Aguado, et al. (2008). "Role of AMP-activated protein kinase in autophagy and proteasome function." *Biochem Biophys Res Commun* 369(3): 964-8.
- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." *Nat Rev Cancer* 2(8): 594-604.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." *Cell Death Differ* 10(1): 45-65.
- Walczak, H., R. E. Miller, et al. (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nat Med* 5(2): 157-63.
- Walensky, L. D. (2006). "BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death." *Cell Death Differ* 13(8): 1339-50.
- Wallach, D., E. E. Varfolomeev, et al. (1999). "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms." *Annu Rev Immunol* 17: 331-67.

- Wang, E. and A. R. Goldberg (1976). "Changes in microfilament organization and surface topography upon transformation of chick embryo fibroblasts with Rous sarcoma virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(11): 4065-9.
- Wang, L., F. Du, et al. (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." *Cell* 133(4): 693-703.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 15(22): 2922-33.
- Wang, Y., R. Singh, et al. (2008). "Loss of macroautophagy promotes or prevents fibroblast apoptosis depending on the death stimulus." *J Biol Chem* 283(8): 4766-77.
- Wang, Z., W. A. Wilson, et al. (2001). "Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p." *Mol Cell Biol* 21(17): 5742-52.
- Wang, Z. H., L. Xu, et al. (2007). "Beclin 1-mediated macroautophagy involves regulation of caspase-9 expression in cervical cancer HeLa cells." *Gynecol Oncol* 107(1): 107-13.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, et al. (1992). "The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen." *J Immunol* 148(4): 1274-9.
- Webber, J. L., A. R. Young, et al. (2007). "Atg9 trafficking in Mammalian cells." *Autophagy* 3(1): 54-6.
- Wei, M. C., T. Lindsten, et al. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." *Genes Dev* 14(16): 2060-71.
- Wei, Y., S. Pattingre, et al. (2008). "JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy." *Mol Cell* 30(6): 678-88.
- Werneburg, N. W., M. E. Guicciardi, et al. (2007). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins." *J Biol Chem* 282(39): 28960-70.
- Wiley, S. R., K. Schooley, et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." *Immunity* 3(6): 673-82.
- Wilson, T. R., K. M. McLaughlin, et al. (2007). "c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death." *Cancer Res* 67(12): 5754-62.
- Williams, A., S. Sarkar, et al. (2008). "Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway." *Nat Chem Biol* 4(5): 295-305.

- Williams, T. and J. E. Brenman (2008). "LKB1 and AMPK in cell polarity and division." *Trends Cell Biol* 18(4): 193-8.
- Wood, D. E. and E. W. Newcomb (1999). "Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis." *J Biol Chem* 274(12): 8309-15.
- Woods, A., K. Dickerson, et al. (2005). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." *Cell Metab* 2(1): 21-33.
- Wu, G. S., T. F. Burns, et al. (1999). "Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor." *Cancer Res* 59(12): 2770-5.
- Wu, H., J. M. Yang, et al. (2006). "Elongation factor-2 kinase regulates autophagy in human glioblastoma cells." *Cancer Res* 66(6): 3015-23.
- Wu, J., Y. Dang, et al. (2006). "Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B--two novel markers of autophagosome." *Biochem Biophys Res Commun* 339(1): 437-42.
- Wu, Y., J. W. Mehew, et al. (2001). "Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells." *Oncogene* 20(2): 240-51.
- Wullschleger, S., R. Loewith, et al. (2005). "Molecular organization of target of rapamycin complex 2." *J Biol Chem* 280(35): 30697-704.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1972). "Cellular events in the adrenal cortex following ACTH deprivation." *J Pathol* 106(1): Pix.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Xie, M., D. Zhang, et al. (2006). "A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46): 17378-83.
- Xie, Z. and D. J. Klionsky (2007). "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." *Nat Cell Biol* 9(10): 1102-9.
- Xie, Z., U. Nair, et al. (2008). "Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation." *Mol Biol Cell*.
- Yamaguchi, K., K. Shirakabe, et al. (1995). "Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction." *Science* 270(5244): 2008-11.
- Yang, X., H. Y. Chang, et al. (1998). "Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis." *Science* 281(5381): 1355-7.

- Yang, Y., S. Fang, et al. (2000). "Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli." *Science* 288(5467): 874-7.
- Yorimitsu, T. and D. J. Klionsky (2007). "Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy." *Trends Cell Biol* 17(6): 279-85.
- Yousefi, S., R. Perozzo, et al. (2006). "Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis." *Nat Cell Biol* 8(10): 1124-32.
- Yu, L., F. Wan, et al. (2006). "Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13): 4952-7.
- Yuan, J., M. Lipinski, et al. (2003). "Diversity in the mechanisms of neuronal cell death." *Neuron* 40(2): 401-13.
- Yue, Z., A. Horton, et al. (2002). "A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice." *Neuron* 35(5): 921-33.
- Yue, Z., S. Jin, et al. (2003). "Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15077-82.
- Zeh, H. J., 3rd and M. T. Lotze (2005). "Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death." *J Immunother* 28(1): 1-9.
- Zeng, X., J. H. Overmeyer, et al. (2006). "Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking." *J Cell Sci* 119(Pt 2): 259-70.
- Zhivotovsky, B. and S. Orrenius (2005). "Caspase-2 function in response to DNA damage." *Biochem Biophys Res Commun* 331(3): 859-67.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." *Pharmacol Ther* 92(1): 57-70.
- Zong, W. X., T. Lindsten, et al. (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." *Genes Dev* 15(12): 1481-6.
- Zong, W. X. and C. B. Thompson (2006). "Necrotic death as a cell fate." *Genes Dev* 20(1): 1-15.
- Zoratti, M. and I. Szabo (1995). "The mitochondrial permeability transition." *Biochim Biophys Acta* 1241(2): 139-76.

X. ANEXO: *Publicaciones*

1. Artículo relacionado con la tesis

TAK1 activates AMPK and AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells

Griselda Herrero-Martín^{1,2*}, Maria Høyer-Hansen^{2*}, Celina García-García¹, Claudia Fumarola³, Lone Bastholm⁴, Thomas Farkas², Abelardo López-Rivas^{1†} and Marja Jäättelä^{2†}

¹Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Américo Vespucio s/n, 41092-Sevilla, Spain, ²Apoptosis Department and Centre for Genotoxic Stress Research, Institute for Cancer Biology, Danish Cancer Society, DK-2100 Copenhagen, Denmark, ³Department of Experimental Medicine, Division of Molecular Pathology and Immunology. University of Parma, Parma 43100, Italy, and ⁴Institute of Molecular Pathology, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, 2100 Copenhagen, Denmark

*These authors contributed equally to this work

†These authors share the senior authorship

Correspondence should be addressed to:

A.L-R.: Phone: +34-954467997; Fax: +34-954461664; e-mail: abelardo.lopez@cabimer.es) and M.J.: Phone: +45-35257318; +45-35257721; e-mail: mj@cancer.dk

Running title: TAK1 activates AMPK and cytoprotective autophagy

The capacity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to trigger apoptosis preferentially in cancer cells while sparing normal cells has motivated clinical development of TRAIL receptor agonists as anti-cancer therapeutics.¹ The molecular mechanisms responsible for the differential TRAIL sensitivity of normal and cancer cells are, however, poorly understood. Here, we reveal a novel signalling pathway that activates cytoprotective autophagy in untransformed human epithelial cells treated with TRAIL. TRAIL-induced autophagy is mediated by the AMP-activated protein kinase (AMPK) that inhibits mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), a potent inhibitor of autophagy. Interestingly, the TRAIL-induced AMPK activation is refractory to the depletion of the two known AMPK activating kinases, LKB1 and Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase kinase- β , but depends on transforming growth factor- β -activating kinase 1 (TAK1). Thus, TAK1 can act as an LKB1- and CaMKK β -independent activator of AMPK and AMPK-dependent cytoprotective autophagy. Because TAK1 and AMPK are ubiquitously expressed kinases activated by numerous cytokines and developmental cues,^{2, 3} these data are likely to have broad implications for our understanding of cellular control of energy homeostasis as well as the resistance of untransformed cells against TRAIL-induced apoptosis.

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a lysosomal pathway involved in the turnover of long-lived proteins, cytoplasm and whole organelles.⁴⁻⁷ In unstressed cells autophagy is inhibited by the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1). The inhibition of mTORC1 activity (e.g. by starvation or rapamycin) leads to the activation of a set of evolutionarily conserved autophagy-regulating proteins (Atg proteins) and formation of autophagosomes that then fuse with lysosomes to form autolysosomes, in which the cargo is digested to metabolites and released back to the cytosol for recycling. Accumulating evidence indicates that autophagy can function as an adaptive cell response allowing the cell to survive otherwise lethal challenges by removing damaged organelles and misfolded proteins. Paradoxically, autophagy can also mediate a non-apoptotic type II cell death, called autophagic degeneration.

Prompted by the data showing that TRAIL is upregulated during breast morphogenesis and induces accumulation of autophagic vacuoles during lumen formation in an *in vitro* morphogenesis model,⁸ we hypothesized that autophagy may either contribute to the TRAIL-induced lumen formation by facilitating cell death or it may explain the TRAIL resistance of normal cells. In order to study the effect of TRAIL-induced accumulation of autophagosomes in greater detail, we created MCF10A cells (immortalized human breast epithelial cells) stably expressing the autophagosome-associated protein LC3 (also known as Atg8) fused to enhanced green fluorescent protein (eGFP-LC3). In the majority of untreated MCF10A cells, the eGFP-LC3 was diffusely distributed in the cytosol and nucleus, and only approximately 5% of the cells displayed a dotted staining pattern of eGFP-LC3 (≥ 5 dots/cross-section) indicative of the accumulation of autophagosomes (Fig 1A). TRAIL treatment increased the number of cells with autophagosome accumulation to the level comparable to that seen in rapamycin-treated control cells, whereas the highly

related cytokine TNF had no detectable effect on the eGFP-LC3 distribution (Fig. 1A). Flow cytometry-based analysis revealed TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2; also known as death receptor 5) on the surface of MCF10A cells, whereas TRAIL-R1 (also known as death receptor 4) expression was under the detection limit of the assay (see supplementary information Fig. S1A online). Accordingly, an antagonistic TRAIL-R2 antibody effectively inhibited TRAIL-induced autophagosomes accumulation in MCF10A cells (Fig. 1A). This antibody also inhibited TRAIL-induced cell death in MCF10A cells sensitized to TRAIL-induced cytotoxicity by a protein synthesis inhibitor cycloheximide (see supplementary information Fig. S1B online). Thus, TRAIL-R2 is capable of activating signalling pathways leading to both autophagosome accumulation and cell death.

In order to test whether the TRAIL-induced autophagosome accumulation was mediated by the known core autophagy machinery, we inhibited the autophagy pathway by pharmacological inhibitors and RNA interference. Co-treatment with 3-methyladenine (3-MA), an inhibitor of class III phosphoinositide 3-kinase (PI3K), that is required for the autophagosome membrane assembly as well as the siRNA-based depletion of two essential autophagy proteins beclin 1 or Atg7 effectively blocked TRAIL-induced eGFP-LC3-translocation (Fig. 1A and B). Importantly, TRAIL treatment also induced the accumulation of autophagosomes and autolysosomes as detected by transmission electron microscopy (Fig. 1C), the appearance of LC3-II, a structural component of autophagosomes (Fig. 1D), and the degradation of long-lived proteins (Fig. 1E). These data indicate that the LC3 translocation observed in TRAIL-treated MCF10A cells was dependent on the classic autophagy pathway and reflected an increase in functional autophagy.

TRAIL-induced autophagosome formation was significant as early as 6 h after the addition of 500 ng/ml TRAIL and increased continuously during a 72 h treatment period (see supplementary information Fig. S2A online). Furthermore, the response was dose-dependent at TRAIL concentrations ranging from 10 to 500 ng/ml (see supplementary information Fig. S2A online). Notably, TRAIL failed to induce significant cell death in MCF10A cells within these time and concentration ranges, but the inhibition of autophagy by depletion of beclin 1 or Atg7 significantly sensitized the cells to TRAIL-induced cell death as analyzed by flow cytometry-based quantification of cells with reduced DNA content and detection of floating dead cells by microscopy (Fig. 1F and data not shown). The cytoprotective nature of TRAIL-induced autophagy suggests that it does not contribute to the lumen formation during breast morphogenesis but rather opposes it by inhibiting cell death. Accordingly, autophagy inhibition by depletion of Atg5 or Atg7 has recently been shown to enhance luminal apoptosis in an MCF10A breast morphogenesis model.⁹

The molecular mechanisms governing TRAIL-induced autophagy have remained unexplored. In order to test whether TRAIL-induced autophagy was associated with the inhibition of mTORC1 kinase complex, a key negative regulator of autophagy in unstressed cells, we measured the phosphorylation level of an mTORC1 substrate, ribosomal protein S6 kinase 1 (p70^{S6K}). Remarkably, TRAIL inhibited the phosphorylation of p70^{S6K} as effectively as rapamycin, a direct inhibitor of mTORC1 (Fig 2A). AMP-activated protein kinase (AMPK), an evolutionarily highly conserved regulator of cellular energy homeostasis,^{3, 10} has recently emerged as a putative activator of autophagy.¹¹⁻¹³ The AMPK-mediated autophagy inhibition may occur via two distinct signalling pathways that

lead to the inhibition of mTORC1.¹⁴⁻¹⁶ AMPK-mediated phosphorylation of tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) leads to the activation of an mTORC1 inhibitor ras-family GTP-binding protein RHEB, whereas that of a mTOR binding partner raptor triggers the binding of raptor to 14-3-3 proteins and subsequent inhibition of the ability of mTORC1 to recruit downstream substrates. Thus, we next tested whether AMPK was activated in TRAIL-treated MCF10A cells. Interestingly, TRAIL induced a rapid (detectable at 1 min), sustained (until 24 h) and dose-dependent (10 – 500 ng/ml) activation of AMPK as demonstrated by an increase in the phosphorylation of an AMPK substrate acetyl-CoA-carboxylase (ACC) (Fig. 2B, 2C and S2B). Furthermore, the depletion of the catalytic α 1-subunit of AMPK by RNA interference in TRAIL-treated MCF10A cells restored the mTORC1 activity, attenuated autophagosome formation and sensitized the cells to TRAIL-induced cell death indicating that AMPK α 1 mediates the TRAIL-induced cytoprotective autophagy (Fig. 2D and E). Even though TRAIL has been reported to activate several kinases,¹⁷ to our knowledge these data are the first to report the ability of TRAIL to activate AMPK. Furthermore, the data presented above provide the first genetic evidence that endogenous AMPK, and more precisely AMPK α 1, is an essential mediator of autophagy in mammalian cells.

AMPK can be phosphorylated and activated by tumor suppressor kinase LKB1 when the ratio of AMP/ATP increases and by calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β (CaMKK β) in response to an increase in the cytosolic free calcium $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$.¹⁸⁻²¹ Accordingly, LKB1 and CaMKK β have been reported to mediate autophagy in response to starvation and an increase in the $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, respectively.^{13, 22} Thus, we next studied whether these AMPK kinases were responsible for the TRAIL-induced activation of AMPK and

autophagy. Even though the siRNAs used effectively depleted LKB1 and CaMKK β and completely inhibited the AMPK activation and autophagosome accumulation in starved and ionomycin-treated MCF10A cells, respectively, their depletion influenced neither TRAIL-induced AMPK activation nor autophagy (Fig. 3A-C). In spite of some residual LKB1 and CaMKK β in the siRNA-treated cells, the complete inability of the cells to activate AMPK and autophagosome accumulation upon starvation and ionomycin strongly suggests that TRAIL activates AMPK by a pathway independent of the two known AMPK kinases. Thus, it is interesting to note that TAK1, a cytokine-activated member of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase family, has recently been shown to activate the yeast AMPK homologue Snf1 *in vivo* and mammalian AMPK *in vitro* suggesting that it could act as a third mammalian AMPK kinase.²³ To investigate the possible role of TAK1 in TRAIL-induced AMPK activation and autophagy, we first examined the effect of TRAIL on TAK1 activation in MCF10A cells by determining TAK1 phosphorylation at Thr184/187, an essential step for the complete kinase activation.²⁴ Remarkably, TRAIL induced a rapid (detectable at 5 min), sustained (until 24 h) and dose-dependent activation of TAK1 that closely correlated with the activation of the AMPK (Fig. 4A, 4B and S2B). Notably, siRNA-based depletion of TAK1 effectively abrogated TRAIL-induced AMPK activation, mTORC1 inhibition and autophagosome formation (Fig. 4B and C), whereas AMPK α 1 depletion did not affect TRAIL-induced phosphorylation of TAK1 (see supplementary information Fig. S3 online). Furthermore, TAK1 and AMPK activation as well as mTORC1 inhibition were completely inhibited by the antagonistic TRAIL-R2 receptor (see supplementary information Fig. S1B online). Thus, TAK1 is an essential mediator of TRAIL-R2-induced AMPK activation and autophagy in MCF10A cells. Moreover, TAK1-depleted cells were greatly sensitized to TRAIL-induced cell death

further highlighting the importance of the TRAIL-induced autophagy pathway in determining the cellular outcome in response to TRAIL treatment (Fig. 3F).

The downstream signalling pathways activated by TAK1 vary greatly depending on the cell type and the stimulus.² In order to investigate whether the ability of TRAIL to activate the cytoprotective TAK1-AMPK pathway was restricted to breast epithelial cells, we included human hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cells (hTERT-RPE-1) to this study. TRAIL activated AMPK and autophagosome formation in a TAK1-dependent manner also in these cells (Fig. 5A-C). Importantly, the inhibition of AMPK activation and autophagosome accumulation by TAK1 siRNA greatly sensitized the hTERT-RPE-1 cells to TRAIL-induced cell death (Fig. 5C). Moreover, knock-in of a dominant negative TAK1 mutant in murine embryonic fibroblasts (MEFs) reduced the TRAIL-induced activation of AMPK observed in wild type MEFs and sensitized the cells to TRAIL-induced cell death (Fig. 5D and E). These data further emphasize the role of TAK1 as an activator of AMPK and are in concordance with recent data showing that TAK1-deficient MEFs fail to activate AMPK in response to oligomycin, metformin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside.²⁵ Based on data showing that these drugs fail to activate the AMPK kinase LKB1 in TAK1 deficient cells, Xie and coworkers have suggested that TAK1 functions upstream of LKB1 rather than as a direct AMPK kinase. It should be noted that this study did not test whether TAK1 could activate AMPK1 and LKB1 in parallel. Furthermore, another pharmacological AMPK activator (A-769662) activates AMPK in LKB1-deficient cervix carcinoma cells, but fails to activate it in LKB1-deficient skeletal muscle cells suggesting that the requirements for the AMPK activation may be cell type specific.²⁶ Our data showing that TRAIL-induced AMPK activation was not affected

by an effective depletion of LKB1 indicates that in TRAIL-treated MCF10A cells TAK1 activates AMPK independent of LKB1. It remains, however, to be studied whether TAK1 is a direct activator of AMPK in this model system. However, its ability to mediate AMPK – mTORC1–autophagy pathway independent of the two known AMPK kinases together with its previously demonstrated capacity to directly activate AMPK *in vitro* support the idea that it may function as an AMPK kinase in TRAIL-treated cells.²³

AMPK sits at a unique position as a proposed energy and stress sensor that can interact with diverse signalling molecules and control processes ranging from macromolecule synthesis to cell polarity and autophagy.^{3, 27, 28} Hitherto, LKB1 and CaMKK β have been identified as AMPK kinases in response to low AMP levels and an increase in the $[Ca^{2+}]_{cyt}$, respectively. Our data add TRAIL-induced TAK1 activation as a third independent signalling pathway capable of activating AMPK. Interestingly, all three signalling pathways leading to AMPK activation can induce autophagy suggesting that AMPK functions as a universal autophagy activator that can integrate information from various environmental and developmental cues via at least three different signalling pathways.

Despite the potential of TRAIL receptors as targets for cancer therapy, little is known about the mechanisms regulating the differential sensitivity of normal and tumour cells to TRAIL-induced cytotoxicity.¹ The data presented above suggest that the TRAIL-induced TAK1-AMPK signalling pathway leading to an increase in autophagic activity contributes to the protection of normal epithelial cells against TRAIL-induced cell death. Recent data showing that TRAIL can induce cytoprotective autophagy also in apoptosis-defective cancer cells suggest that TRAIL-induced apoptosis overrides the ability of TRAIL to

trigger autophagy in cancer cells.²⁹ Because the TRAIL-induced cytoprotective autophagy in apoptosis resistant cancer cells may inspire combination therapies with TRAIL and autophagy inhibitors, it should be emphasized that the data presented here suggest that the clinical safety of TRAIL receptor agonists may depend on their ability to activate cytoprotective autophagy in normal tissues and thereby strongly argue against such combination therapies.

METHODS

Cell culture and treatments

The MCF10A breast epithelial cells expressing an ecotropic receptor and eGFP-LC3 fusion protein were described previously.¹³ The human hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cell line hTERT-RPE-1 was kindly provided by Dr. R. M. Rios (CABIMER, Sevilla, Spain) and transfected with pEGFP-LC3 plasmid¹³ to generate a stable pool of hTERT-RPE1-GFP-LC3 cells. The immortalized MEFs from knock-in mice expressing an inactive TAK1 mutant (TAK1 Δ) together with the appropriate wild type MEFs were kindly provided by Dr. S. Akira (Osaka University, Osaka, Japan).³⁰

Recombinant human TRAIL was produced as described previously,³¹ and human TNF was kindly provided by Anthony Cerami (Kenneth Warren Laboratories, Tarrytown, NY, USA). Rapamycin, Ionomycin, Pepstatin-A, E64d and 3-MA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada), Hanks balanced salt solution (HBSS) starvation medium from GIBCO (California, USA), and monoclonal antagonist antibody to TRAIL-R2 (HS201, preservative free) from Alexis Biochemicals Corp. (San Diego, CA, USA).

RNA interference

Cells were transfected with indicated siRNAs at 50 nM (except for TAK1 siRNA that was used at 10 nM) employing DharmaFECT transfection agent (Dharmacon Research, CO) according to manufacture's guidelines. siRNAs corresponding to the human cDNA sequences were as follows: Beclin-1 (5'-CAGTTTGGCACAATCAATAAtt-3'), LKB1 (5'-CUGGUGGAUGUGUUAUACAtt-3') and a control siRNA (5'-CGACCGAGACAAGCGCAAGtt-3') from Dharmacon Research (Colorado, USA); CaMKK β (5'-GGAUCUGAUCAAAGGCAUCtt-3') and TAK-1#1 (5'-

GGAGAUCGAGGUGGAAGAGtt-3') from Ambion (California, USA); TAK1#2 (5'-UGGCUUAUCUUACACUGGAtt-3'), AMPK α 1#1 (5'-UGCCUACCAUCUCAUAAUAtt-3'), AMPK α 1#2 (5'-CCUCAAGCUUUUCAGGCAUtt-3') and control siRNA (5'-CUUUGGGUGAUCUACGUUAtt-3') from Sigma Proligo (St. Louise, MO, USA); Atg7#1 (5'-CAGUGGAUCUAAAUCUCAACUGAUtt-3') and Atg7#2 (5'-AAGGAGUCACAGCUCUCCUtt-3') from Invitrogen.

Autophagy and cell death detection

The percentage of cells with eGFP-LC3 translocation into dots (a minimum of 100 cells/sample) was counted in eGFP-LC3 expressing cells fixed in 3.7% formaldehyde and 0.19% picric acid (vol/vol) applying Zeiss Axiovert 100 M Confocal Laser Scanning Microscope. Cross-sections with over five dots were considered positive. Long-lived protein degradation assay and transmission electron microscopy were determined as previously described.³²

Hypodiploid apoptotic cells (sub-G1) were detected by flow cytometry as described previously³³ and cell death was detected by lactate dehydrogenase (LDH) release assay (Roche) essentially as described previously.³⁴

Immunoblotting

Immunoblotting was performed according to standard protocols. For the detection of LC3-I and LC3-II, the samples were treated with 10 μ g/ml pepstatin A and 10 μ g/ml E64d for the last 4 h before the lysis. Quantification of Western blot signals was performed by densitometry with ImageQuant TL software after scanning the films on ImageScanner II (GE Healthcare). The relative expression of proteins was normalized to

that of loading controls. The values are expressed as percentages of the expression levels in control cells that were arbitrarily set to 100%. The primary antibodies used for immunoblot analysis included murine monoclonal antibodies against beclin-1 (clone 20; BD) and Ras from Transduction Laboratories (New Jersey, USA), GAPDH from Biogenesis (Poole, UK), P-p70S6K (#9206) from Cell Signaling Technology (Inc, Danvers, MA), LKB1 from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), LC3 from NanoTools (Germany) and tubulin from Sigma as well as rabbit polyclonals against p70S6K (# 9202), AMPK (#2603), p-AMPK (#2535), p-ACC (#3661), p-TAK1 (#4508) and TAK-1 (#4505) from Cell Signaling Technology (Inc, Danvers, MA), c-Src from Abcam (UK) and Atg7 from ProSci Incorporated (Poway, CA, USA). Appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies from DAKO A/S (Glostrup, Denmark) and ECL immunoblotting reagents were from Millipore corporation (Billerica, MA).

The expression levels of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 receptors were determined by a standard flow cytometry protocol using monoclonal antibodies to TRAIL-R1 (HS101) and TRAIL-R2 (HS201) from Alexis Biochemicals Corp. (San Diego, CA, USA).

RT-PCR

RT-PCR was performed according to standard protocols. The following human primers were applied: CaMKK β : 5'-AGACCAGGCCCGTTTCTACT-3' and 5'-GAAGATCTTGCGGGTCTCAG-3'; Actin: 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3' and 5'-CATGAAGCATTGCGGGTGGACGATGGAGGG-3'.

Statistical analysis

Independent experiments were pooled when the coefficient of variance could be assumed identical. Statistical significance was evaluated by using one or two sample t-test (n= number of independent experiments). *P* values of under 0.05 were considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank K. Grøn Henriksen, J. Henriksen, A. López and D. Sánchez for excellent technical assistance and A.Cerami and R.M. Ríos for invaluable research tools. We are grateful to R. Yerbes, G. Ortiz-Ferrón, M. Pozuelo, A. Vela, C. Palacios and M. Rohde for stimulating discussions. The work was supported by grants from the Danish Cancer Society and Novo Nordisk Foundation (MJ and MHH); Danish National Research Foundation, Danish Medical Research Council, European Commission FP7 (APO-SYS) and Meyer Foundation (MJ); and Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) grant SAF2006-00633 and Junta de Andalucía grant CTS-211 (AL-R). GH-R and CG-G were supported by fellowships from MEC and Consejo Superior de Investigaciones Científicas, respectively.

REFERENCES

1. Ashkenazi, A. & Herbst, R. S. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest* 118, 1979-90 (2008).
2. Delaney, J. R. & Mlodzik, M. TGF-beta activated kinase-1: new insights into the diverse roles of TAK1 in development and immunity. *Cell Cycle* 5, 2852-5 (2006).
3. Hardie, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 774-785 (2007).
4. Lum, J. J., DeBerardinis, R. J. & Thompson, C. B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 439-48 (2005).
5. Codogno, P. & Meijer, A. J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1509-18 (2005).
6. Kroemer, G. & Jäätelä, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5, 886-97 (2005).
7. Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9, 1102-1109 (2007).
8. Mills, K. R., Reginato, M., Debnath, J., Queenan, B. & Brugge, J. S. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3438-43 (2004).
9. Fung, C., Lock, R., Gao, S., Salas, E. & Debnath, J. Induction of Autophagy During Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival. *Mol Biol Cell* (2007).
10. Witters, L. A., Kemp, B. E. & Means, A. R. Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends Biochem Sci* 31, 13-6 (2006).
11. Kamada, Y., Sekito, T. & Ohsumi, Y. Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol* 279, 73-84 (2004).
12. Meley, D. et al. AMP-activated Protein Kinase and the Regulation of Autophagic Proteolysis. *J Biol Chem* 281, 34870-9 (2006).
13. Høyer-Hansen, M. et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase- β and Bcl-2. *Mol Cell* 25, 193-205 (2007).
14. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K. L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577-90 (2003).
15. Shaw, R. J. et al. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 6, 91-9 (2004).
16. Gwinn, D. M. et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30, 214-26 (2008).
17. Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. & Walczak, H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1462-75 (2007).
18. Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R. A. & Guan, K. L. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev* 18, 1533-8 (2004).
19. Shaw, R. J. et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3329-35 (2004).

20. Hawley, S. A. et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2, 9-19 (2005).
21. Woods, A. et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2, 21-33 (2005).
22. Liang, J. et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 9, 218-24 (2007).
23. Momcilovic, M., Hong, S. P. & Carlson, M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* 281, 25336-43 (2006).
24. Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J. & Sugita, T. Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* 474, 141-5 (2000).
25. Xie, M. et al. A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17378-17383 (2006).
26. Goransson, O. et al. Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 282, 32549-60 (2007).
27. Brenman, J. E. AMPK/LKB1 signaling in epithelial cell polarity and cell division. *Cell Cycle* 6, 2755-9 (2007).
28. Høyer-Hansen, M. & Jäättelä, M. AMP-activated protein kinase - a universal regulator of autophagy? *Autophagy* 3, 381-383 (2007).
29. Han, J. et al. Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. *J Biol Chem* 283, 19665-77 (2008).
30. Sato, S. et al. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 1087-95 (2005).
31. Harper, N., Farrow, S. N., Kaptein, A., Cohen, G. M. & MacFarlane, M. Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J Biol Chem* 276, 34743-52 (2001).
32. Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Mathiasen, I. S., Elling, F. & Jäättelä, M. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell Death Differ* 12, 1297-309 (2005).
33. Ruiz-Ruiz, C. & Lopez-Rivas, A. Mitochondria-dependent and -independent mechanisms in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis are both regulated by interferon-gamma in human breast tumour cells. *Biochem J* 365, 825-32 (2002).
34. Foghsgaard, L. et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* 153, 999-1009 (2001).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: TRAIL induces cytoprotective autophagy in breast epithelial cells.

(A) MCF10A-eGFP-LC3 cells were left untreated (Control) or treated with 5 μ M rapamycin (Rapa), 500 ng/mL TRAIL or 10 ng/mL TNF for 24 h. When indicated 10 mM 3-MA or 5 μ g/ml TRAIL-R2 antagonist antibody was added 1 h before the drugs. Representative confocal images (20 μ m scale bars) and the percentages of cells with LC3 translocation are shown.

(B) MCF10A-eGFP-LC3 cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 h and analyzed by immunoblotting (top), or stimulated with 500 ng/ml TRAIL for 24 h and analyzed for LC3 translocation (bottom).

(C) Representative electron micrographs of MCF10A cells left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 16 h (500 nm scale bars). Arrowheads and arrows denote autophagosomes and autolysosomes, respectively.

(D) MCF10A cells left untreated (Control) or treated with 500 ng/mL TRAIL or 5 μ M rapamycin (Rapa) for 24 h were analyzed for LC3-I, LC3-II and tubulin by immunoblotting. Pepstatin A and E64d were added to the cells 4 h before harvesting. Similar results were obtained in two independent experiments.

(E) MCF10A cells were treated with 5 μ M rapamycin (Rapa) or indicated concentrations of TRAIL for 24 h and the increase in the degradation of long-lived proteins as compared to the untreated cultures (Control) was measured.

(F) MCF10A-eGFP-LC3 cells transfected with the indicated siRNAs were 48 h later left untreated (Control) or treated with 500 ng/ml TRAIL for 24 h and analyzed for the DNA content by flow cytometry. The percentage of apoptotic cells with sub-G1 DNA content is shown.

The values represent mean \pm SD for three (A and E) four (B and F) independent experiments. *p value < 0.05 , **p value < 0.01 , and ***p value < 0.001 as compared to control sample (A - left panel and E), to TRAIL-treated cells without anti-TRAIL-R2 (A - right panel), or to TRAIL-treated cells without siRNA (B and F).

Figure 2: TRAIL activates AMPK and AMPK-dependent cytoprotective autophagy.

(A) Protein lysates from MCF10A cells left untreated or treated with 500 ng/mL TRAIL or 5 μ M rapamycin (Rapa, positive control) for 24h were analyzed by immunoblotting for phosphorylated p70^{S6K} (P-p70^{S6K}), total p70^{S6K} and GAPDH (loading control).

(B) Immunoblot analysis of the levels of P-ACC and tubulin (loading control) in lysates from MCF10A cells left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 24h, 1 mM AICAR for 4 h (positive control), or 5 μ M rapamycin for 24 h (negative control).

(C) Immunoblot analysis of the level of P-ACC and GAPDH (loading control) in lysates from MCF10A cells treated with 500 ng/ml TRAIL for the indicated times.

(D) MCF10A cells were transfected with indicated siRNAs for 48 h and analyzed by immunoblotting for the indicated proteins immediately (upper panel) or after additional 24 h (middle panel) or 2 h (lower panel) incubation with (+) or without (-) 500 ng/ml TRAIL.

(E) MCF10A-eGFP-LC3 cells transfected with indicated siRNAs for 48 h and incubated for an additional 24 h with or without 500 ng/ml TRAIL were analyzed for LC3 translocation (top) and the DNA content (bottom). The values represent mean \pm SD for four independent experiments. *p value < 0.05 , ***p value < 0.001 as compared to TRAIL-treated cells without siRNA.

Similar results were obtained in two (A and B and D) or three (C and D) independent experiments (A and B).

Figure 3: TAK1 mediates TRAIL-induced AMPK activation and autophagy.

(A) MCF10A-eGFP-LC3 cells were transfected with indicated siRNAs for 48 h and analyzed for the indicated mRNAs (top) and proteins (bottom by RT-PCR and immunoblotting, respectively). Similar results were obtained in three independent experiments.

(B) MCF10A-eGFP-LC3 cells transfected with indicated siRNAs for 48 h, and left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 2 h, 10 μ M ionomycin for 24 h (Iono) or starved for amino acids and glucose for 24 h (Starv) were analyzed for p-ACC and tubulin (loading control) expression by immunoblotting. Similar results were obtained in two independent experiments.

(C) Cells transfected and treated as in (B) were analyzed for LC3 translocation. The values represent mean \pm SD of three independent experiments. ***p value < 0.001 as compared to cells treated in a same way, but transfected without siRNA.

Figure 4: TAK1 mediates TRAIL-induced AMPK activation and autophagy.

(A) The lysates of MCF10A cells treated with 500 ng/ml TRAIL for the indicated times were analyzed by immunoblotting. The values represent mean of three independent experiments. The control lane (0 min TRAIL) originates from the same blot and has been treated and exposed identically. Similar results were obtained in three independent experiments.

(B) The lysates of MCF10A-eGFP-LC3 cells transfected with indicated siRNAs for 48 h and left untreated (-) or treated with 500 ng/ml TRAIL for 2 h were analyzed by immunoblotting. LC stands for loading controls tubulin (left) or GAPDH (right)). The two

last lanes originate from the same blot as the four control lanes to the left and have been treated and exposed identically. Similar results were obtained in two independent experiments.

(C) MCF10A-eGFP-LC3 cells were transfected with indicated siRNAs for 48 h, treated as in Fig. 3C and analyzed for LC3 translocation (left) and sub-G1 DNA content (right). The values represent mean \pm SD of three independent experiments (C and F). *p value < 0.05, **p value < 0.01 as compared to cells treated in a same way, but transfected without siRNA.

Figure 5: TRAIL induces TAK1-dependent AMPK activation and autophagy in retinal pigment epithelial cells.

(A) The lysates of hTERT-RPE1 cells transfected with indicated siRNAs for 48h and left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 2 h were analyzed by immunoblotting.

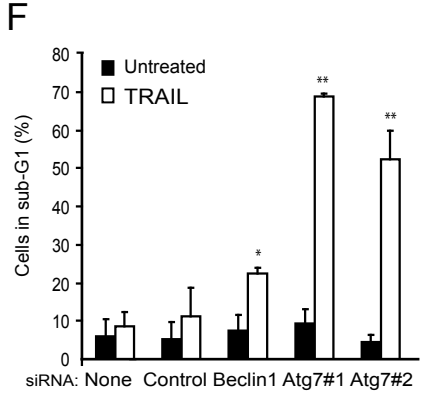
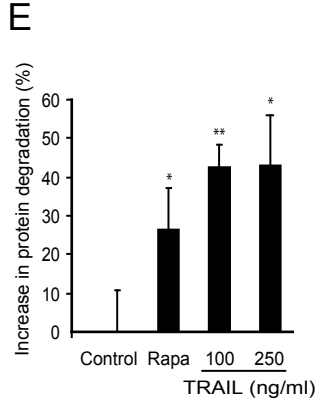
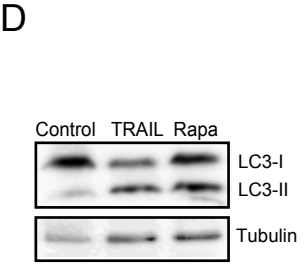
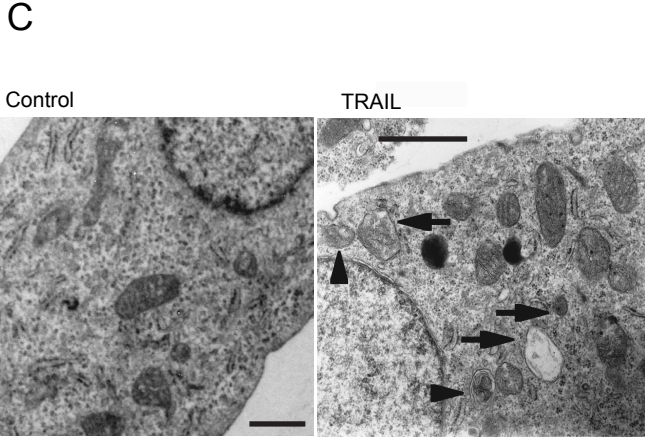
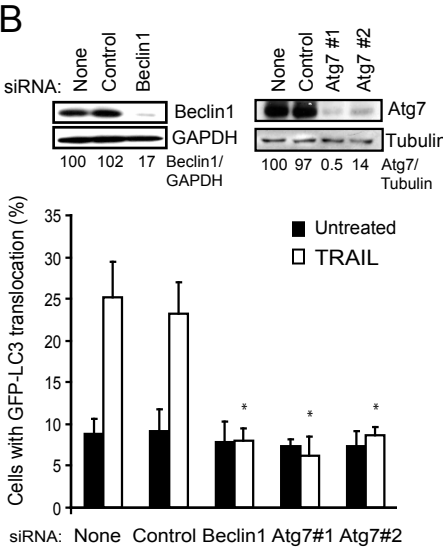
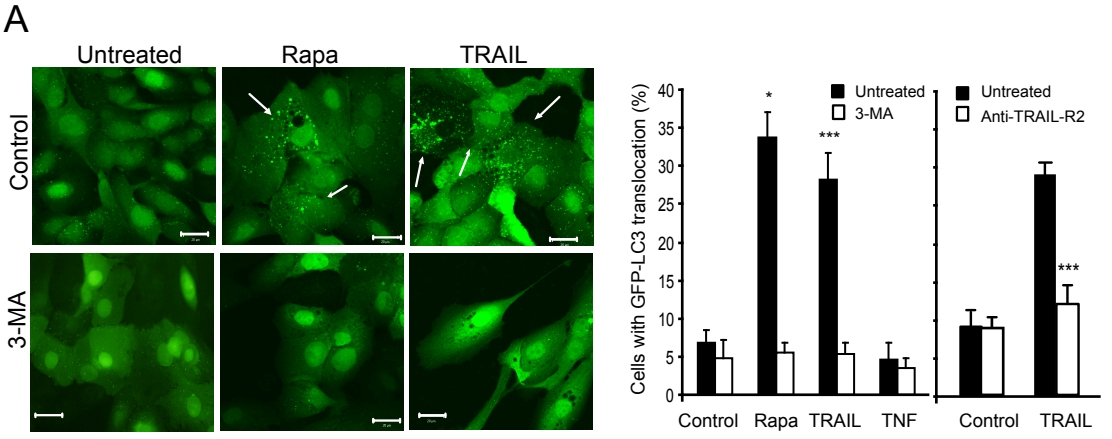
(B) The lysates of hTERT-RPE1 cells left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL or 5 μ M rapamycin (Rapa) for 24 h were analyzed by immunoblotting. Pepstatin A and E64d were added to the cells 4 h before harvesting.

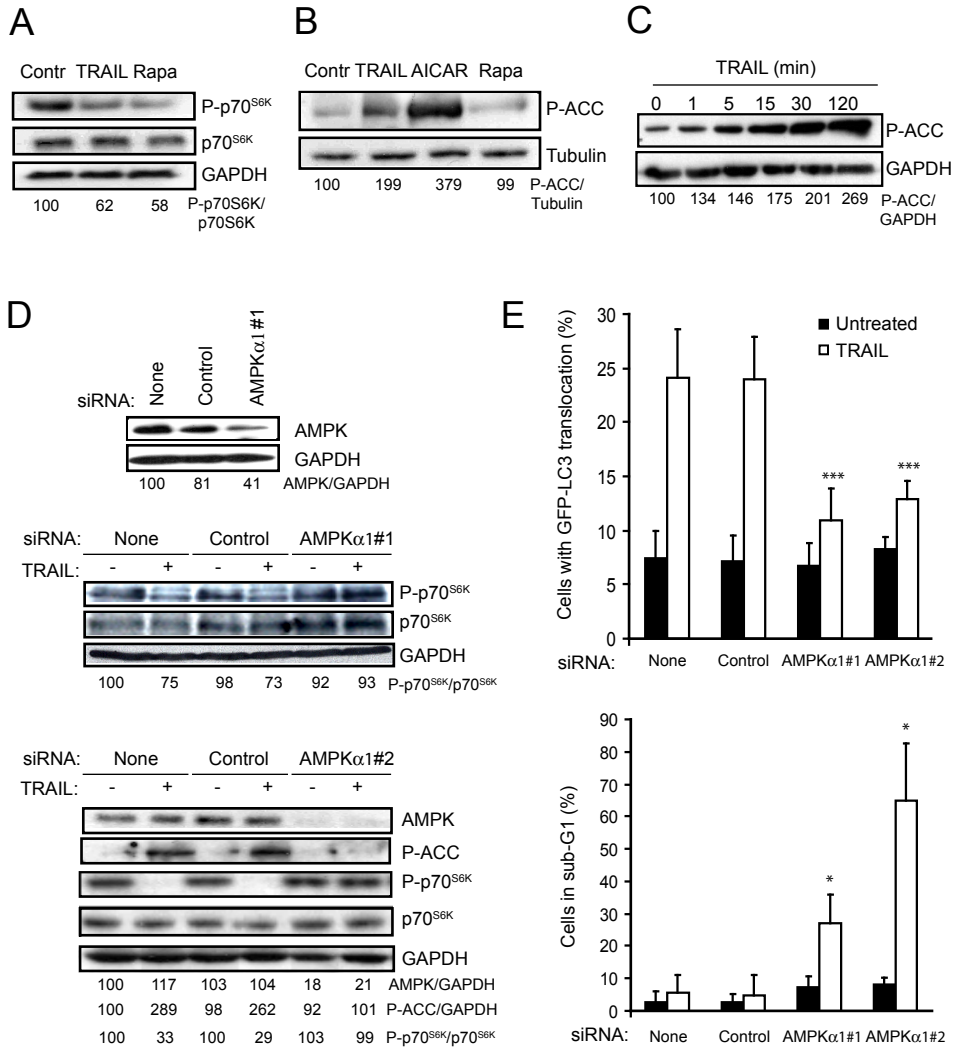
(C) hTERT-RPE1-eGFP-LC3 cells transfected with indicated siRNAs for 48 h were left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 24 h and analyzed for LC3 translocation (left) and sub-G1 DNA content (right).

(D) Lysates of wild type (WT) MEFs and MEFs with an inactive TAK1 knock-in (TAK1 Δ) treated with 500 ng/ml TRAIL were analyzed by immunoblotting. Similar results were obtained in two independent experiments.

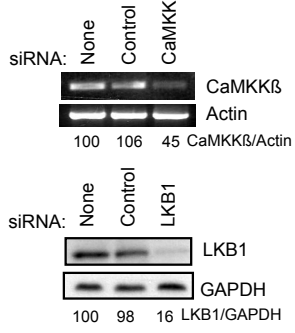
(E) WT and TAK1 Δ MEFs left untreated and treated with 250 or 500 ng/ml TRAIL were analyzed for cell death by the LDH release assay.

Similar results were obtained in two independent experiments (A, B, D). The values represent mean \pm SD for the minimum of three independent experiments (C and E). *p value < 0.05 and ***p value < 0.001 as compared to cells treated in a same way, but transfected without siRNA (C), or the wild type cells (E).

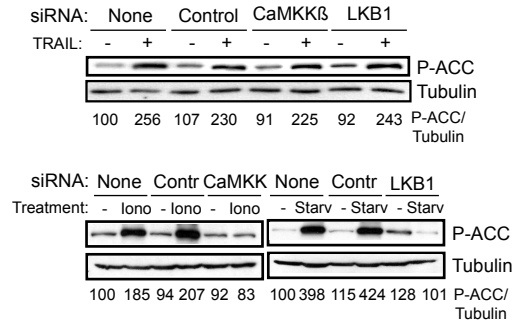




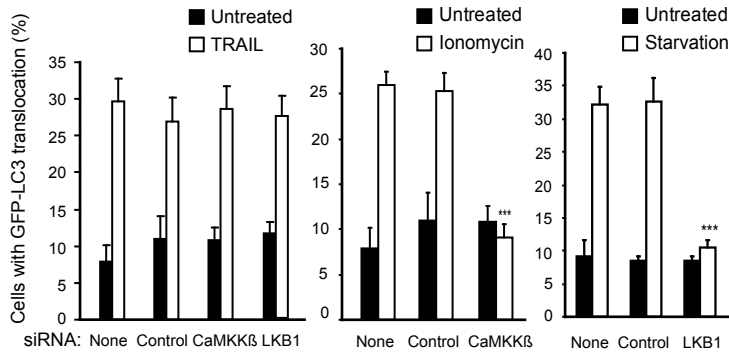
A



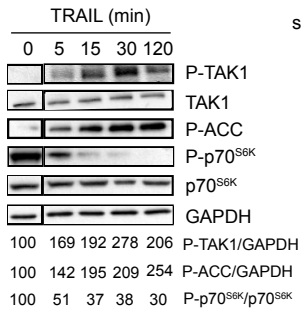
B



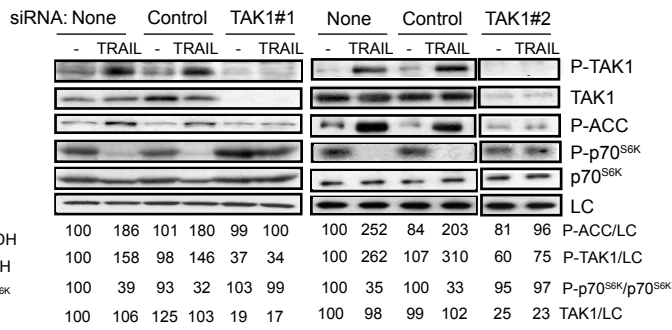
C



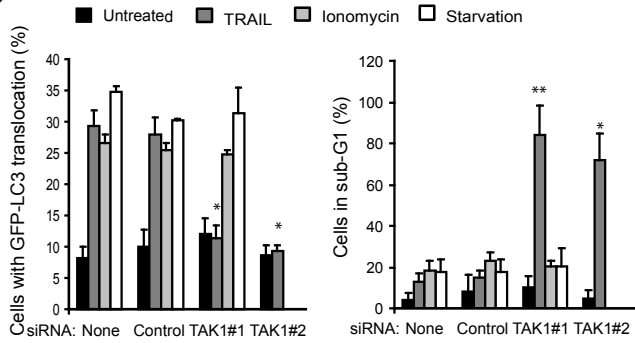
A

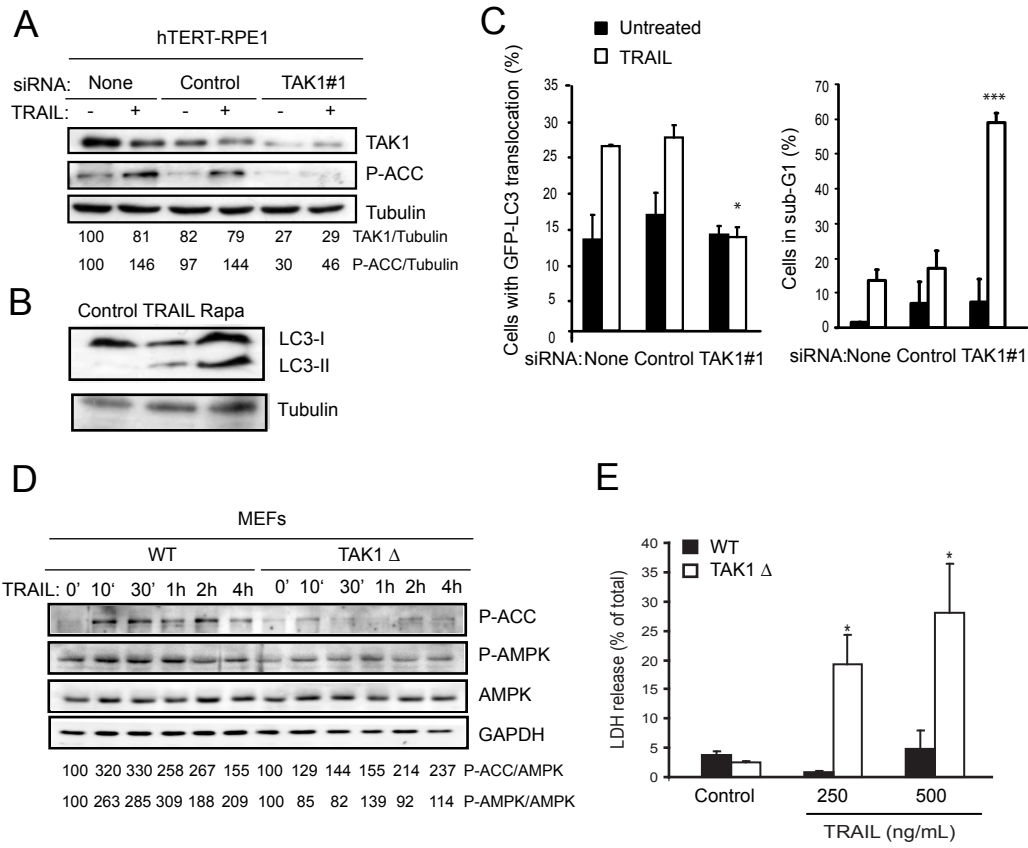


B



C





SUPPLEMENTAL INFORMATION

TAK1 activates AMPK and AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells

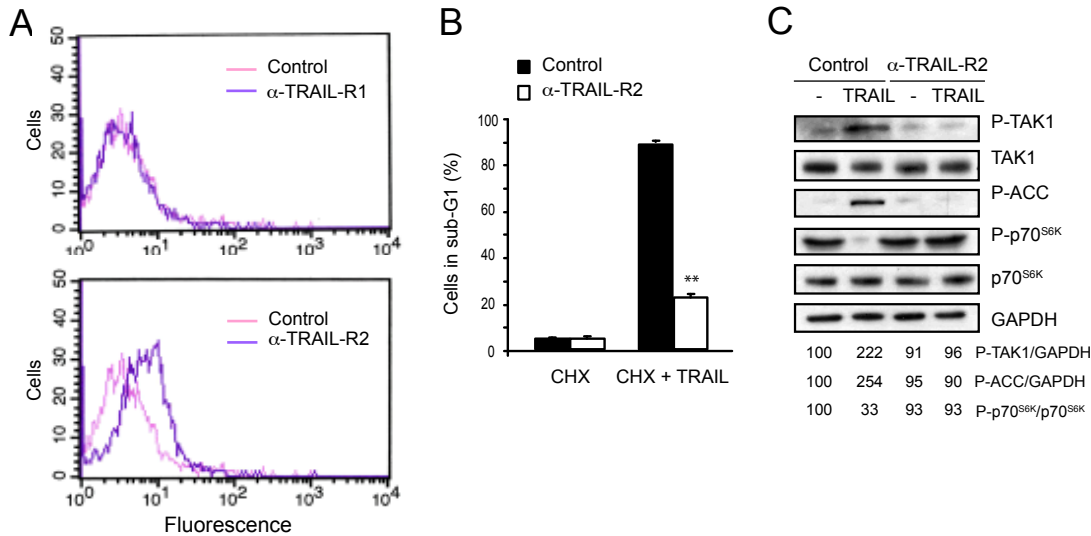


Figure S1: TRAIL-R2 mediates TRAIL-induced cell death and activation of TAK-AMPK1 pathway.

(A) The expression levels of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 receptors on the surface of MCF10A cells were determined by a standard flow cytometry protocol using monoclonal antibodies to TRAIL-R1 (HS101) and TRAIL-R2 (HS201) from Alexis Biochemicals Corp. (San Diego, CA, USA). Representative flow cytometry profiles are shown.

(B) MCF10A cells were treated with 0.5 μg/ml cyclohexymide (CHX) alone or in combination with 5 μg/ml antagonist TRAIL-R2 antibody for 1 h before adding 500 ng/ml TRAIL for 24 h. Cells were analyzed for the DNA content by flow cytometry. The percentage of apoptotic cells with sub-G1 DNA content is shown and the values represent mean ± SD for two independent experiments.

(C) MCF10A cells were left untreated (-) or treated with 500 ng/ml TRAIL for 2 h. When indicated, cells were pre-incubated with 5 μg/ml antagonist TRAIL-R2 antibody for 1 h. Immunoblot analyses of P-ACC, P-TAK1, TAK1, P-p70S6K, p70S6K and GAPDH (loading control) are shown. The values indicate the P-TAK1/GAPDH, P-ACC/GAPDH and P-p70S6K/p70S6K ratios as a percentages of the ratios in control cells. Similar results were obtained in three independent experiments.

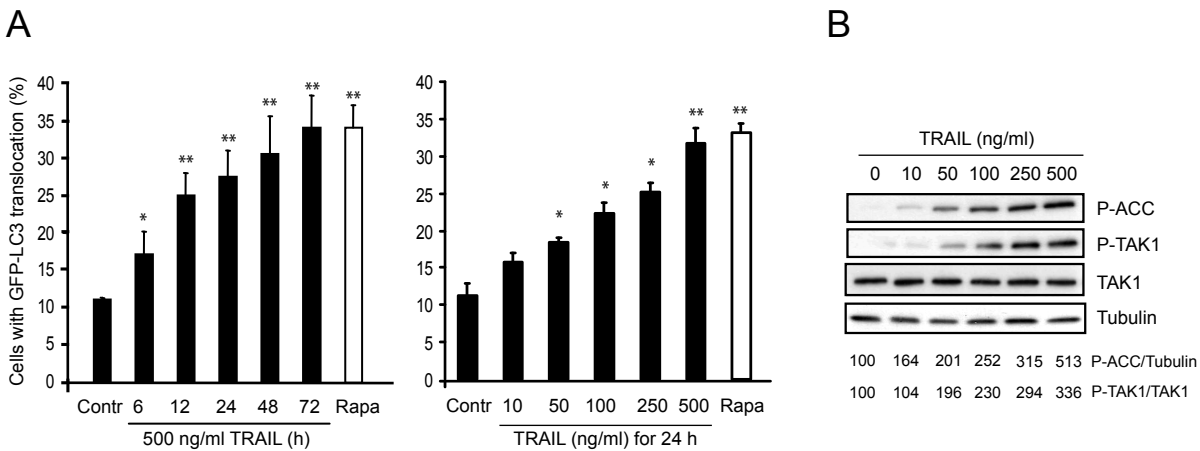


Figure S2: Kinetics and/or dose dependence of TRAIL-induced LC3 translocation and TAK-1 and AMPK activation.

(A) MCF10A cells treated with TRAIL at times and concentrations indicated were analyzed for LC3 translocation. A 24 h treatment with 5 μM rapamycin (Rapa) served as a positive control. The values represent mean ± SD for three independent experiments.

*p value < 0.05, **p value < 0.01 as compared to untreated samples.

(B) Lysates of MCF10A cells treated with indicated concentrations of TRAIL for 24 h were analyzed by immunoblot for P-ACC, P-TAK1, TAK1 and tubulin (loading control). The values show the P-ACC/Tubulin and P-TAK1/TAK1 ratios as percentages of the ratios in control cells.

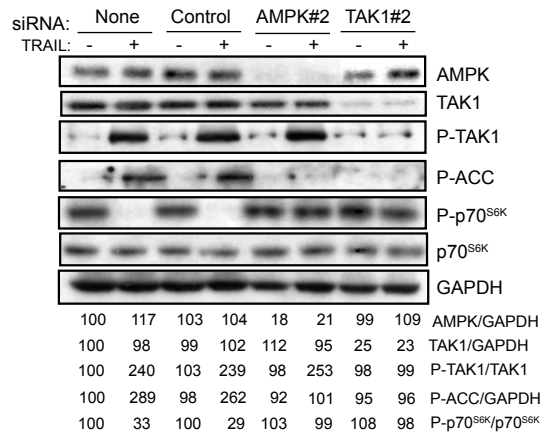


Figure S3: TAK1 is upstream of AMPK in TRAIL-induced pathway leading to the inhibition of mTORC1.

Lysates of MCF10A cells transfected with indicated siRNAs for 48h and treated with 500 ng/ml TRAIL for 2 h were analyzed by immunoblotting for AMPK, TAK1, P-TAK1, P-ACC, P-p70S6K, p70S6K and GAPDH (loading control). The values show the AMPK/GAPDH, TAK1/GAPDH, P-ACC/GAPDH, P-TAK1/TAK1, and P-p70S6K/p70S6K ratios as percentages of the ratios in cells with no siRNA, and are representative of two independent experiments.

2. Otro artículo publicado

Statins activate a mitochondria-operated pathway of apoptosis in breast tumor cells by a mechanism regulated by ErbB2 and dependent on the prenylation of proteins

Griselda Herrero-Martin, Abelardo López-Rivas*

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),
Avda Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain

Received 26 March 2008; revised 26 May 2008; accepted 17 June 2008

Available online 26 June 2008

Edited by Vladimir Skulachev

Abstract Statins are inhibitors of the mevalonate synthesis pathway that induce apoptosis in tumor cells although the apoptotic mechanism activated by statins remains to be elucidated. We have examined the role of the mitochondria-operated pathway of apoptosis in the cell death induced by statins in breast tumor cells and its regulation by protein prenylation and ErbB2 overexpression. Lovastatin treatment down-regulates the expression of Bcl-2 and activates apoptosis through a mitochondria-operated, ErbB2-regulated mechanism. Apoptosis induced by statins is independent of their effects on cholesterol synthesis and involves protein prenylation. Our results indicate that prenylation of apoptosis-regulating proteins is a key event in the survival of breast tumor cells and this requirement could be circumvented in cells overexpressing the oncogene ErbB2.

© 2008 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Statin; Apoptosis; Bcl-2; ErbB2; Mitochondria; Prenylation

1. Introduction

Blocking of mevalonate synthesis by statins, inhibitors of the 3-OH-3-methyl-glutaryl CoA (HMG-CoA) reductase, has been used to treat hypercholesterolemia and prevent cardiovascular diseases [1,2]. However, statins not only reduce cholesterol levels but they also affect the synthesis of other products of the mevalonate pathway such as isoprenoids, essential components of signalling proteins involved in cell proliferation and cancer [3–5]. Attachment of isoprenoids compounds to protein members of the Ras/Rho family facilitate their anchoring to the cell membrane where they carried out their role [6].

Clinical studies have reached mixed conclusions about the relationship between statin use and breast cancer risk [7]. On the other hand, statins have been shown to inhibit cell proliferation and induce cell death by apoptosis in different tumor

cell lines [8–10]. Statins seem to induce apoptosis and inhibit proliferation to a greater degree in malignant than in non-malignant cells, possibly because of the increased expression of HMG-CoA reductase and a greater requirement for mevalonate-derived isoprenoids in tumour as opposed to normal cells [11]. In breast tumor cells, different signalling pathways have been reported to be responsible for the apoptosis induced by statins. Nitric oxide and lipid rafts levels and JNK activation have been implicated in the proapoptotic actions of statins [9,12]. Down-regulation of survivin and inhibition of Akt have also been observed in statin-induced apoptosis in other tumor cells [13,14]. However, the apoptotic mechanism activated in breast tumor cells by statins remains to be elucidated.

The *ErbB2* proto-oncogene encodes human epidermal growth factor receptor-2 which belongs to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. Upregulation of *erbB2* receptors has been found in about 25–30% breast cancer patients, which is related with poor prognosis. ErbB2 overexpression is linked to resistance to apoptosis and down-regulation of *erbB-2* receptor by trastuzumab (herceptin) enhances death receptor-induced apoptosis [15]. In this study we show that statin treatment down-regulate Bcl-2 expression and induces apoptosis in breast tumor cells by a mitochondria-operated pathway. In breast tumor cells overexpressing ErbB2 apoptosis by statin is clearly inhibited. Apoptosis induced by statins in breast tumor cells is independent of their effects on cholesterol synthesis and requires the prenylation of proteins.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Caspase inhibitor benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp-(OMe) fluoromethyl ketone (Z-VAD-FMK) was from Bachem, AG (Bachem, Bubendorf, Switzerland). Mevinolin (lovastatin), squalene, mevalonic acid, mevastatin, geranylgeranylpyrophosphate (GGPP), farnesylpyrophosphate ammonium salt (FPP) and anti-tubulin antibody were purchased from Sigma Chemical Corp (St. Louis, MO). Anti-human caspase-8 monoclonal antibody was purchased from Cell Diagnostica (Münster, Germany). Anti-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), cytochrome *c* and Bax monoclonal antibodies were from Biosciences PharMingen (San José, CA). Anti-caspase-9 and caspase-3 antibodies were from New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA). Anti-GAPDH antibody was from Biogenesis (Poole, UK). Anti-ErbB2 antibody was kindly provided by Dr. Joaquin Arribas (Vall d'Hebron University Hospital Research Institute, Barcelona, Spain). Anti-Bcl-2 and secondary goat anti-mouse and goat anti-rabbit antibodies were obtained from DAKO (Cambridge, United Kingdom).

*Corresponding author. Fax: +34 95 446 1664.

E-mail address: abelardo.lopez@cabimer.es (A. López-Rivas).

Abbreviations: FPP, farnesylpyrophosphate ammonium salt; GGPP, geranylgeranylpyrophosphate; PARP, poly-(ADP-ribose) polymerase; HMG-CoA, hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A

2.2. Cell lines

Stable MCF-7 cell line overexpressing human Bcl-2 protein has been described previously [16]. MCF-7 cell line overexpressing ErbB2 was a donation of Dr. Joaquín Arribas (Vall d'Hebron University Hospital Research Institute, Barcelona, Spain). The cell lines were either maintained in RPMI 1640 (MDA-MB231, MCF-7) or in DMEM (MDA-MB435S, SKBr3 and BT474) containing 10% fetal bovine serum and 1 mM L-glutamine at 37 °C in humidified 5% CO₂, 95% air incubator. Culture medium of MDA-MB435S cells (DMEM) was also supplemented with insulin (10 µg/mL). MCF10A cells were maintained in DMEM/F12 (1:1) containing 10% fetal bovine serum, insulin (10 Hg/mL), EGF (20 ng/mL) and hydrocortisone (500 ng/mL).

2.3. Analysis of apoptosis

Cells (3×10^5 /well) were treated with statin in 6-well plates for the times indicated in the figure legends. After treatment, hypodiploid apoptotic cells were detected by flow cytometry according to published procedures [16]. Basically, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS), fixed in cold 70% ethanol and then stained with propidium iodide while treating with RNase. Quantitative analysis of subG1 cells was carried out in a FACSCalibur cytometer using the Cell Quest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Phosphatidylserine (PS) exposure on the surface of apoptotic cells was examined by flow cytometry after staining with Annexin-V-FLUOS (Roche Molecular Biochemicals, Germany), following instructions provided by the manufacturer.

2.4. Viability assay

Cells (3.5×10^3 /well) were treated with statin in 24-well plates for the times indicated in the figure legends. After treatment, cells were washed with PBS and stained with 0.2% Crystal Violet in 2% Ethanol for 20 min at room temperature. Absorbance of the samples was determined using a multiplate reader Varioskan Flask (Termo Electron Corporation).

2.5. Cellular fractionation

Cells (3×10^5 /well) were treated with statin in 6-well plates for the times indicated in the figure legends. After treatment, cells were detached from the plate with RPMI/EDTA and trypsin, washed with PBS and lysed in 30 µl ice cold lysis buffer (80 mM KCl, 250 mM sucrose, 500 µg/ml digitonin and protease inhibitors in PBS). For measurements of cytochrome *c* and Bax, cell lysates were centrifuged for 5 min at 10000 × *g* to separate the supernatant (cytosolic fraction) and pellet (mitochondria-containing fraction). Amount of protein in each fraction was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad, Hertfordshire, UK). Proteins from the supernatant and pellet were mixed with Laemmli buffer and resolved on SDS–12% PAGE minigels. Cytochrome *c* and Bax were determined by Western blot analysis.

2.6. Detection of proteins by Western blot analysis

Cells (3×10^5 /well) were treated with statin in 6-well plates for the times indicated in the figure legends. After treatment, cells were detached from the plate with RPMI/EDTA and trypsin, washed with PBS and lysed in 20 µl of Laemmli buffer. Samples were sonicated and proteins were resolved on SDS–polyacrylamide minigels and detected as described previously [17].

2.7. Statistical analysis

All data are presented as the means ± S.E. of at least three independent experiments. The differences among different groups were determined by the Student's *t*-test. *P* < 0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Lovastatin induces apoptosis in human breast tumor cells

Antitumor properties of statins have been extensively evaluated [7]. Despite these studies, there are still important controversies regarding the beneficial effects of statins on breast tumor prevention. On the other hand, antiproliferative and

proapoptotic actions of statins on breast tumor cells have been recently examined [9,18,19]. However, the molecular mechanism by which statins induce apoptosis in breast tumor cells remains unknown. In this report, we have examined the effect of the lipophilic statin lovastatin on the mitochondrial pathway of apoptosis in breast tumor cells. Lovastatin-induced apoptosis in a dose and time-dependent manner in the breast tumor cell line MDA-MB231 as determined by measuring the percentage of hypodiploid cells (Fig. 1A). Activation of apoptosis by lovastatin was also observed in the highly metastatic breast tumor cell line MDA-MB435S (Fig. 1B). In contrast, at the doses used in these experiments the ErbB2-overexpressing breast tumor cell lines BT474 and SKBr-3 were very resistant to lovastatin-induced apoptosis (Fig. 1B). To further investigate the importance of ErbB2 overexpression on the resistance of breast tumor cells to statin-induced apoptosis, we performed a number of experiments with MCF-7 cells that has been transfected with a cDNA encoding for the oncogene ErbB2. These cells stably overexpress ErbB2 as can be seen in Fig. 1C. Next, we examined the effect of lovastatin treatment in control and ErbB2-overexpressing MCF-7 cells. Results shown in Fig. 1C demonstrate that MCF-7/ErbB2 cells are markedly resistant to lovastatin treatment as determined by analysis of phosphatidylserine exposure on the surface of apoptotic cells after staining with Annexin-V-FLUOS and cell viability with crystal violet. Interestingly, the immortalised human breast epithelial cell line MCF10A was also markedly resistant to the proapoptotic effect of lovastatin (not shown).

3.2. Lovastatin induces the activation of a caspase-dependent, mitochondria-operated pathway of apoptosis in breast tumor cells

To further establish the mechanism of lovastatin-promoted cell death, we examined the caspase dependency of this cell death process. We found that the generation of subG1 cells induced by lovastatin was dependent on caspase activation as it was completely prevented by the general caspase inhibitor Z-VAD-fmk (Fig. 2A). To confirm that the apoptosis cascade was fully active in MDA-MB231 cells treated with lovastatin and that caspase activation was involved in the process, we analyzed the proteolytic degradation of the nuclear protein PARP, a substrate of executioner caspases. As shown in Fig. 2B, PARP cleavage was clearly induced in cells treated with lovastatin. Moreover, we observed that the initiator caspases in the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis (caspase-8 and caspase-9) were activated by lovastatin in MDA-MB231 (Fig. 2C) and MCF-7 cells (not shown). After a 48 h-treatment with lovastatin, caspase-3, an executioner caspase, was also activated in the MDA-MB231 cell line (Fig. 2C).

To examine the mechanism of lovastatin-induced apoptosis we first analysed the activation of a mitochondria-controlled apoptotic pathway by lovastatin in breast tumor cells. To this end we determined the translocation of cytosolic Bax to mitochondria and the release of cytochrome *c* from this organelle. Analysis by Western blotting of cytosolic and mitochondria-containing subcellular fractions revealed that treatment of breast tumor MCF-7 cells with lovastatin induced the loss of cytochrome *c* from the mitochondrial fraction and the translocation of Bax from the cytosol to the mitochondria-containing fraction (Fig. 3A). Interestingly, in MCF-7 cells overexpressing

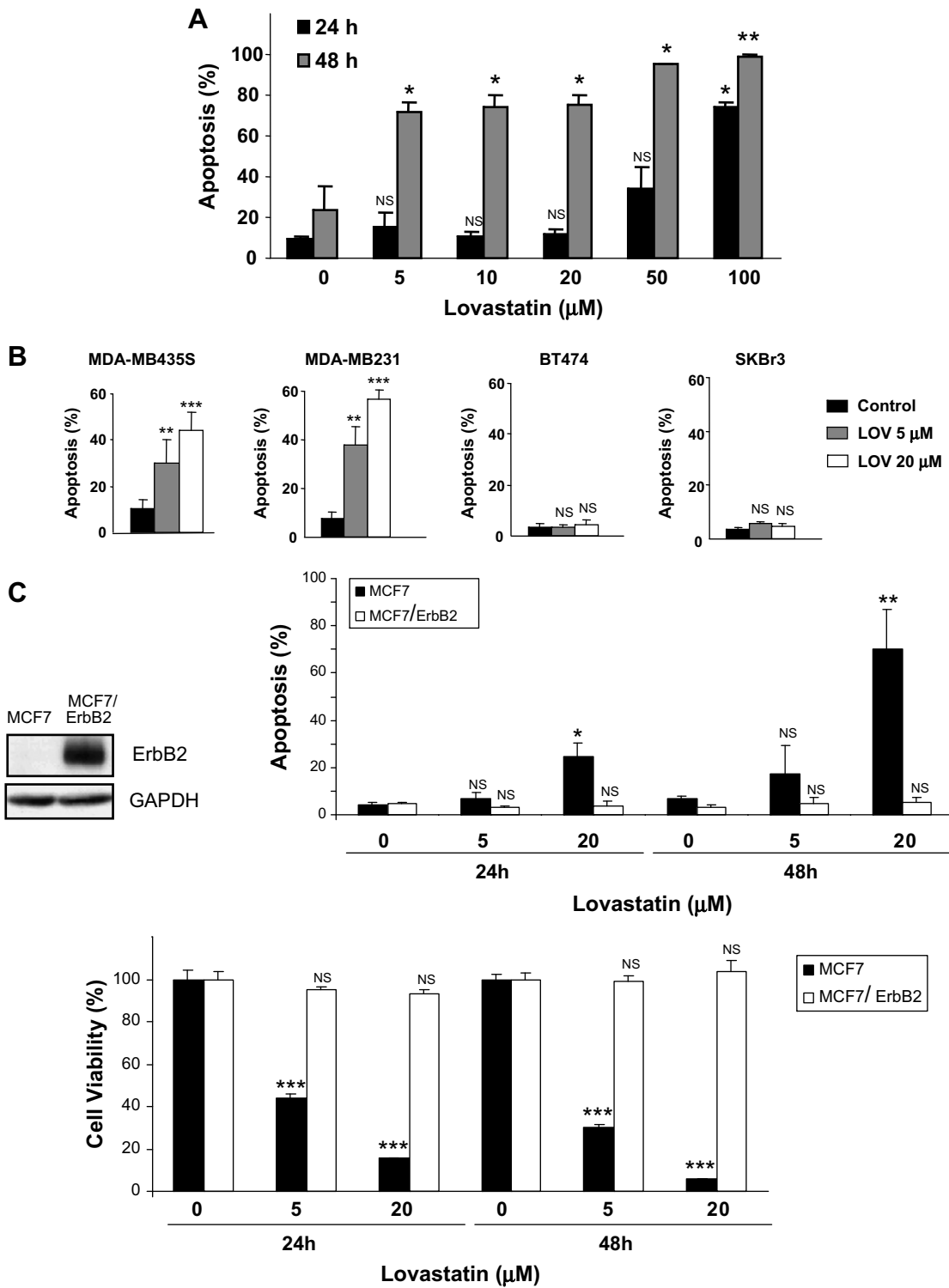


Fig. 1. Lovastatin induces apoptosis in breast tumor cells. (A) MDA-MB231 cells were seeded in 6-well plates (3×10^5 cells/well) and treated with lovastatin as indicated either for 24 h or for 48 h in medium containing 0.5% foetal bovine serum. After this incubation apoptosis was assessed by measuring the percentage of hypodiploid cells in the culture. Results show the means \pm S.E. of three independent experiments. (B) MDA-MB435s, MDA-MB231, BT474 and SBr3 cells were seeded in 6-well plates (3×10^5 cells/well) and treated with lovastatin (5 or 20 μ M) in medium containing 0.5% foetal bovine serum. The percentage of apoptotic cells with sub-G1 DNA content are shown and the values represent means \pm S.E. of three independent experiments. (C) MCF7 control and MCF7-overexpressing ErbB2 cells were seeded in 6-well plates (3×10^5 cells/well, Annexin-V-Fluos) or 24-well plates (3.5×10^3 /well, crystal violet) and treated with lovastatin (5 or 20 μ M) in medium containing 0.5% foetal bovine serum. The percentage of cells with externalization of phosphatidylserine (Annexin-V-Fluos) or cell viability (crystal violet) are shown and the values represent means \pm S.E. of four independent experiments. Immunoblot detection of ErbB2 expression is also shown.

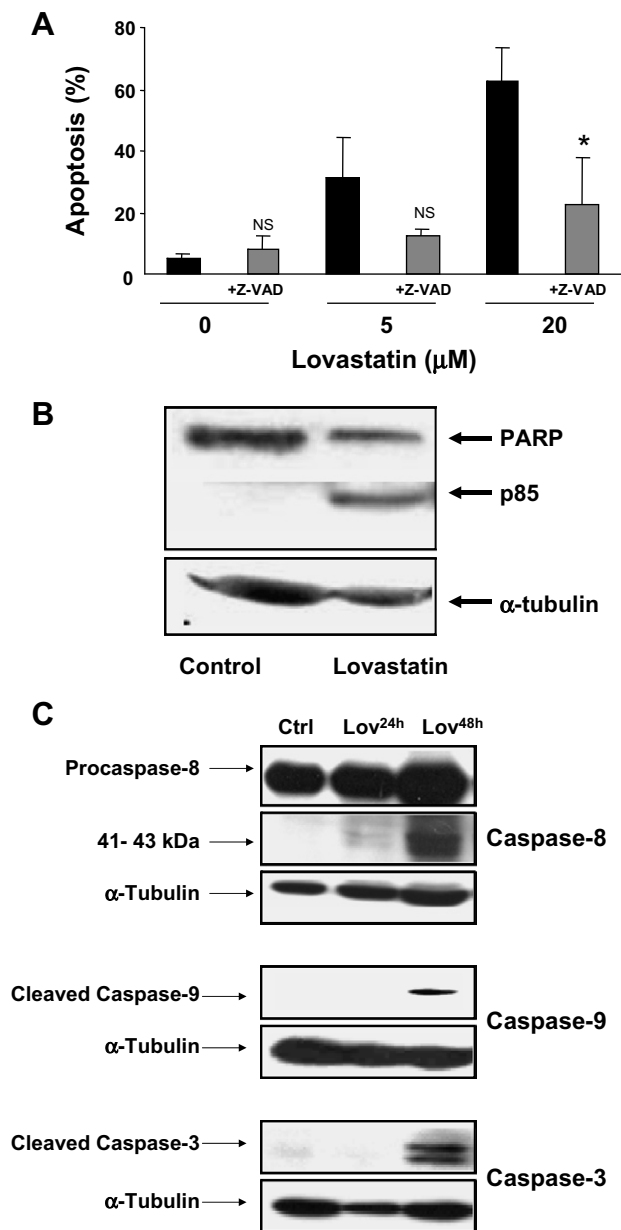


Fig. 2. Caspase-dependent activation of a mitochondria-operated pathway of apoptosis by lovastatin in breast tumor cells. (A) MDA-MB231 cells were seeded in 6-well plates (3×10^5 cells/well) and incubated with or without Z-VAD-fmk (100 µM) 1 h before the addition of lovastatin. After 48 h, apoptosis was determined as indicated in Fig. 1A. Results show the means \pm S.E. of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ as compared to cells without z-VAD-fmk (B) Total lysates from MDA-MB231 cells (3×10^5) treated with lovastatin (100 µM) for 48 h in the presence of 10% serum were analyzed by immunoblotting for PARP cleavage. α -Tubulin levels were used as a loading control. Similar results were obtained in two independent experiments. (C) MDA-MB231 cells were seeded in 6-well plates (3×10^5 /well) and treated with lovastatin (100 µM in the presence of 10% serum) for either 24 h or 48 h. Total protein was harvested and caspase processing was determined by Western blot analysis. Similar results were obtained in two independent experiments.

Bcl-2 [16] both events were clearly inhibited (Fig. 3A). To get further insight into the mechanism of lovastatin-induced apoptosis we studied the expression levels of Bcl-2 in breast tumor

cells treated with this statin. Western blots revealed that at 24 h and 48 h after the addition of lovastatin there was a decrease in the expression of Bcl-2 protein in MCF-7 and MDA-MB231 cells (Fig. 3B). These data suggest that inhibiting HMG-CoA reductase activity in breast tumor cells caused the down-regulation of antiapoptotic Bcl-2 protein that in turn promoted the activation of a mitochondria-operated pathway of apoptosis.

3.3. Statin-induced apoptosis requires geranylgeranylation and farnesylation of proteins but not the synthesis of cholesterol

We next studied the relevance of the inhibition by lovastatin of mevalonate synthesis, the immediate downstream product of HMG-CoA reductase, on apoptosis. Interestingly, the apoptosis-inducing effects of lovastatin in both MDA-MB231 and MDA-MB435S cells were prevented by the presence of mevalonate in the culture medium (Fig. 4A), which indicate that lovastatin-induced apoptosis was a consequence of inhibition of HMG-CoA reductase. We also examined the role of the cholesterol pathway in the apoptosis induced by lovastatin. As shown in Fig. 4A addition of squalene, an intermediate in the pathway leading to cholesterol synthesis did not prevent lovastatin-induced apoptosis. Similar results were obtained with mevastatin (Fig. 4B), a statin produced by the mould *Penicillium citrinum*. Mevastatin at doses of 5 and 20 µM induced apoptosis in MDA-MB231 cells and these effects were prevented by mevalonate added to the culture medium but not by cholesterol intermediate squalene.

The synthesis of cholesterol is a complex multi-step process [3]. Isoprenoids are important intermediates in the cholesterol biosynthetic pathway that serve as lipid attachments for a variety of signalling molecules, such as heterotrimeric G-proteins and the small GTP-binding proteins Ras and its related Ras-like proteins, such as Rho, Rac, Rab, Rap and Ral. Farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), two isoprenoids compounds produced in the cholesterol synthesis pathway, are bound to several cellular proteins, including small GTPases by a post-translational modification known as isoprenylation. This process involves the addition of a 15-carbon farnesyl chain in FPP (farnesylation) or a 20-carbon geranylgeranyl chain in GGPP (geranylgeranylation) to a cysteine sulfhydryl group near the carboxyl terminus. By inhibiting HMG-CoA reductase, statins can prevent the biosynthesis of isoprenoids such as FPP and GGPP. As a consequence, the diverse actions of the small GTP-binding proteins are reduced. To elucidate how statins were activating apoptosis in breast tumor cells, we examined the role of prenylation of proteins in the apoptosis induced by lovastatin and mevastatin in MDA-MB231 cells. We incubated the cells with the isoprenoids derivatives geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) or farnesylpyrophosphate (FPP) and determined the sensitivity to statin-induced apoptosis. As shown in Fig. 4C, when cells were pretreated with GGPP or FPP and treated with lovastatin or mevastatin, statin-induced apoptosis was strongly reduced. Therefore, when protein prenylation is restored after statin treatment, apoptosis is not observed. These results indicate the importance of the inhibition of protein prenylation in the apoptotic cell death induced by statins in breast tumor cells. The translocation of Ras to the cell membrane is necessary for activity and is dependent on farnesylation. Similarly, attachment of Rho and Rac to the cell membrane is required for activity but, in contrast to Ras, these factors undergo ger-

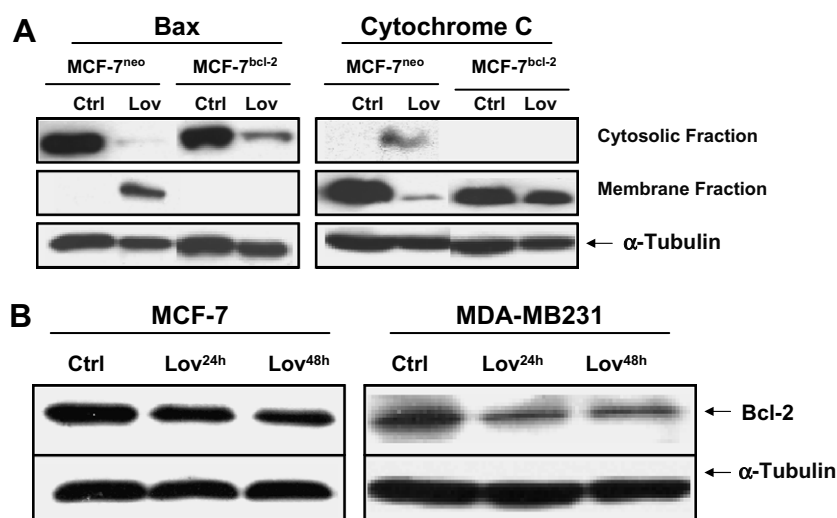


Fig. 3. Lovastatin induces the mitochondrial apoptotic pathway in breast tumor cells. (A) MCF-7 cells overexpressing Bcl-2 (MCF7^{bcl-2}) and their control cells (MCF7^{neo}) were seeded in 6-well plates (3×10^5 cells/well) and treated with lovastatin (100 μ M in the presence of 10% serum) for 48 h. Cells were harvested and cytosolic and mitochondria-containing fractions were obtained as described in Section 2. Protein levels of Bax and cytochrome *c* were analyzed by Western blot. Similar results were obtained in two independent experiments. (B) 3×10^5 cells per well of MCF7 and MDA-MB231 cells were seeded in 6-well plates and treated with lovastatin (100 μ M in the presence of 10% serum) for 24 h or 48 h. Total protein was harvested and levels of Bcl-2 were determined by Western blot analysis. α -Tubulin levels were used as loading controls. Similar results were obtained in two independent experiments.

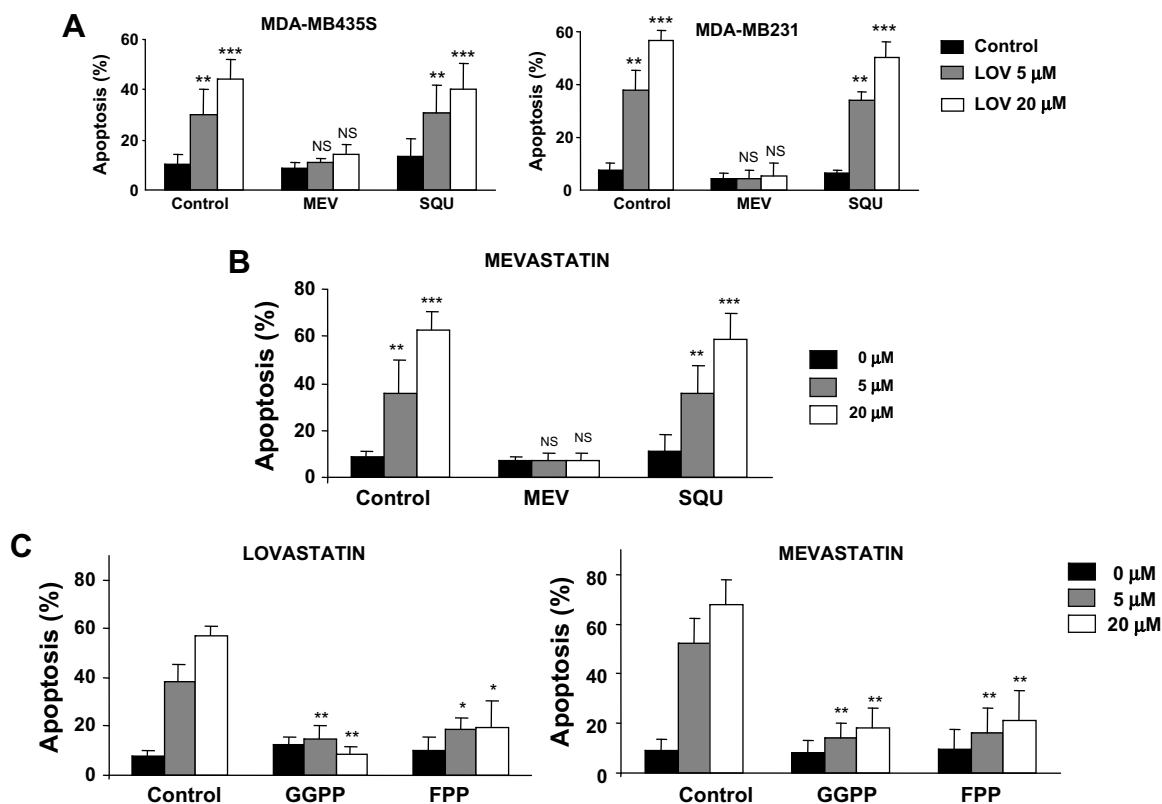


Fig. 4. Statins-induced apoptosis is mediated by HMG-CoA-Reductase inhibition and dependent on protein prenylation. MDA-MB435S (A) or MDA-MB231 (A and B) cells were seeded in 6-well plates (3×10^5 cells/well) and pretreated with mevalonic acid (MEV, 20 μ M) or squalene (SQU, 20 μ M) 1 h before the addition of lovastatin (A) or mevastatin (B) for 48 h in the presence of 0.5% foetal bovine serum. Apoptotic cell death was determined by flow cytometry as described in Section 2. Results show the means \pm S.E. of three independent experiments. (C) MDA-MB231 cells were seeded as in (A) and pretreated with geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP, 20 μ M) or farnesyl pyrophosphate (FPP, 20 μ M) 1 h before the addition of lovastatin or mevastatin for 48 h in the presence of 0.5% serum. Apoptotic cell death was determined as described in Section 2. Results show the means \pm S.E. of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ as compared to untreated cells.

anylgeranylation. Our finding that restoration of either farnesylation or geranylgeranylation of proteins is sufficient to prevent statin-induced apoptosis in breast tumor cells suggest that different members of the small GTP-binding proteins family are involved in the mechanism of apoptosis induction by statins. An alternative explanation for these results is the unusual property of RhoB among prenylated proteins that can be farnesylated or geranylgeranylated [20]. Inhibition of small GTP-binding proteins prenylation by statins could affect various signalling pathways regulating cell survival [21]. In this respect, a role of Rho inhibition in the antitumor and proapoptotic effects of statins by inhibiting Rho-dependent NF- κ B activation has been reported [19]. Abrogation of cell adhesion to the extracellular matrix has also been observed in cells treated with statins and this could affect cell survival [22].

We have observed that breast tumor cells overexpressing ErbB2 are markedly more resistant to the proapoptotic effects of statins than other breast tumor cell lines. Amplification or overexpression of ErbB2 in cancer cells confers resistance to apoptosis and promotes cell growth through Akt activation [23]. It has been recently shown that statins synergistically induce tumor cell death with inhibitors of the PI3K/Akt pathway [24]. Our results may indicate that in breast tumor cells expressing elevated levels of ErbB2 the constitutive activation of survival pathways like PI3K/Akt, MAPK/Erk1/2 and NF- κ B may render these cells resistant to the proapoptotic effects of statins. In this context, statins could be valuable tools as antitumor agents in combination with pharmacological inhibitors of these survival pathways.

Acknowledgements: We are grateful to R. Yerbes, G. Ortiz-Ferrón, M. Pozuelo, C. García-García, and C. Palacios for stimulating discussions. The work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) grant SAF2006-00633 and Junta de Andalucía grant CTS-211 (AL-R). GH-R was supported by a fellowship from MEC.

References

- [1] Feussner, G. (1994) HMG CoA reductase inhibitors. *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 59–68.
- [2] Grundy, S.M. (1988) HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *New Engl. J. Med.* 319, 24–33.
- [3] Edwards, P.A. and Ericsson, J. (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 157–185.
- [4] Repko, E.M. and Maltese, W.A. (1989) Post-translational isoprenylation of cellular proteins is altered in response to mevalonate availability. *J. Biol. Chem.* 264, 9945–9952.
- [5] Swanson, K.M. and Hohl, R.J. (2006) Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. *Curr. Cancer Drug Targets* 6, 15–37.
- [6] Sebtí, S.M. (2005) Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy. *Cancer Cell* 7, 297–300.
- [7] Demierre, M.F., Higgins, P.D., Gruber, S.B., Hawk, E. and Lippman, S.M. (2005) Statins and cancer prevention. *Nat. Rev. Cancer* 5, 930–942.
- [8] Cafforio, P., Dammacco, F., Gernone, A. and Silvestris, F. (2005) Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 26, 883–891.
- [9] Kotamraju, S., Williams, C.L. and Kalyanaraman, B. (2007) Statin-induced breast cancer cell death: role of inducible nitric oxide and arginase-dependent pathways. *Cancer Res.* 67, 7386–7394.
- [10] van de Donk, N.W., Kamphuis, M.M., van Kessel, B., Lokhorst, H.M. and Bloem, A.C. (2003) Inhibition of protein geranylgeranylation induces apoptosis in myeloma plasma cells by reducing Mcl-1 protein levels. *Blood* 102, 3354–3362.
- [11] Wong, W.W., Dimitroulakos, J., Minden, M.D. and Penn, L.Z. (2002) HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 16, 508–519.
- [12] Liang, S.L., Liu, H. and Zhou, A. (2006) Lovastatin-induced apoptosis in macrophages through the Rac1/Cdc42/JNK pathway. *J. Immunol.* 177, 651–656.
- [13] Kaneko, R., Tsuji, N., Asanuma, K., Tanabe, H., Kobayashi, D. and Watanabe, N. (2007) Survivin down-regulation plays a crucial role in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor-induced apoptosis in cancer. *J. Biol. Chem.* 282, 19273–19281.
- [14] Roudier, E., Mistafa, O. and Stenius, U. (2006) Statins induce mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated inhibition of Akt signaling and sensitize p53-deficient cells to cytostatic drugs. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2706–2715.
- [15] Cuello, M., Ettenberg, S.A., Clark, A.S., Keane, M.M., Posner, R.H., Nau, M.M., Dennis, P.A. and Lipkowitz, S. (2001) Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res.* 61, 4892–4900.
- [16] Ruiz-Ruiz, C. and Lopez-Rivas, A. (2002) Mitochondria-dependent and -independent mechanisms in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis are both regulated by interferon-gamma in human breast tumour cells. *Biochem. J.* 365, 825–832.
- [17] Ruiz-Ruiz, M.C. and Lopez-Rivas, A. (1999) p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells. *Cell Death Differ.* 6, 271–280.
- [18] Campbell, M.J. et al. (2006) Breast cancer growth prevention by statins. *Cancer Res.* 66, 8707–8714.
- [19] Denoyelle, C., Vasse, M., Korner, M., Mishal, Z., Ganne, F., Vannier, J.P., Soria, J. and Soria, C. (2001) Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis* 22, 1139–1148.
- [20] Mazieres, J. et al. (2005) Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 304, 354–364.
- [21] Li, X., Liu, L., Tupper, J.C., Bannerman, D.D., Winn, R.K., Sebtí, S.M., Hamilton, A.D. and Harlan, J.M. (2002) Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 15309–15316.
- [22] Zhong, W.B., Liang, Y.C., Wang, C.Y., Chang, T.C. and Lee, W.S. (2005) Lovastatin suppresses invasiveness of anaplastic thyroid cancer cells by inhibiting Rho geranylgeranylation and RhoA/ROCK signaling. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 615–629.
- [23] Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. and Hung, M.C. (2001) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 3, 245–252.
- [24] Dai, Y., Khanna, P., Chen, S., Pei, X.Y., Dent, P. and Grant, S. (2007) Statins synergistically potentiate 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) lethality in human leukemia and myeloma cells by disrupting Ras farnesylation and activation. *Blood* 109, 4415–4423.

