

# TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biomedicina (B11.56.1)

## LA INACTIVACIÓN DE PIM QUINASAS POTENCIA LA MUERTE CELULAR MEDIADA POR EL LIGANDO DE MUERTE TRAIL EN GLIOBLASTOMA

**SANTIAGO SERRANO SÁENZ**

INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA “LÓPEZ-NEYRA”  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

2019



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Santiago Serrano Sáenz  
ISBN: 978-84-1306-209-9  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/55755>



**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<b>CAPÍTULO 1: GLIOBLASTOMA MULTIFORME</b>	<b>12</b>
<b>CÁNCER: UNA VISIÓN GENERAL</b>	<b>12</b>
<b>ASTROCITOMAS: UN GRUPO DE TUMORES CEREBRALES</b>	<b>14</b>
<b>GLIOBLASTOMA MULTIFORME</b>	<b>15</b>
PROLIFERACIÓN CELULAR DESCONTROLADA	16
ROBUSTA ANGIOGÉNESIS Y MIMETISMO VASCULAR	17
INFILTRACIÓN DIFUSA	18
PRODUCCIÓN DE ZONAS NECRÓTICAS	19
ALTA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR RADIO- Y QUIMIOTERAPIA	19
PRESENCIA DE MACRÓFAGOS M2	20
ACUMULACIÓN DE LA INESTABILIDAD GENÓMICA	20
PRESENCIA DE GSCs	21
<b>ORIGEN DEL GLIOBLASTOMA</b>	<b>22</b>
<b>LA HISTORIA CLÍNICA I: LOCALIZACIÓN, SINTOMATOLOGÍA Y DETECCIÓN</b>	<b>24</b>
<b>LA HISTORIA CLÍNICA II: TERAPIA ACTUAL FRENTE AL GBM</b>	<b>25</b>
CIRUGÍA	26
RADIOTERAPIA	26
QUIMIOTERAPIA	26
BEVACIZUMAB	28
NOVOTTF-100	28
<b>CAPÍTULO 2: APOPTOSIS</b>	<b>30</b>
<b>EL CONCEPTO DE MUERTE CELULAR</b>	<b>30</b>
<b>BREVE HISTORIA DE LA APOPTOSIS</b>	<b>31</b>
<b>APOPTOSIS</b>	<b>32</b>
<b>CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y MORFOLÓGICAS DE LA APOPTOSIS</b>	<b>34</b>
PROCESAMIENTO PROTEICO	34
CONDENSACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA	34
TRANSLOCACIÓN DE FOSFATIDILSERINA	35
<b>VÍA EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA: DOS RUTAS PARA ACTIVAR APOPTOSIS</b>	<b>35</b>
<b>CASPASAS</b>	<b>38</b>
<b>PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LA APOPTOSIS (IAPs)</b>	<b>43</b>
<b>APOPTOSIS MEDIADA POR TRAIL</b>	<b>45</b>
<b>RECEPTORES DE TRAIL, EL PRIMER NIVEL DE REGULACIÓN DE LA RUTA</b>	<b>46</b>
<b>FORMACIÓN DEL DISC</b>	<b>49</b>
<b>SEÑALIZACIÓN NO APOPTÓTICA DE TRAIL</b>	<b>52</b>
<b>REGULACIÓN POST-TRANSDUCCIONAL DE LA APOPTOSIS</b>	<b>53</b>

FOSFORILACIÓN	53
UBIQUITINACIÓN	54
O-GLICOSILACIÓN	55
<b>ESTABILIZACIÓN DEL DISC EN LA MEMBRANA</b>	<b>56</b>
<b>ESCENARIO ACTUAL EN LA INVESTIGACIÓN CON TRAIL</b>	<b>57</b>
ESTRÉS EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE)	58
MIMÉTICOS DE SMAC	58
<b>SENSIBILIZACIÓN A TRAIL EN EL MODELO DE GBM</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 3: PIM QUINASAS</b>	<b>62</b>
<b>INTRODUCCIÓN A LA FAMILIA DE LAS PIM QUINASAS</b>	<b>62</b>
<b>PROTEÍNAS SUSTRATO DE PIM QUINASAS</b>	<b>64</b>
<b>PAPEL DE PIM QUINASAS EN EL DESARROLLO DE TUMORES</b>	<b>66</b>
CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN	67
APOPTOSIS	67
EXPRESIÓN GÉNICA	68
RESISTENCIA A RADIO Y QUIMIOTERAPIA	70
METABOLISMO ENERGÉTICO	70
<b>INHIBIDORES DE PIM QUINASA</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 4: P62/SEQUESTROMA-1</b>	<b>76</b>
<b>INTRODUCCIÓN A P62: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN</b>	<b>76</b>
DOMINIO N-TERMINAL PHOX/BEM1P (PB1)	78
DOMINIO DE INTERACCIÓN CON LC3 (LIR)	79
DOMINIO DE INTERACCIÓN CON KEAP1 (KIR)	80
DOMINIO DE ASOCIACIÓN A UBIQUITINA (UBA)	80
<b>P62 Y PATOLOGÍA: SU ROL EN CÁNCER</b>	<b>81</b>
<b>PAPEL DE P62 EN LA REGULACIÓN DE APOPTOSIS</b>	<b>84</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>86</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>90</b>
<b>CULTIVO DE CÉLULAS</b>	<b>92</b>
<b>INHIBIDORES</b>	<b>95</b>
<b>OBTENCIÓN DE TRAIL RECOMBINANTE Y TRAIL BIOTINILADO</b>	<b>96</b>
<b>SILENCIAMIENTO CON siRNA</b>	<b>97</b>
<b>DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE APOPTOSIS</b>	<b>98</b>
<b>WESTERN BLOT Y ANTICUERPOS</b>	<b>98</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>100</b>
<b>ENSAYO DE CLONOGENICIDAD</b>	<b>101</b>
<b>ENSAYO DE FORMACIÓN DE NEUROESFERAS</b>	<b>101</b>
<b>SOBRE-EXPRESIÓN DE BCL-XL</b>	<b>101</b>
<b>MEDIDA DE LA INTERNALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE TRAIL DR5 POR CITOMETRÍA DE FLUJO</b>	<b>103</b>
<b>ENSAYO DE AISLAMIENTO DEL DISC</b>	<b>103</b>
<b>ARRAY DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON APOPTOSIS</b>	<b>104</b>
<b>DETECCIÓN DE FOSFOPROTEÍNAS POR ESPECTOMETRÍA EN MASAS (MS-MS)</b>	<b>105</b>

CO-INMUNOPRECIPITACIÓN	107
MUTAGENESIS DIRIGIDA	107
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	108
<b>RESULTADOS</b>	<b>112</b>
LAS CÉLULAS DE GBM SON RESISTENTES A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TRAIL	112
ALTAS DOSIS DEL INHIBIDOR DE PARP PJ34 SENSIBILIZAN A LAS CÉLULAS DE GBM A LA MUERTE INDUCIDA POR TRAIL A TRAVÉS DE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE PARP	113
LOS INHIBIDORES DE PIM SENSIBILIZAN A LAS CÉLULAS DE GBM A LA MUERTE INDUCIDA POR TRAIL	115
EL SILENCIAMIENTO DE PIM TAMBIÉN SENSIBILIZA A LAS CÉLULAS DE GBM A LA MUERTE INDUCIDA PRO TRAIL	118
EL TRATAMIENTO COMBINADO CON SGI-1776 + TRAIL TAMBIÉN INDUCE APOPTOSIS EN CONDICIONES DE HIPOXIA	119
EL TRATAMIENTO COMBINADO INDUCE APOPTOSIS EN NEUROESFERAS DERIVADAS DE LÍNEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS DE GBM	120
EL TRATAMIENTO COMBINADO ACTIVA A CASPASA-8 Y 3 A TRAVÉS DE TRAIL-R2/DR5	121
LAS CÉLULAS DE GBM SON DE TIPO II YA QUE DEPENDEN DE LA MITOCONDRIA PARA INDUCIR APOPTOSIS	124
LA INHIBICIÓN DE PIM QUINASAS INTERACCIONA CON LA RUTA DE TRAIL AGUAS ARRIBA DE LA MITOCONDRIA	125
LA INHIBICIÓN DE PIM QUINASAS INTERACCIONA CON LA RUTA DE TRAIL EN EL DISC	126
LA INHIBICIÓN DE PIM REGULA LA EXPRESIÓN DE TRAIL-R2/DR5 EN MEMBRANA A NIVEL POST-TRANSCRIPCIONAL.	126
LA INHIBICIÓN DE PIM QUINASAS REDUCE LA INTERNALIZACIÓN DE TRAIL-R2/DR5, PERMITIENDO LA ACTIVACIÓN PROLONGADA DE CASPASA-8 POR TRAIL	129
LA INHIBICIÓN DE PIM QUINASAS MODIFICA CLARAMENTE LA FIRMA DE FOSFORILACIÓN EN CÉLULAS DE GBM	130
LA INHIBICIÓN DE PIM QUINASAS REGULA EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE P62/SQSTM1 Y SU INTERACCIÓN CON EL DISC EN CÉLULAS DE GBM	135
P62/SQSTM1 MODULA EL INCREMENTO DE TRAIL-R2/DR5	136
LA FOSFORILACIÓN DE P62/SQSTM1 EN EL RESIDUO SER332 ESTÁ INVOLUCRADA EN LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE TRAIL-R2/DR5 MEDIADA POR PIM QUINASAS	138
LA INHIBICIÓN DE LAS PIM QUINASAS TAMBIÉN SENSIBILIZA A TRAIL EN OTROS MODELOS TUMORALES	140
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>146</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>156</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>160</b>
<b>ANEXO 1. GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	<b>178</b>
<b>ANEXO 2. TABLA DE AMINOÁCIDOS</b>	<b>186</b>



## Resumen

El Glioblastoma multiforme (GBM) es un tipo de cáncer cerebral altamente agresivo producido por la proliferación descontrolada de las células astrocíticas. A pesar de ser el tumor cerebral primario más frecuente, las opciones terapéuticas son muy escasas, y el pronóstico que se plantea a los pacientes es muy pobre. El protocolo actual contra esta enfermedad consiste en eliminar la masa tumoral primaria con cirugía, seguida de un tratamiento combinado de radio- y quimioterapia con temozolomida. Sin embargo, la alta infiltración de células tumorales a través del tejido cerebral, unida a la gran resistencia que presentan las células de este tumor a la apoptosis inducida por la terapia estándar provocan la recaída del paciente a los pocos meses. De este modo, a pesar del gran esfuerzo que se está llevando a cabo en la investigación biomédica actual, los pacientes de GBM presentan una esperanza de vida de 14,6 meses. Ante este devastador escenario, urge la necesidad de encontrar nuevas terapias que planteen una esperanza curativa a estos pacientes. Uno de los proyectos de nuestro laboratorio estudia los mecanismos celulares y



moleculares del GBM, con el fin de encontrar terapias de precisión más seguras y fiables para el tratamiento de esta enfermedad. En la presente tesis doctoral, proponemos el tratamiento con el ligando de muerte TRAIL para pacientes con glioma maligno. TRAIL es una citoquina perteneciente a la súper-familia del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) con capacidad de activar la vía extrínseca de apoptosis a través de sus receptores específicos. Tras su descubrimiento, esta terapia despertó un gran interés dada su alta capacidad de inducir apoptosis selectivamente en células tumorales. Lamentablemente, la mayoría de las células de GBM testadas en ensayos preclínicos son resistentes a la muerte inducida por TRAIL. Dado el enorme potencial que plantea este tipo de terapias, es importante identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan vencer estos mecanismos de resistencia. Fruto de nuestras investigaciones, hemos encontrado que la inhibición de Pim quinasas es una excelente diana para sensibilizar a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL. Las Pim son una familia de serin/treonin quinasas altamente expresadas en tumores, que regulan procesos clave como proliferación, metabolismo, expresión de oncogenes, inhibición de la apoptosis y metástasis. Nuestros resultados han demostrado que tanto la inhibición química como genética de Pim quinasas sensibilizan a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL. Esta inducción de apoptosis está mediada por el receptor TRAIL-R2/DR5 y requiere de la activación de la vía mitocondrial para ser llevada a término. La sensibilización a TRAIL mediada por Pim quinasas tiene lugar en etapas tempranas de activación de la ruta extrínseca, concretamente durante la formación del complejo DISC, complejo formado por la citoquina, su receptor, el efector FADD y la caspasa-8 iniciadora. Nuestros resultados muestran como, tras la inhibición o silenciamiento de las Pim quinasas, se produce un incremento de los niveles de TRAIL-R2/DR5 en membrana, lo que favorece una mayor formación de DISC, incrementando la activación de caspasa-8. Nuestros resultados demuestran que la inhibición de Pim quinasas reducen la internalización, mediada por TRAIL, del receptor TRAIL-R2, lo que favorece una activación sostenida de la ruta extrínseca. La inhibición de Pim quinasas altera profundamente la firma de fosforilación de la célula. Una de las proteínas que más se altera es SQSTM1/p62. P62 es una proteína de andamiaje (*scaffold*), encargada de captar proteínas ubiquitinadas para presentarlas a LC3 en la cara interna del autofagosoma, por lo que es considerada un receptor de la autofagia selectiva. Nuestros resultados demuestran que p62 interacciona a nivel basal con TRAIL-R2/DR5 y el silenciamiento de p62 incrementa los niveles de TRAIL-R2/DR5. Estos datos sugieren que los niveles de este receptor están regulados a través de la vía lisosomal por p62. En un contexto de inhibición de Pim quinasas en cambio, la interacción entre p62 y TRAIL-R2/DR5 se inhibe, aumentando notablemente los niveles del receptor de muerte. Una de las fosforilaciones que desaparecen en p62 tras la inhibición de Pim

quinasas es la de Ser332 en el dominio LIR. Este dominio es el encargado de la unión entre p62 y LC3. Un mutante constitutivamente fosforilado de p62 en este residuo inhibe notablemente el incremento de TRAIL-R2/DR5 y reduce la sensibilización a TRAIL que observamos tras la inhibición de Pim quinasas. Globalmente, nuestros datos suponen la primera evidencia de que la inhibición de Pim quinasas regula la sensibilidad a TRAIL en GBM, favoreciendo la presencia de TRAIL-R2/DR5 en membrana, poniendo de manifiesto la importancia del estado de fosforilación de p62 en la regulación de la apoptosis por la ruta extrínseca. Los resultados de esta tesis abren una nueva vía terapéutica para pacientes de GBM, basada en la sensibilización a TRAIL a través de la inhibición de las Pim quinasas.



# INTRODUCCIÓN

---



# Capítulo 1: Glioblastoma Multiforme

## Cáncer: una visión general

Cáncer es una palabra empleada para definir a un conjunto de enfermedades que tienen como característica general el crecimiento anormal de un determinado tejido. A pesar del uso genérico de dicho concepto, la realidad es que el término engloba a un amplio rango de enfermedades que difieren en su origen y desarrollo, no solo entre distintos tipos cáncer, sino también entre pacientes con el mismo tipo de tumor. Tal es la heterogeneidad, que incluso puede ser determinada de forma espacio-temporal durante el desarrollo de una misma neoplasia. A día de hoy, la Organización Mundial de la Salud (OMS) sitúa al cáncer como la segunda causa de mortalidad, con 8,8 millones de muertes al año en el mundo.

En principio, la mutación de varios genes ha sido propuesta como la causa que inicia la formación de un tumor. De este modo, el criterio más simple para clasificar genes implicados en cáncer diferencia dos grupos: los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los oncogenes inducen el desarrollo de cáncer tras una mutación por ganancia de función, mientras que los genes supresores de tumores inducen tumores por pérdida de función [1]. Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado que los cánceres no presentan un patrón universal de regulación, por lo que diferentes genes pueden estar implicados en el origen de tumores. Numerosos estudios poblacionales concluyen que los genes alterados pueden variar incluso entre pacientes con el mismo tipo de cáncer, lo que ha dado lugar a una profunda revisión conceptual.

Hanahan y Weinberg definieron seis características distintivas que definen la progresión de una neoplasia desde un tejido normal. Esta transformación viene determinada por una señalización proliferativa, evasión de controles de supresión del crecimiento, resistencia a la muerte e inmortalización celular, inducción de angiogénesis y activación de los mecanismos de invasión o metástasis. Estas pautas de transición entre tejido normal y tumoral fueron revisadas por estos mismos autores en 2011, introduciendo la influencia del micro-entorno tumoral como factor igualmente determinante [2, 3].

Hoy en día, una gran cantidad de tumores han sido clasificados de acuerdo al tejido u órgano afectado. Entre esta vasta clasificación hay enfermedades con diferentes pronósticos clínicos dependiendo de la agresividad.

Según el Observatorio Mundial del Cáncer, organismo perteneciente a la OMS, el cáncer de pulmón encabeza la clasificación de incidencia y mortalidad en el mundo. Sin embargo, a pesar de que el cáncer de pulmón es altamente agresivo, la incidencia y la mortalidad no son los mejores parámetros para determinar la malignidad de un tumor. En consecuencia, se han descrito muchos parámetros, pero quizás la **supervivencia general** (OS, del inglés, *overall survival*) es el más intuitivo para describir la agresividad de los tumores. La OS se define como el tiempo de supervivencia desde que el paciente es diagnosticado. Otro parámetro representativo de la agresividad es la **tasa de supervivencia a cinco años**, definida como el porcentaje de pacientes vivos después de cinco años desde la fecha de diagnóstico de la enfermedad. Usando estos parámetros aparecen en el ranking otros tumores altamente agresivos, pero de menor incidencia. Entre estos tumores altamente malignos se encuentran algunos tipos de tumores cerebrales.

## Astrocitomas: un grupo de tumores cerebrales

En 2016, la OMS publicó la clasificación actualizada de los tumores del sistema central (“*WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*” o “Libro azul de la OMS”). En ella se clasifica a los tumores cerebrales en más de 120 grupos. Un grupo importante de ellos son los astrocitomas, tumores producidos por la proliferación descontrolada de células astrocíticas, que se subdividen en cuatro grados (I, II, III and IV) de acuerdo a su agresividad [4]. La descripción de cada grado está detallada en la **Tabla 1**.

Grado	Descripción
I	Baja capacidad de proliferación. Se aplica cirugía con un pronóstico favorable para el paciente.
II	Generalmente infiltrante, pero con poca capacidad de proliferación. Puede progresar a un tumor de mayor grado de malignidad.
III	Evidencia histológica de malignidad, atipia nuclear y alta capacidad de proliferación. La cirugía es acompañada de radio- y/o quimioterapia.
IV	Muy agresivo, altamente proliferativo e infiltrante. Producción de necrotización. Rápida evolución pre- y post-operatoria. La cirugía se acompaña de radio- y quimioterapia. Pronóstico fatal.

Tabla 1. Criterios de clasificación de la OMS para astrocitomas [4].

Uno de los cambios más importantes con respecto a la clasificación anterior fue la reorganización de los tumores astrocíticos. Mientras que en 2007 los astrocitomas eran un solo grupo, en la clasificación de 2016 aparecen dos. La nueva clasificación incluye criterios moleculares e histológicos para definir este tipo de tumores [5]. Los cambios en la nueva clasificación se muestran de forma comparativa en la **Tabla 2**.

<b>Clasificación de tumores del SNC de 2007</b>		<b>Clasificación de tumores del SNC de 2016</b>	
Tumores astrocíticos	Grado	Tumores difusos astrocíticos y oligodendrogiales	Grado
Astrocitoma subependimal de células gigantes	I	Astrocitoma difuso. IDH-mutante	II
Astrocitoma pilocítico	I	Astrocitoma anaplásico. IDH-mutante	III
Astrocitoma pilomixóide	II	Glioblastoma. IDH- <i>wildtype</i>	IV
Astrocitoma difuso	II	Glioblastoma. IDH-mutante	IV
Xanthoastrocitoma pleomórfico	II	Glioma difuso de línea media. H3K27M-mutante	IV
Astrocitoma anaplásico	III		
Glioblastoma	IV	<b>Otros astrocitomas</b>	
Glioblastoma de células gigantes	IV	Astrocitoma pilocítico	I
Gliosarcoma	IV	Astrocitoma subependimal de células gigantes	I
		Xanthoastrocitoma pleomórfico	II
		Xanthoastrocitoma pleomórfico anaplásico	III

Tabla 2. Comparación entre las clasificaciones de tumores del SNC de 2007 y 2016 [4, 5].



Como muestra la **Tabla 2**, los astrocitomas engloban un heterogéneo grupo de enfermedades con probabilidad de curación muy variable, desde el buen pronóstico del astrocitoma pilocítico al fatal del glioblastoma grado IV.

### Glioblastoma multiforme

Glioblastoma (GBM), también conocido como glioma maligno y glioblastoma multiforme, es el más común y a la vez el más agresivo de los tumores cerebrales primarios. A pesar de los avances, el pronóstico de los pacientes es muy pobre, presentando una media de supervivencia de 14,6 meses y una tasa de supervivencia a 5 años del 5%. La incidencia de estos tumores es de 3,19/100.000 y la media de los pacientes diagnosticados es de 64 años [6, 7]. Dada la complejidad que presentan estos tipos de tumores, la terapia actual se muestra insuficiente, considerándose medicina paliativa para los pacientes. Estos desalentadores datos sitúan al GBM como uno de los grandes retos para la medicina moderna, impulsando a numerosos investigadores a identificar los mecanismos que regulan la enfermedad, con el objetivo de proponer una alternativa terapéutica eficaz que ofrezca esperanza para estos pacientes.

Los GBMs pueden ser clasificados en dos grupos: primarios y secundarios. Los primarios, aproximadamente el 90%, aparecen *de novo* en personas de avanzada edad, mientras que los secundarios, tumores desarrollados a partir de astrocitomas de grados inferiores (II y III), pueden manifestarse en personas más jóvenes. No se aprecian diferencias histopatológicas remarcables entre ambos tipos de GBMs, pero sí que se han definido claros patrones de alteraciones genéticas [8, 9]. En 1996, Watanabe *et al.* analizaron biopsias de 49 pacientes y determinaron que mutaciones en TP53 eran muy frecuentes en GBM secundarios (67%) pero raramente apreciables en primarios (11%), mientras que la sobre-expresión de EGFR era patente en el 63% de los primarios, pero poco extendida en los secundarios (10%). Solo uno de los pacientes entre el total de los analizados mostró ambas modificaciones [9]. Sin embargo, el criterio más importante para clasificar gliomas en la actualidad es la mutación en la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH). Dicha mutación es muy frecuente en GBMs secundarios (>80%) pero rara en primarios (<5%). Este dato concuerda con que el 80% de los astrocitomas difusos (grado II) y astrocitomas anaplásicos (grado III) presentan esta mutación, reforzando la idea de que estos GBM son los precursores de los gliomas grado IV secundarios [8].

Para explicar la agresividad de estos tumores es necesario comprender la alta complejidad que los caracteriza:

- ***Proliferación celular descontrolada.*** Alteraciones en proteínas que regulan el ciclo celular como p53 o Rb son muy frecuentes en GBM, lo que favorece el descontrol de las divisiones celulares. Estas mutaciones producen la activación constitutiva de las rutas de PI3K y MAPK [10]. La fosforilación de Rb1 secuestra a los factores de transcripción de la familia E2F, inhibiendo la expresión de diferentes genes relacionados con el progreso del ciclo celular. Rb está mutado o delecionado en el ~25% de los gliomas. Por otro lado, la ruta de las MAPK induce la expresión de ciclina D1, la cual se asocia con las proteínas reguladoras del ciclo celular CDK4 y 6 activándolas. Además, favorecen la acción de CDK2 a través de la inhibición de su inhibidor p27 (Figura 1). Las CDKs son posiblemente las proteínas más importantes en la regulación positiva del ciclo celular. El complejo CDK4/6 fosforila a Rb, promoviendo la inhibición de E2F. Tanto CDK4 como CDK6 aparecen amplificadas en el 15% de los GBMs. Rb también está negativamente regulada por la proteína antitumoral p16<sup>Ink4a</sup> (codificada por el gen CDKN2A), la cual inhibe a CDK4 y 6. P16<sup>Ink4a</sup> se encuentra inactivada por depleción alélica o hiper-metilación en ~50-70% de los gliomas [10, 11].

P53 previene la división celular por parada en G1 ante un contexto de inestabilidad genómica, induciendo la muerte celular por apoptosis. En condiciones de estrés genotóxico o citotóxico, p53 es estabilizado y regula la expresión de más de 2.500 genes, entre ellos CDKN1A. Mutaciones o pérdida de p53 reduce la expresión de p21, favoreciendo la progresión del ciclo celular en células aberrantes. Por otra parte, p14<sup>ARF</sup>, *splicing* alternativo de CDKN2A e inhibidor de CDK2, está positivamente regulado por p53. En condiciones oncogénicas, MDM2 y MDM4 (amplificado en ~4-10% de los GBM) ubiquitina a p53, inhibiendo su capacidad transcripcional [10].

Aproximadamente el 50% de los pacientes de GBM presentan mutaciones o pérdida del gen supresor de tumores PTEN. Alteraciones en el funcionamiento de PTEN resultan en la activación constitutiva de la ruta de PI3K, favoreciendo la activación de Akt. Dicha quinasa induce la fosforilación y exclusión del núcleo del factor de transcripción FoxO, un regulador positivo de la expresión de p21 y p27. Por lo tanto, la exclusión nuclear de dicho factor de transcripción reduce los niveles de p21 y p27, favoreciendo la acción

descontrolada de las CDKs, que promueve la progresión del ciclo celular y la inestabilidad genómica. PTEN también aumenta la expresión de p53 [10].

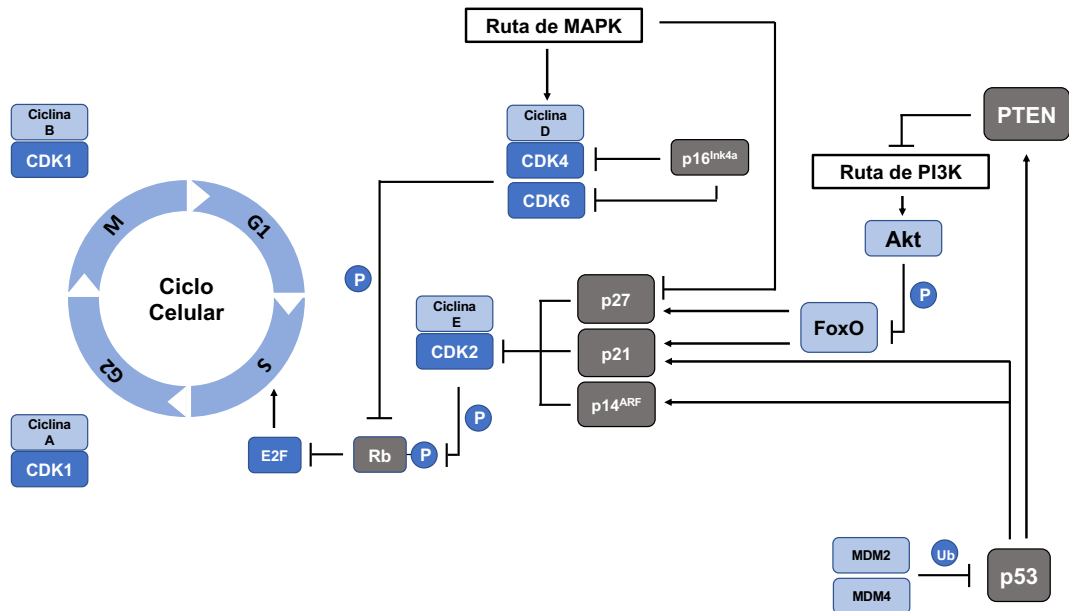


Figura 1. Regulación del ciclo celular [10, 11].

- **Robusta Angiogénesis y mimetismo vascular.** La proliferación descontrolada de las células de GBM tiene como consecuencia un rápido aumento de la masa tumoral y la aparición de zonas hipóxicas y anóxicas en el interior del tumor. Esta depleción de los niveles de oxígeno requiere una respuesta de adaptación. Bajas concentraciones de oxígeno inducen la respuesta a hipoxia mediada por HIFs (del inglés, *Hypoxia Inducible Factors*). HIFs son una familia de factores de transcripción constitutivamente expresados. En normoxia, la subunidad  $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  o HIF3 $\alpha$ ) es hidroxilada por las proteínas prolihidroxilasas (PHD), lo que favorece su poli-ubiquitinación por VHL y su posterior degradación vía proteosomal. En condiciones de hipoxia, la hidroxilación mediada por PHD se inhibe estabilizando a las subunidades alfa, la más frecuente de las cuales es HIF1 $\alpha$ . En el núcleo, la subunidad  $\alpha$  interacciona con la constitutivamente estable subunidad  $\beta$  promoviendo su regulación transcripcional. Se estima que un 1% de los genes expresados están regulado por HIFs y contienen en su promotor elementos de respuesta a hipoxia (HRE) del tipo '-RCGTG-3'. Entre ellos aparecen genes relacionados con angiogénesis y distribución del oxígeno (EPO, VEGF, ANGPT1/2 o NOS2/3) [12].

- La angiogénesis produce la vascularización a partir de células endoteliales provenientes de los micro-vasos aledaños al tumor. Los gliomas son uno de los tumores sólidos más vascularizados. La profusa angiogénesis es una característica común entre GBMs primarios y secundarios, considerándose un indicador de la transición de astrocitomas de grado II/III a GBM grado IV. A pesar de las similitudes histopatológicas en relación a la vascularización, han sido descritas diferencias a nivel molecular entre gliomas primarios y secundarios [10, 13]. Un estudio comparativo de citoquinas pro-angiogénicas en 22 pacientes de GBM (14 primarios and 8 secundarios) mostró una expresión predominante de VEGF-A en GBMs primarios mientras que en GBMs secundarios predominó PDGF-AB [14]. Por otra parte, han sido descritos fenómenos de mimetismo vasculogénico en GBMs. Este proceso consiste en la producción de falsos vasos sanguíneos formados directamente por células tumorales imitando la vascularización normal de un tumor. En GBM, este tipo de vasculatura produce discontinuidades en la barrera hematoencefálica, lo que contribuye a la formación del edema craneal [15]. Wang *et al.* demostraron que las células madre de glioma, conocidas en inglés como *stem-like cells* (CD133+) expresan VE-cadherina, adquiriendo características de células endoteliales, lo que les otorga un papel fundamental para la producción de estos vasos miméticos [16].
- ***Infiltración difusa.*** La infiltración de células tumorales en el tejido cerebral sano es la principal causa responsable de la aparición de recidivas tras la eliminación de la masa tumoral por cirugía, hecho que limita gravemente las posibilidades de éxito en el tratamiento contra el GBM. En el 90% de los gliomas de grado IV, se desarrollan tumores secundarios a partir de células invasivas localizadas más allá del borde fijado para la cirugía [10]. Los astrocitos tumorales se infiltran en el neurópilo a través de la sustancia blanca, llegando a cruzar incluso el cuerpo caloso. Esta es la razón que explica la aparición de masa tumoral en ambos hemisferios cerebrales. El glutamato ha sido relacionado con esta infiltración difusa de células tumorales en GBM. Este neurotransmisor está presente en altas concentraciones en la sustancia blanca. Gliomas que son mutantes para IDH, los más comunes en GBMs secundarios, son deficientes en el metabolismo del glutamato, lo que les produce una fuerte necesidad de importarlo del entorno. De esta forma, el glutamato actúa como quimio-atrayente, explicando al menos en parte, el comportamiento infiltrativo de estas células [17]. Experimentos de análisis de scRNA-Seq (del inglés: *Single-Cell RNA-Seq*) demostraron la existencia de diferencias intra-tumorales entre la masa primaria y las células infiltrativas. Por el contrario, se observa un patrón de

expresión bastante consistente entre células infiltrativas de distintos pacientes, sugiriendo una firma genética consistente en la regulación de la infiltración. Como era de esperar, los HRE estaban más expresados en el núcleo de la masa tumoral (HIF1 $\alpha$ , VEGF-A, PGK1, CA9 y SPP1). Sin embargo, las células infiltrativas mostraron baja expresión de los HRE y una mayor expresión de genes implicados en invasión de la matriz intersticial, como por ejemplo ATP1A2 y sus reguladores FXYD1, PRODH, FGFR3 y LMO3. El análisis de ontología de genes (GO) mostró un enriquecimiento en genes implicados en procesos biológicos como migración celular, adhesión célula-célula, transporte de aniones y desarrollo del sistema nervioso [18].

Sorprendentemente, a pesar de la alta movilidad que presentan los gliomas de grado IV no se observan metástasis de GBM fuera del SNC. De este modo, las células de glioma se diseminan cerca de los vasos sanguíneos, pero son incapaces de atravesar la membrana basal de las células endoteliales [10].

- ***Producción de zonas necróticas.*** El flujo sanguíneo insuficiente y la consecuente anoxia favorecen la aparición de zonas necrosadas en el interior de la masa primaria. Ante estas condiciones, Bcl2L12 juega un papel crucial. Esta proteína está sobre-expresada en GBMs primarios e inhibe la apoptosis por vía mitocondrial, favoreciendo la activación de la necrosis regulada. Bcl2L12, esta localizada tanto en el núcleo como en citoplasma. En el citoplasma, Bcl2L12 inhibe la activación de las caspasas efectoras 3 y 7, bloqueando la apoptosis. En el núcleo, Bcl2L12 interacciona con p53 inhibiendo su acción transcripcional, disminuyendo la expresión de genes supresores de tumores como: p21, DR5, Noxa y PUMA [10, 19].
- ***Alta resistencia a la apoptosis inducida por radio- y quimioterapia.*** Como describiremos más adelante, la muerte celular por apoptosis está regulada por dos vías: la extrínseca, mediada por receptores de muerte, y la intrínseca, mediada por la mitocondria. Acerca de la primera, la mayoría de las células de GBM son resistente a la muerte inducida por ligandos de muerte de la familia del TNF- $\alpha$  (TRAIL y FasL). Esta resistencia es debida principalmente a la baja expresión de receptores de muerte, la sobre-expresión de receptores trampa o la alta expresión de proteínas inhibitoras de la ruta (cFLIP, PEA-15 o RIP1) [10, 20, 21]. En referencia a la ruta intrínseca, esta también está fuertemente inhibida por la sobre-expresión de miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2. La alta expresión de estas proteínas previene de la permeabilización de la membrana externa

mitocondrial, impidiendo la liberación de citocromo c y por tanto la formación del apoptosoma, plataforma necesaria para la activación de caspasa-9, que es la caspasa que inicia la ruta intrínseca de apoptosis [22]. Se han descrito al menos tres miembros de la familia Bcl-2 sobre-expresados en GBM: Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 [23].

- **Presencia de macrófagos M2.** Los macrófagos pueden ser clasificados en dos subtipos: los M1 (clásicamente activados) o los M2 (alternativamente activados). La determinación de uno u otro subtipo está condicionada generalmente por las citoquinas del microambiente. Los macrófagos M2 están relacionados con inmunosupresión, remodelación de la matriz extracelular y metástasis. Los macrófagos asociados a tumores (TAMs, del inglés: *Tumor-associated macrophages*) son frecuentemente tipo M2. A pesar del privilegio inmune que confiere la barrera hematoencefálica, en GBM puede detectarse una alta presencia de TAMs y ha sido definida una clara interacción entre estos y las células tumorales. Los macrófagos y células de la microglía se acumulan alrededor del tumor, adquiriendo una morfología ameboide, y se han descrito numerosas evidencias que relacionan su presencia con la agresividad del tumor. Existe una correlación positiva entre la presencia de TAMs y la densidad de GSCs [24]. Las GSCs tienen más capacidad de reclutar TAMs que las células diferenciadas. Por otra parte, los TAMs liberan TGF- $\beta$ , induciendo la expresión de MMP-9 en GSCs, favoreciendo la invasividad de estas [25]. La Periostina (POSTN), ha sido propuesta como quimio-atrayente de TAMs en gliomas. En este sentido, el grupo de Shideng Bao demostró que el silenciamiento de POSTN reducía notablemente la presencia de TAMs en el tumor, inhibiendo la progresión tumoral en ratones. Además, también observaron una fuerte expresión de POSTN en GSCs [26].
- **Acumulación de la inestabilidad genómica.** Diversos estudios de genómica comparativa revelan alteraciones de número de copias de ADN en GBM. La pérdida del brazo largo (q) de los cromosomas 6 y 10 así como la ganancia del 19q son asociados con una baja supervivencia en pacientes de GBM, mientras que la pérdida de 19q correlaciona con una mayor supervivencia (>3 años) [10]. El GBM fue el primer modelo tumoral estudiado en el TCGA (del inglés: *The Cancer Genome Atlas*). Aquí se reportó tanto la alteración a nivel genómico de NF1, PARK2 y PTPRD como la amplificación de AKT3, FGFR2 e IRS2. Además, se ha destacado la pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés: *loss of heterozygosity*) de 17q, fragmento donde se localiza TP53 [27]. La LOH en brazo corto (p) de los cromosomas 1 y el 19q han sido ampliamente estudiadas en glioma, siendo la

LOH en 19q13.3 una de las alteraciones más frecuentes en GBMs secundarios (54%) pero raramente detectada en primarios (6%). Por otra parte, la LOH del 1p es menos frecuente, aunque también detectada en gliomas [28]. Otra alteración muy recurrente en GBM es la LOH parcial o total del cromosoma 10. La región 10q presenta importantes genes relacionados con esta enfermedad (PTEN, FGFR, MKI67 y MGMT). Alekseeva *et al.* estudiaron la situación de este cromosoma en 124 pacientes, encontrando LOH en 10q 23,3-26,3 en el 62,1% de los casos. Desglosado por genes, observaron pérdida de PTEN en el 53,3%, de FGFR2 en el 66%, de MKI67 en el 60,6% y MGMT en el 60,2% [29].

- **Presencia de GSCs.** Como se ha mencionado anteriormente, en GBM, al igual que en otros tumores se ha detectado la presencia de células madre tumorales. En el caso de los gliomas, son conocidas como GSCs [30-32]. Esta subpoblación celular tiene la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse a células tumorales de distinto linaje. Actualmente, las GSCs son consideradas como una población fundamental para el inicio de la enfermedad, aunque, como se ha descrito anteriormente, también juegan un papel importante en la progresión y vascularización. Por otro lado, ha sido demostrado que estas células pluripotentes presentan una alta resistencia a los tratamientos convencionales de radio- y quimioterapia, considerándose las principales responsables de la reaparición del tumor tras la cirugía. En 2006, Shideng Bao *et al.* demostraron que las GSCs (células CD133+) eran resistentes a la radiación ionizante por sobre-activación de los *checkpoint* de control de daños al ADN. Adicionalmente, demostraron que la inhibición de las proteínas Chk era suficiente para revertir este escenario [33]. Por otra parte, otros trabajos sitúan a los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) como los principales responsables de la resistencia a quimioterapia. ABCG2 provee a las GSCs de quimio-resistencia, favoreciendo el eflujo de compuestos antitumorales y disminuyendo la perfusión de las células endoteliales, lo que se traduce en una menor permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Esta resistencia a fármacos está mediada por Akt, que regula la translocación a la membrana de dichos transportadores [34]. Otros investigadores abogan porque las CSCs no expresan altos niveles de transportadores ABC, siendo la diferenciación la causante del incremento de dichos transportadores [35]. Desde la irrupción de las células *stem* en tumores, han sido identificados numerosos marcadores para GSCs. En 2004, Singh *et al.* definieron que las células CD133+ pero no las CD133- tenían la capacidad de regenerar un tumor en ratones inmunodeprimidos. Este ha sido considerado el primer criterio para identificar a estas células pluripotentes. Hoy se sabe

que la alta expresión de CD133 correlaciona con un mal pronóstico y con una alta resistencia a los tratamientos de radio- y quimioterapia. Además, las células CD133+ a menudo expresan Nestina, un marcador de célula madre neural considerado también marcador de GSCs [31, 32]. Sin embargo, otros trabajos han descartado la universalidad de CD133+, lo que ha guiado a muchos investigadores a la necesidad de encontrar nuevos indicadores moleculares. De este modo, la **Tabla 3** resume otros marcadores alternativos que han sido propuestos con el fin de identificar GSCs.

Marker	Function	Reference
Nestina	Marcador de célula madre neural	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
SALL4	Marcador de célula madre embrional	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
Oct-4	Marcador de célula madre embrional	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
SOX2	Marcador de célula madre embrional y tubo neural	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
c-Myc	Marcador de des-diferenciación	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
Klf4	Marcador de célula madre embrional y mesenquimal	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
STAT3	Marcador de célula madre embrional	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
NANOG	Marcador de célula madre embrional	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
CD133	Marcador de célula madre neural y endotelial	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
CD44	Marcador de célula madre mesenquimal	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
GFAP	Marcador de diferenciación de astrocito	Bradshaw <i>et al.</i> [36]
Olig2	Marcador de célula madre de glioma	Trépant <i>et al.</i> [37]
Bmi1	Marcador de célula madre hematopoyética	Dahlrot <i>et al.</i> [38]
L1CAM	Marcador de célula progenitora neuronal	Bao <i>et al.</i> [39]
CD15	Marcador de célula madre de ratón	Yanagisawa <i>et al.</i> [40]
A2B5	Marcador de oligodendrocito progenitor	Yanagisawa <i>et al.</i> [40]
Musashi	Marcador de célula madre glial y neuronal	Lagadec <i>et al.</i> [41]
Integrina 6 $\alpha$	Marcador de célula madre neural	Lathia <i>et al.</i> [42]

Tabla 3. Marcadores de diferenciación y CSCs.

La irrupción de las células iniciadoras de tumores en la aparición y regeneración de tumores ha desembocado en la proposición de una nueva hipótesis para dar explicación al origen de una neoplasia en la que se propone que la malignidad debe de surgir de la transformación de células con capacidad pluripotente [30].

## Origen del Glioblastoma

Al igual que en otros tipos tumorales, definir el origen del GBM es una tarea altamente controvertida en el seno de la investigación biomédica. Hasta la fecha, se han postulado dos modelos de peso que cuentan una aceptación mayoritaria entre la comunidad científica: el modelo



estocástico y el modelo jerárquico. El primero propone que la acumulación de alteraciones genómicas en células normales induce la formación de un tumor por expansión clonal. Por el contrario, el modelo jerárquico propugna que una población minoritaria de células transformadas con capacidad pluripotente son las responsables de la iniciación del tumor. La irrupción de las CSCs ha propiciado que el modelo estocástico pierda algo de peso. A priori, el modelo jerárquico es más consistente a la hora de explicar la heterogeneidad celular que se observa en algunos tipos de tumores, como ocurre en los gliomas. El hecho más importante que inclina la balanza a favor del modelo jerárquico para explicar el origen del GBM, es que actualmente se asume que solo las GSCs presentan la capacidad de generar tumores ortotópicos en ratones [10, 32, 43]. Sin embargo, la existencia de otros tipos de tumores con escasa o nula heterogeneidad hace que no se pueda descartar el modelo estocástico a la hora de determinar el origen del cáncer mediante un modelo unificado. De este modo, en los últimos años se ha definido un nuevo modelo, el modelo dinámico, que fusiona características de ambas corrientes. Esta tercera propuesta incorpora conceptos como la trans-diferenciación y el microambiente, abogando por la influencia del entorno del tumor para favorecer la adquisición de características pluripotentes, promoviendo así la aparición de la heterogeneidad observada en la masa tumoral [44, 45]. De este modo, el modelo estocástico aun es plausible incluso en tumores como el GBM donde se dan procesos jerárquicos bien definidos.

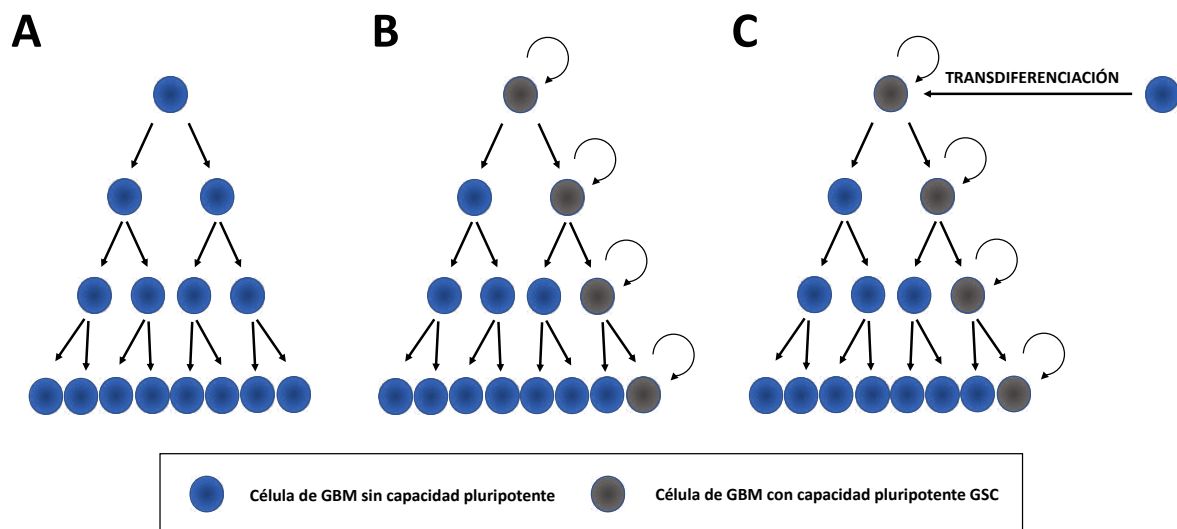


Figura 2. Modelos de origen del GBM. Modelo estocástico (A), modelo jerárquico (B) y modelo dinámico (C).

## La historia clínica I: Localización, sintomatología y detección.

De acuerdo a la clasificación de los tumores del SNC de la OMS, las GBMs se localizan por lo general en la zona subcortical de la materia blanca y profunda de la materia gris de ambos hemisferios cerebrales. En referencia a las áreas cerebrales, los gliomas IDH-*wildtype* presentan una distribución anatómica extendida (31% temporal, 24% parietal, 23% frontal y 16% occipital). Por el contrario, los IDH-mutantes tienen predilección por el lóbulo frontal, particularmente el ventrículo latero-rostral.

Los gliomas proliferan muy rápido y por tanto los pacientes muestran síntomas antes de los 3 primeros meses de desarrollo. Según la OMS, el síntoma más común es el aumento de la presión intracraneal producido por el volumen de la masa tumoral. Muchos pacientes son diagnosticados tras ataques o convulsiones. Otros síntomas frecuentes son los dolores de cabeza pulsantes, alteraciones del comportamiento, problemas cognitivos y náuseas. Los gliomas localizados en el lóbulo frontal a menudo presentan episodios de hemiparesia y afasia. También pueden darse casos de ataques epilépticos.

El método de detección más común para el diagnóstico de GBMs es la resonancia magnética (MRI, del inglés: *magnetic resonance imaging*) ya que ofrece más sensibilidad de detección que la tomografía computarizada (CT) [46]. En la pasada década, se han desarrollado nuevas modalidades de MRI que han arrojado datos importantes para la comprensión de la enfermedad, suponiendo una notable mejora en el diagnóstico y evolución de la enfermedad. Estos nuevos métodos de detección son [47]:

- **T2 estándar ponderado (T2w).** Actualmente, este método es capaz de detectar importantes características en la masa tumoral primaria, incluidas determinadas regiones como zonas necróticas y zonas circundantes. Además, permite distinguir la heterogeneidad del tumor.
- **T2 de recuperación de la inversión atenuada de fluido (T2-FLAIR).** El edema aparece representado en esta modalidad de MRI. El 90% de las recidivas se producen en la zona detectable por este método.

- **T1 ponderado de contraste aumentado (T1CE).** Es empleado entre 24 y 48 horas después de la cirugía para la búsqueda de tumores residuales. Este método ha supuesto un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes.
- **MRI funcional (fMRI).** Es muy útil antes de la cirugía, ayudando a identificar áreas que puedan afectar a la elocuencia del paciente tras la intervención.

A pesar de que el MRI es el método más sensible, la tomografía de emisión de positrones (PET) puede proveer información adicional sobre el diagnóstico, pronóstico y evolución de la enfermedad. Además, radio-trazadores del metabolismo de la glucosa o el transporte de aminoácidos también son empleados para la obtención de imagen de tumores. En el caso del GBM, los trazadores de glucosa son más recomendables ya que presenta una baja adquisición en las células no tumorales del tejido cerebral [48].

Otra limitación fundamental en la investigación actual del GBM es la dificultad para obtener un perfil molecular de la enfermedad en un determinado paciente. Estos tipos de diagnósticos son fundamentales para la aplicación de terapias basadas en la medicina de precisión. En otros modelos tumorales, la presencia de ADN circulante de células tumorales (ctDNA) en el plasma sanguíneo puede aportar mucha información a la hora de determinar el perfil de un determinado tumor. En cambio, la escasa presencia de células de glioma fuera de la cavidad craneal hace imposible este tipo de detección. En este sentido, el trabajo publicado por el grupo de Joan Seoane en 2015 ha supuesto un gran avance, demostrando que existe una alta presencia de este ADN en el líquido cerebrospinal. Además, este método permite determinar también cambios derivados de la evolución de la enfermedad [48].

## La historia clínica II: Terapia actual frente al GBM

Como hemos descrito arriba, el GBM es una enfermedad devastadora que presenta un desarrollo muy rápido. De este modo, sin tratamiento los pacientes presentan una esperanza de vida de tres meses [49]. La terapia actual para pacientes diagnosticados con GBM engloba cirugía (si esta es posible), seguida de tratamiento de radioterapia combinada con quimioterapia. El agente quimioterapéutico empleado en la terapia estándar es la temozolomida (TMZ). Sin embargo, esta estrategia es paliativa en pacientes de GBM ya que la media de supervivencia que presentan es

tan solo de 14 meses. Las causas principales que determinan esta limitada eficacia son: la infiltración difusa que hace que haya células que escapen de la cirugía, la presencia de células iniciadoras de tumor resistentes a la radio- y quimioterapia, y la sobre-activación de la enzima MGMT, encargada de reparar los daños alquilantes introducidos por la TMZ. Independientemente, los pacientes son tratados con anticonvulsivos y cortico-esteroides, que reducen los síntomas producidos por la expansión de la masa tumoral y el edema.

- **Cirugía.** Es normalmente el primer paso tras el diagnóstico de la enfermedad. Previamente, se lleva a cabo un estudio pormenorizado por MRI para decidir si el tumor es operable, o si por el contrario se encuentra en una zona vital. El avance en técnicas de imagen ha mejorado notablemente la planificación y el delineamiento de los bordes del tumor, lo que ha permitido a los cirujanos eliminar más eficientemente y de manera más segura la mayor parte de la masa tumoral [46]. Tras la cirugía, la presión intracraneal y el edema se reducen notablemente, lo que mejora la calidad de vida del paciente presentándose además una ganancia promedio de entre 3 y 12 meses [50]. En los últimos años, otra innovación importante ha sido la incorporación a la terapia de cirugía apoyada por fluorescencia. Consiste en la utilización de ácido 5-amino-leivutírico (5-ALA), un precursor natural de la hemoglobina que hace que las células tumorales emitan fluorescencia al ser excitadas con luz azul, lo que permite al cirujano eliminar los bordes del tumor de forma más eficiente. Sin embargo, los beneficios de este tipo de cirugía sobre la media de supervivencia aún no han sido cuantificados [50]. Tras la operación, se comprueba el éxito de ésta mediante MRI y entre 3 y 6 semanas después el paciente empieza en el programa de tratamiento de radio- y quimioterapia [46].
- **Radioterapia.** Los ciclos de radioterapia estándar actuales consisten en la aplicación de 60Gy en fracciones de dos ciclos de 30Gy en 6 semanas. Una segunda irradiación solo se considera segura transcurridos 5 años desde la primera, suponiendo una ganancia de vida de uno a dos años. Desgraciadamente, esta situación es poco frecuente en pacientes de GBM [50]. La mayor limitación de la radioterapia es, como se ha mencionado anteriormente, la presencia de células madre tumorales [33].
- **Quimioterapia.** Se aplica en paralelo a la radiación. El tratamiento estándar consiste en la administración diaria del agente alquilante TMZ, un triazeno que se vuelve activo a pH fisiológico, induciendo la producción de O-6-guanina, que aparece de forma errónea con

timina, introduciendo daños de doble cadena, lo que desencadena finalmente la activación de apoptosis mediada por daños en el ADN [51]. La TMZ es administrada durante la radioterapia a dosis de  $75\text{mg}/\text{m}^2$ , y después a  $150\text{-}200\text{mg}/\text{m}^2$ . La combinación de radio- y quimioterapia aumenta la supervivencia hasta los 14,6 meses, dos meses más que la radioterapia de forma individual [50, 52]. La eficiencia del tratamiento con TMZ depende del estado de metilación del promotor del gen que codifica para la proteína MGMT. MGMT repara daños alquilantes, por lo que juega un papel esencial en la respuesta al quimioterapéutico. El tratamiento en cambio es efectivo en aquellos pacientes en los que no se expresa dicha enzima por metilación de su promotor [51]. Es importante resaltar que el gen MGMT se encuentra en humanos en el extremo del brazo largo del cromosoma 10, por lo que la LOH de 10q podría afectar positivamente a la respuesta a TMZ.

Otra estrategia que está siendo objeto de investigación es la implantación de discos GLIADEL en la cavidad originada tras la cirugía. Estos discos están constituidos por un polímero biodegradable que libera carmustina de forma controlada. Al igual que la TMZ, la carmustina es un agente alquilante que induce daños en el ADN. Un meta-análisis llevado a cabo por Xing *et al.* concluyó que esta estrategia muestra un incremento en la supervivencia de los pacientes [53]. Ashby *et al.* observaron en su meta-análisis que los pacientes que eran tratados con GLIADEL más radio- y quimioterapia presentaban una mayor supervivencia que los pacientes que eran tratados con la terapia convencional (radio- y quimioterapia) [54].

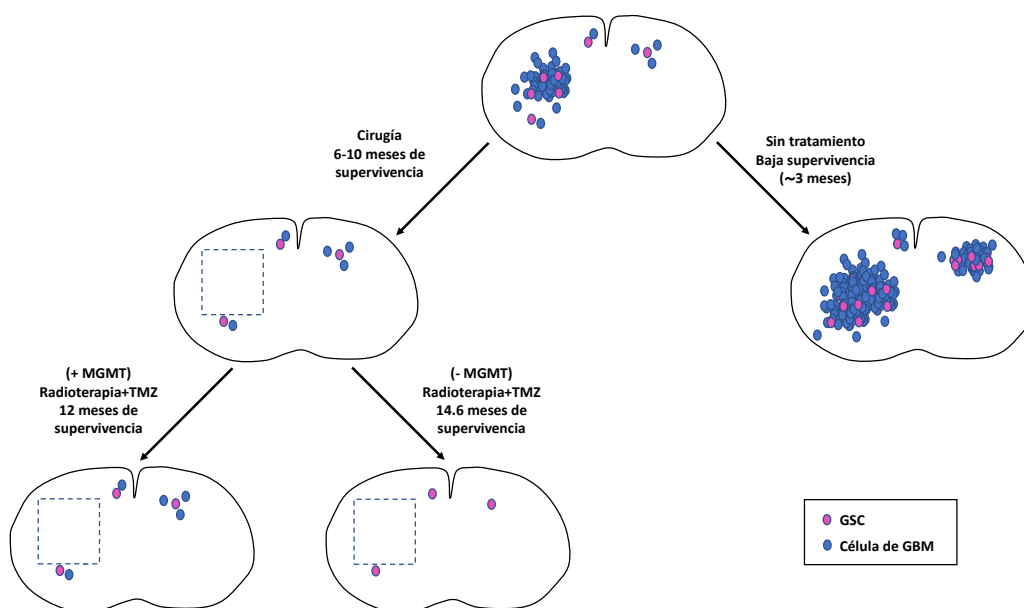


Figura 3. Terapia estándar para pacientes de GBM.

Tras la recaída del paciente se evalúa su estado mediante el cálculo del índice de Karnofsky (KPS), que consiste en una escala utilizada en oncología para evaluar las capacidades de un paciente tras un tratamiento. En casos clínicos de GBM, si el KPS supera una puntuación de 70, el paciente es elegible para otra intervención o para un ensayo clínico. A los pacientes que no superan dicha puntuación se les plantean las siguientes opciones:

- **Bevacizumab.** Es un anticuerpo monoclonal que neutraliza el efecto de VEGF-A. Tras su uso en otros modelos tumorales, a FDA aprobó su uso en GBM en 2009, tras dos ensayos clínicos de fase II [55]. Como se ha descrito previamente, el GBM presenta un desarrollo muy rápido, acompañado de una alta capacidad de vascularización. Los tumores cerebrales muestran una elevada secreción de VEGF, lo que incrementa la permeabilidad vascular, favoreciendo la aparición de edema [56]. Ante esta premisa, se propuso la inhibición de la señalización de VEGF como una alternativa interesante. Sin embargo, en un estudio de 2014 en el que participaron 978 pacientes, el grupo tratado con bevacizumab, pese a mostrar un mayor periodo de progresión libre de enfermedad, no registró un aumento de la supervivencia [57]. A día de hoy existe una gran controversia sobre la utilidad de este fármaco en pacientes de GBM, ya que, si bien no se ha demostrado un beneficio en la supervivencia, al menos puede producir un beneficio en la calidad de vida del paciente debido a la reducción del edema [58]. Por otra parte, es importante considerar que el aumento de la presión craneal producido por el edema ha sido relacionado con una reducción de la perfusión y el consecuente aumento en la resistencia a quimioterapia [56]. De este modo, se han llevado a cabo estudios clínicos combinando este fármaco con agentes quimioterapéuticos como Lomustina o Irinotecán, pero tampoco han mostrado un aumento significativo de la supervivencia [59, 60].
- **NovoTTF-100.** Esta tecnología aprobada por la FDA en 2011 consiste en la aplicación de pulsos electromagnéticos (200Hz) administrados desde un dispositivo electrónico que porta el propio paciente. La corriente impide la formación de los usos mitóticos, impidiendo la división celular. Un ensayo clínico ha demostrado una eficacia similar a la TMZ en términos de ganancia de supervivencia. La ventaja que representa frente a la quimioterapia es el ahorro del efecto citotóxico no deseado [50].

Debido a la escasa efectividad de la terapia actual, existe una gran cantidad de investigaciones centradas en la búsqueda de una alternativa terapéutica de garantía. Para entender mejor la magnitud de este reto, al consultar la herramienta online *Clinical Trials.gov* alojada en la web del NCBI, los resultados indican que actualmente se están desarrollando 1.338 ensayos clínicos en pacientes de GBM. De este modo, son numerosas las terapias basadas en la medicina de precisión que se están testando en estos tipos de tumores. La realidad es que hasta la fecha no se ha encontrado un tratamiento que ofrezca resultados satisfactorios. Como explican Prados *et al.* en una revisión publicada en 2015 en la revista *Neuro-Oncology*, la heterogeneidad que presentan los GBM incluso a nivel intra-tumoral hacen muy difícil que pueda proponerse un solo agente para tratar la enfermedad de forma segura [61]. A esto hay que unir la deriva genética que puede producirse a nivel temporal, ya que la heterogeneidad puede producir una selección en el tejido tumoral que vaya disminuyendo la eficacia del tratamiento a medida que evoluciona la enfermedad.

Dentro de las alternativas terapéuticas que se han propuesto en GBM, quizás las que más importancia adquirieron fueron las que propusieron el tratamiento con BMP, citoquinas pertenecientes a la súper-familia de TGF- $\beta$ . Estas citoquinas tienen la capacidad de inducir la diferenciación de células madre tumorales disminuyendo la radio-resistencia de estas subpoblaciones. Como demostraron Vescovi *et al.* en 2006, el tratamiento con BMPs redujo significativamente los niveles de GSCs, lo que supuso un bloqueo en el crecimiento de tumores y la mortalidad asociada en el 100% de los ratones testados. Los BMPs mostraron además una baja toxicidad [62]. Sin embargo, pese a que muchas investigaciones continúan profundizando en estas modalidades de terapias de diferenciación, algunas dudas han surgido al respecto. En primer lugar, no todas las células han respondido igual a este tipo de terapias, lo que ha puesto en duda la universalidad del tratamiento. En segundo lugar, el proceso de diferenciación se puede revertir, lo que puede hacer aparecer GSCs en una masa tumoral que a priori se presumía diferenciada [63]

## Capítulo 2: Apoptosis

### El concepto de muerte celular

Paradójicamente, la muerte celular es probablemente el requerimiento más importante para que se dé la vida en organismos pluricelulares. Esta afirmación se justifica en el papel crucial que desempeñan los mecanismos de muerte celular programada en el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis.

Tradicionalmente, los tipos de muerte celular se dividían entre “programada” o “accidental”. Hoy en día, el Comité de Nomenclatura en Muerte Celular (NCCD, del inglés: *Nomenclature Committee on Cell Death*) clasifica la muerte celular de acuerdo a criterios morfológicos, funcionales e inmunológicos. Este comité surge ante la necesidad de unificar entre la comunidad científica la vasta terminología en relación a los mecanismos de muerte celular. De este modo, el NCCD



considera que hay muerte celular cuando la célula alcanza al menos uno de los “puntos de no retorno” definidos [64]:

- La célula ha perdido la integridad de la membrana plasmática, permitiendo la permeabilización para colorantes como Ioduro de Propidio (PI) *in vitro*.
- La célula, incluido el núcleo, ha sufrido procesos de fragmentación. Estos fragmentos se denominan “cuerpos apoptóticos”.
- *In vivo*, la célula o sus fragmentos han sido fagocitados por células adyacentes.

### Breve historia de la apoptosis

La primera evidencia de muerte celular data del siglo XIX, tan pronto como se estableció la teoría celular (Schleiden-Schwann). En 1842, Karl Vogt observó que, durante la metamorfosis del sapo, las células de la notocorda desaparecían dando paso a las células vertebrales. A pesar de que el no utilizó el término muerte celular, concluyó que las células desaparecían, descartando la idea de que se transformaran en otras. Hoy día, este hecho está considerado el nacimiento del concepto de muerte celular. En 1858, Rudolf Virchow fue el primero en argumentar sobre la muerte celular en su libro “*Cellular Pathology*”. En él, el autor distingue entre dos tipos de fenómenos: necrosis (eventos patológicos pasivos) y necrobiosis (alteraciones espontáneas). En 1860, August Weismann observó “histólisis” durante la pupación de insectos. Él propuso que durante la lisis tisular se daban fenómenos masivos de muerte celular, modificando algunos órganos durante el desarrollo larval. Weismann definió el primer criterio de muerte celular, estableciendo el término “degradación grasa”, término que empleó para referirse a los acúmulos de grasa que se producían en órganos degradados. Cuatro años más tarde (1964), Richard Lockshin y Carroll Williams acuñaron el término “muerte celular programada”, para referirse a un tipo de muerte genéticamente controlada que seguía unas pautas de procesos ordenada que desencadenaba su propia autodestrucción [65]. En 1966, John W Saunders Jr. determinó que la muerte celular programada durante el desarrollo es tan importante como el crecimiento y la diferenciación celular. Saunders destacó también la importancia del ambiente celular en la regulación de los procesos de la muerte celular [66]. En 1883, Elie Metchnikoff determinó la presencia de células fagocíticas, siendo estas las responsables de eliminar las células muertas en los tejidos. En 1885, Walther Flemming perfeccionó las técnicas de fijación e introdujo la tinción con safranina, lo que le permitió dar una descripción detallada de la morfología durante la muerte celular. En su

descripción identificó núcleos en forma de media luna, así como la presencia de numerosas vacuolas. En 1886, Nissen usó la fijación de Flemming y la tinción con hematoxilina para detectar muerte celular en glándulas mamarias [67].

En los años 70 del siglo XX, otro hito importante en la historia de la muerte celular se produjo cuando John Kerr y colaboradores definieron la apoptosis, para referirse a un tipo de muerte programada determinada por unas pautas de morfología características. Kerr definió dos estados en su descripción original. En el primero, la célula cambiaba de aspecto, produciéndose el encogimiento de la misma y su fragmentación (cuerpos apoptóticos). En el segundo, la célula era fagocitada por otra. Este tipo de muerte celular estaba íntimamente relacionada con la eliminación de células durante el desarrollo y la renovación de tejidos adultos [68].

En los años 80, Robert Horvitz identificó los primeros genes que controlan el programa de apoptosis en *C. elegans* [69]. Esto supuso el inicio de una carrera para identificar los mecanismos moleculares envueltos en la modulación de la muerte celular. A día de hoy, los reguladores principales han sido identificados, y además, se ha determinado que la desregulación de estos mecanismos está detrás de numerosas patologías, incluido el desarrollo de tumores y las enfermedades degenerativas.

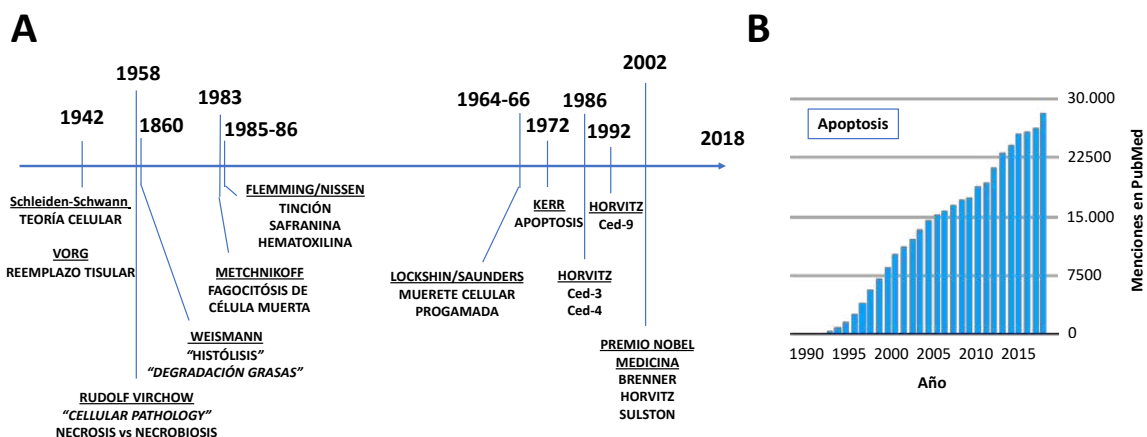


Figura 4. Contextualización histórica de la apoptosis. (A) Línea del tiempo de los grandes hitos de la muerte celular. (B) Menciones a la apoptosis en PubMed.

## Apoptosis

El término apoptosis fue acuñado por Kerr y colaboradores en 1972 para definir a un tipo de muerte asociada a unas pautas morfológicas comunes. Estas características incluyen: contracción

citoplasmática, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, translocación de la fosfatidilserina, producción de burbujas en la membrana (*blebbing*) y finalmente fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos. En un contexto *in vivo*, la translocación de la fosfatidilserina hace que la célula sea reconocida por los macrófagos y fagocitada, lo que dificulta su observación *in vivo* [68]. En la actualidad, el NCCD define y acepta la apoptosis basándose en los criterios morfológicos determinados por Kerr y colaboradores. Además, se aplican con rigor en la determinación de criterios moleculares. Aunque la condensación y degradación de la cromatina es característica de la apoptosis, el patrón de degradación de ADN en escalera (*DNA ladder*) no es suficiente para determinar la apoptosis, dado que este tipo de muerte se puede dar sin degradación inter-nucleosomal de la cromatina. Del mismo modo, usar como criterio la activación de caspasas, enzimas proteasas de corte específico que ejecutan las diferentes vías de señalización apoptótica, puede no ser suficiente, ya que la presencia de caspasas activas puede darse en otros tipos de procesos, incluidos procesos no letales. No obstante, ambos criterios son útiles en investigaciones relacionadas con este tipo de muerte celular. También hay que ser prudentes con la determinación de apoptosis usando inhibidores de caspasas, ya que inhibidores como Z-VAD pueden inhibir a calpaínas y catepsinas. Además, existen procesos de muerte por apoptosis independientes de caspasas [64].

En 1986, Horvitz *et al.* identificaron los primeros dos genes reguladores de la muerte celular en *C. elegans*: *ced-3* y *ced-4*. Ambos genes fueron propuestos como moduladores positivos de la muerte celular, ya que su pérdida, regulación o mutación alteraba el destino celular y el desarrollo [69]. Los genes homólogos en vertebrados son Caspasa-1 y Apaf-1 respectivamente [70]. Por el contrario, el primer gen anti-apoptótico identificado fue *ced-9*, identificado en 1992 [71]. El equivalente en vertebrados es Bcl-2 [72]. Hoy en día la ruta ya ha sido totalmente descrita en este nematodo, donde la apoptosis empieza con un aumento en la expresión del gen *egl-1*. EGL-1 bloquea al “guardián” anti-apoptótico CED-9, lo que produce la liberación del adaptador CED-4, que activa a la proteasa CED-3 iniciando la muerte celular [72]. Estas investigaciones supusieron una revolución en el marco de la muerte celular programada y solo en los años 90 se publicaron más de 10.000 trabajos en este campo [70]. Como muestra la **Figura 4**, en la actualidad, las menciones al término apoptosis en PubMed superan las 22.000 citas al año. En reconocimiento a sus hallazgos, los investigadores Sydney Brenner, John Sulston y Bob Horvitz fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina en 2002 por sus aportaciones sobre los mecanismos de desarrollo y regulación de la muerte celular en el modelo *C. elegans*.

A pesar de que los genes que regulan la apoptosis están muy conservados en la evolución, existe una tendencia a incrementar en complejidad. Mientras que en *C. elegans* esta ruta implica unos pocos genes, en humanos, hay 11 caspasas, 6 Bcl anti-apoptóticos y 10 BH3-Only [73, 74]. Además, existen diferentes proteínas pro- y anti-apoptóticas, así como reguladores de la expresión y modificaciones post-transduccionales que controlan la ruta.

### Características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis

Las características morfológicas descritas por Kerr *et al.* son la lógica consecuencia de diferentes hechos bioquímicos que tienen como resultado la muerte de la célula. Lo primero que sucede después de un estímulo apoptótico es la activación de la maquinaria molecular (caspasas iniciadoras). En Segundo lugar, la maquinaria ejecutora (caspasas efectoras) degrada a sus proteínas diana comprometiendo la integridad celular, imposibilitando su correcto funcionamiento en un proceso irreversible (punto de no retorno). En este momento, los cambios morfológicos son evidentes, mostrándose las características descritas originalmente por Kerr *et al.* (reducción citoplasmática, fragmentación nuclear y producción de *blebbing*). De este modo, los eventos moleculares que caracterizan a la célula apoptótica son:

- **Procesamiento proteico.** Las caspasas efectoras producen el procesamiento de numerosas proteínas dianas. Entre ellas se encuentran Actinas,  $\alpha$ -Fodrina, Gelsolina, Gas2 y PAK2, proteínas relacionadas con la formación, estabilidad y regulación del citoesqueleto. El procesamiento de estas proteínas produce cambios estructurales que se traducen en la reducción del volumen citoplasmático [75]. FAK y  $\beta$ -Catenina también son dianas de caspasas. Estas proteínas regulan las uniones célula-célula y célula-matriz, lo que reduce el anclaje de la célula al tejido [76, 77]. Otras dianas de caspasas destacadas son la Clatrina y su adaptador AP20, que son fundamentales para la internalización de proteínas de membrana, o la Rabaptina 5, reguladora del tráfico de vesículas [78, 79].
- **Condensación y fragmentación de la cromatina.** Las Laminas son proteínas nucleares análogas a los filamentos del citoesqueleto presentes en el citosol. Estas proteínas estructurales juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad nuclear, su reorganización durante la mitosis y la formación del poro nuclear. Además, regulan el posicionamiento de la cromatina, la expresión génica, la reorganización epigenética y la

reparación del ADN. Las laminas se dividen en dos grupos: A y B [77]. Ambas son dianas de caspasas. El procesamiento de las laminas durante la apoptosis colapsa el funcionamiento celular, produciendo la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear [80]. Sin embargo, hay trabajos que abogan por un papel activo de las laminas en la prevención de la apoptosis [81, 82]. Otras proteínas esenciales para el mantenimiento del núcleo como NuMa, PARP-1 y Topoisomerasas I y II también son dianas de caspasas [83]. La degradación inter-nucleosomal del ADN, criterio empleado como medida de apoptosis, es mediado por las ADNasas dependientes de caspasas (CADs). CAD (DFF40) está constitutivamente asociada con su inhibidor iCAD (DFF45), que actúa como una chaperona para inhibir la actividad ADNasa inmediatamente desde la transducción. Durante la apoptosis, las caspasas efectoras procesan a iCAD, favoreciendo la liberación de CAD, que es translocada al núcleo, donde dimeriza y produce la degradación inter-nucleosomal de la cromatina. Ratones CAD o iCAD deficientes presentan un desarrollo normal, pero muestran una mayor propensión al desarrollo de tumores tras ser sometidos a estímulos carcinogénicos [84]. En GBM se ha observado una disminución de la degradación del ADN mediada por CAD, incluso ante estímulos que presentan una buena activación de caspasas [85].

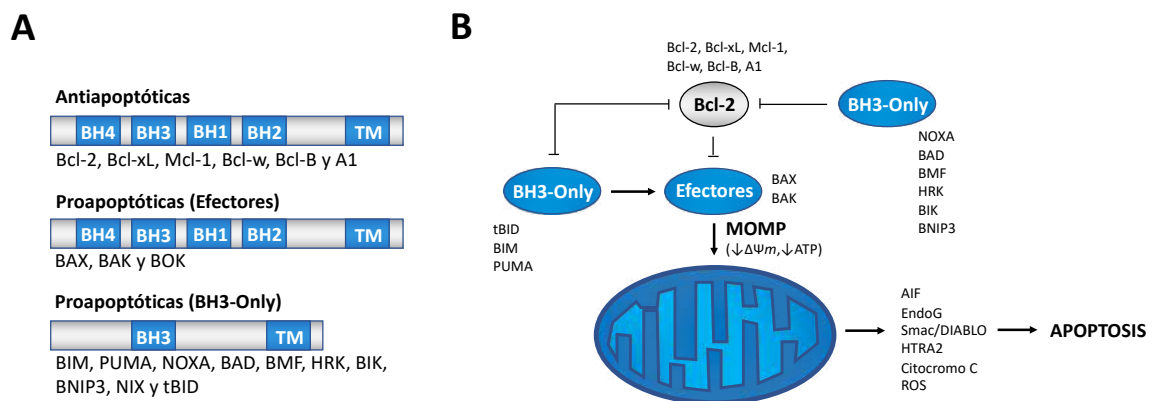
- ***Translocación de fosfatidilserina.*** Durante la apoptosis se produce una reorganización de la membrana celular. La fosfatidilserina, un fosfolípido comúnmente localizado en la cara interna de la bicapa lipídica, es translocada a la cara externa, exponiéndose en la superficie celular, siendo una de las señales que reconocen los macrófagos para fagocitar a una célula apoptótica [86]. Mecánicamente, las caspasas efectoras procesan y activan a la flipasa Xkr8, que es la mediadora de dicha translocación [87].

### Vía extrínseca e intrínseca: dos rutas para activar apoptosis

De acuerdo al estímulo de activación, existen dos rutas para activar apoptosis: intrínseca y extrínseca. Ambas rutas difieren en los eventos iniciales, convergiendo en la activación de caspasas efectoras (caspasa-3, 6 y 7), que son comunes para las dos rutas.

La vía intrínseca se induce por estímulos intracelulares, incluyendo daños en el ADN, estrés oxidativo, liberación de Calcio al citosol, excitotoxicidad, acumulación de proteínas mal plegadas

(estrés reticular), etcétera. De acuerdo con el NCCD, a pesar de la heterogeneidad en las cascadas de señalización que pueden iniciar la vía intrínseca de apoptosis, todas tienen en común la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) [88]. La permeabilización de la mitocondria marca la frontera entre la supervivencia y la muerte celular. Está regulada por las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 [89].



**Figura 5. Familia Bcl-2 y MOMP.** (A) Clasificación de los miembros de la familia Bcl-2. (B) Regulación de MOMP por la familia Bcl-2 [74, 88].

Bajo condiciones fisiológicas, los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (BH3-Only y efectores) se encuentran en bajos niveles e/o inactivos, bien solubles en el citosol (Bid o Bax) o anclados a la cara externa de la mitocondria (Bak). Los encargados de mantener inactivo el sistema son los miembros de la familia Bcl-2 anti-apoptóticos. En condiciones de estimulación de la apoptosis, se produce un desbalance entre los Bcl-2 pro- y anti-apoptóticos, lo que favorece la translocación de Bax a la membrana externa mitocondrial. La interacción de Bax y Bak altera los poros de la membrana favoreciendo el MOMP [90]. Dicha permeabilización favorece la liberación de determinados factores como: las nucleasas AIF y EndoG, citocromo C, componente del apoptosoma y las proteínas HTRA2 y Smac/DIABLO, que inhiben a las proteínas anti-apoptóticas IAPs, que describiremos más adelante [89]. Ya en el citosol, el citocromo C interacciona con la proteína Apaf-1 para formar el “apoptosoma”, que es la plataforma de activación de la caspasa-9, iniciadora de la ruta intrínseca. El dominio de Apaf-1 encargado de interaccionar con citocromo C se denomina WD40 [91]. La interacción entre caspasa-9 y Apaf-1 se produce a través del dominio CARD. De este modo, Apaf-1 cargada con citocromo C, crea una estructura circular con simetría radial de siete ejes, disponiendo el dominio CARD hacia el interior [92, 93].

La vía extrínseca transmite la señal de ligandos de muerte a través de receptores de membrana conocidos como Receptores de Muerte (DRs). Estos ligandos son citoquinas pertenecientes a la súper-familia de TNF, dentro de la cual, ApoL2/TRAIL y FasL han sido descritas como activadores de la apoptosis. La ruta empieza con la interacción entre un trímero de citoquinas y un trímero de receptores. Esta interacción promueve la translocación de los adaptadores FADD o TRADD, que se acoplan mediante el dominio de muerte (DD) al trímero de receptores en su cara intracelular. Este complejo compone la plataforma de activación de las caspasas iniciadoras de la ruta extrínseca y se conoce como DISC, del inglés: *death-inducing signaling complex*. Las caspasas iniciadoras activan a las efectoras donde confluyen las dos rutas [22]. La ruta extrínseca activada por TRAIL es el foco principal de nuestra investigación, por lo que será abordada en detalle más adelante.

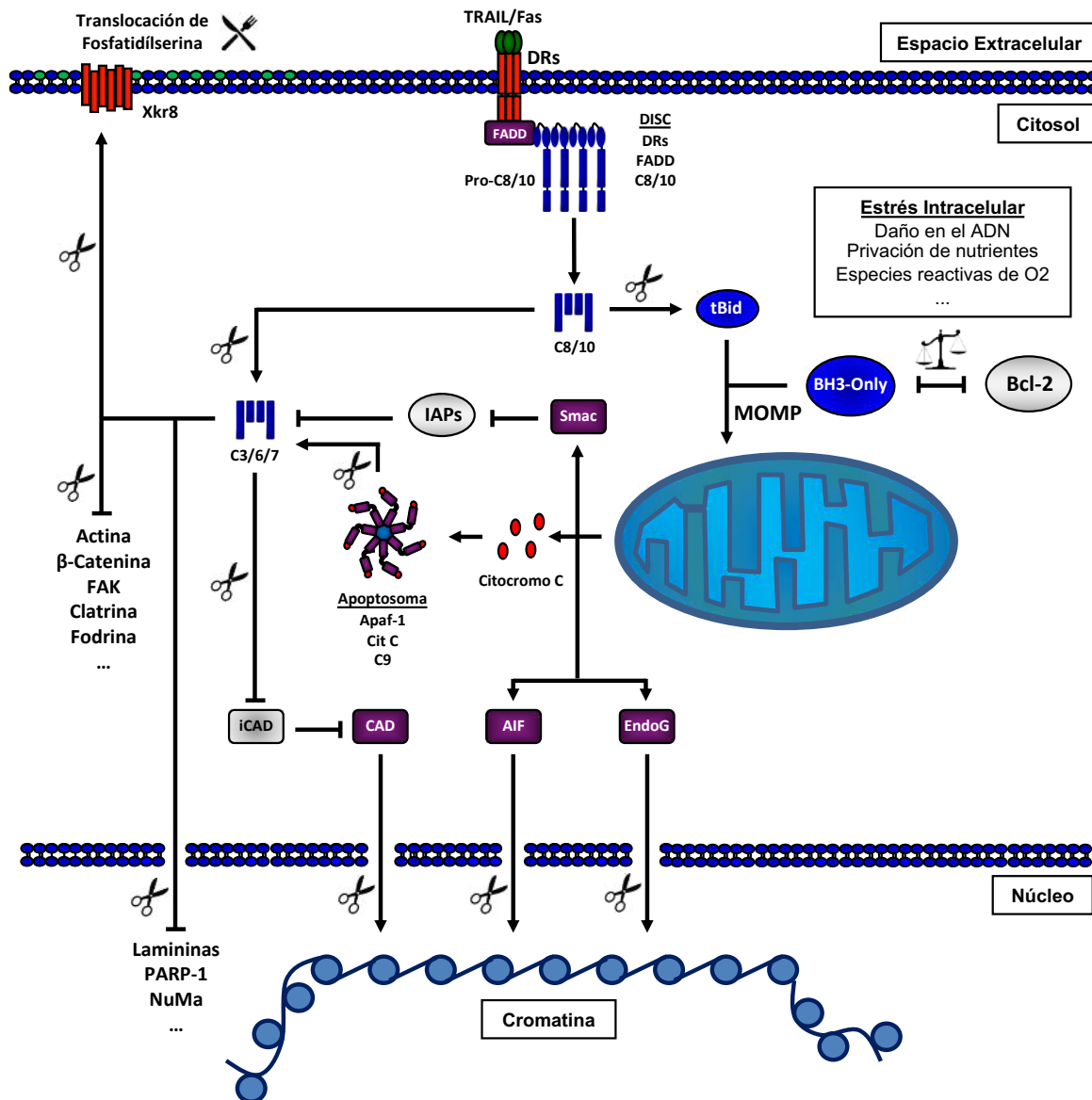


Figura 6. Señalización apoptótica por vía intrínseca y extrínseca.

La ruta extrínseca interacciona con la intrínseca a través de Bid, una proteína pro-apoptótica tipo BH3-Only que es diana de las caspasas iniciadoras de la ruta intrínseca. El truncamiento de Bid (tBid) induce su intercalado en la membrana mitocondrial produciendo MOMP, en un proceso dependiente de Bax y/o Bak [94]. De acuerdo a esta conexión, la NCCD clasifica a las células en dos tipos dependiendo de la activación de caspasas efectoras por vía extrínseca. Las células “Tipo I”, en las que la activación de caspasas iniciadoras en el DISC es suficiente para inducir apoptosis y las “Tipo II”, donde la ruta extrínseca directa no es suficiente y se requiere la activación de la vía mitocondrial a través de tBid para activar caspasas efectoras [22, 88].

También pueden darse fenómenos de apoptosis independientes de caspasas. Este tipo de muerte celular se produce ante una pérdida irreversible de función de la mitocondria. En estos casos, se produce la liberación desde la mitocondria de las endonucleasas AIF y EndoG. Tras su paso al núcleo, se produce la degradación de la cromatina de forma similar a la apoptosis canónica. Este tipo de muerte celular no se bloquea con inhibidores de caspasas y por tanto debe de ser diferenciada de la apoptosis canónica. El NCCD aconseja que se haga referencia a ella como “apoptosis independiente de caspasas” [95].

## Caspasas

Las caspasas son las proteínas clave en la ejecución del programa celular de apoptosis. Por definición, son una familia de cistein-proteasas de corte en aspártico(c-asp-asas) que regulan el procesamiento de proteínas clave para el mantenimiento de la homeostasis celular [72]. De este modo, el procesamiento por caspasas puede inducir pérdida de función, como ocurre en algunos casos previamente descritos como PARP-1, FAK o laminas, o ganancia de función, como ocurre en los casos de CAD, Bid o Xkr8.

Las caspasas pueden inhibirse por un amplio espectro de pan-inhibidores empleados para este fin [96]. El más empleado clásicamente ha sido Z-VAD-fmk. Sin embargo, como aclaró el NCCD en 2009, hay que ser precavido en su uso, ya que a más de 10 $\mu$ M inhibe de forma inespecífica a otras cistein-proteasas. Además, no actúa con igual eficiencia entre todos los miembros de la familia caspasa [64]. Este inhibidor ha sido relacionado con la inducción de necroptosis y autofagia [97]. En 2018, el NCCD ratificó la inducción de necroptosis mediada por Z-VAD-fmk



en células dendríticas y microgliales [98]. También se ha indicado la producción de fluoracetato, una molécula altamente tóxica para el hígado, como efecto no deseado [99]. En 2015, el NCCD comenzó a mencionar el Q-VD-POh en sus revisiones periódicas [100]. Este inhibidor funciona de manera específica a bajas dosis y atraviesa la barrera hematoencefálica. Tiene una IC50 de entre 25 y 400nM en experimentos *in vitro* con caspasas 1, 3, 8 y 9 recombinantes. En líneas celulares inhibe eficientemente a partir de 5µM [99]. La sobre-expresión de la proteína vírica CrmA también ha sido relacionada con la inhibición de caspasas. Sin embargo, pese a los resultados obtenidos en la inhibición de ced-3 en *C. elegans*, en humanos solo ha mostrado eficacia para la inhibición de caspasa-1 y 8 [101, 102]. Según la NCCD, la sobre-expresión de CrmA como inhibidor de la apoptosis solo se acepta por inhibición de la vía extrínseca de la apoptosis mediada por caspasa-8 [88].

Analizando las caspasas a nivel estructural, el dominio catalítico contiene un sitio activo Cys285 (de acuerdo a la numeración de caspasa-1) en un pentapéptido conservado Gln-Ala-Cys-X-Gly que procesa a sus proteínas diana tras un Asp en la secuencia X-Glu-His/Val-Asp. Las caspasas son sintetizadas como un zimógeno inactivo (pro-caspasa), compuesto por un pro-dominio, la subunidad grande (17-21KDa) y la subunidad pequeña (10-13KDa). El pro-dominio es la región más variable. Mientras que en las caspasas efectoras es casi residual, en las caspasas iniciadoras presentan los sitios de acoplamiento a la plataforma de activación: motivos CARD para la interacción con el apoptosoma, y dominios DED para la interacción con el DISC. Durante la activación de caspasas iniciadoras, primero se procesa la subunidad pequeña, para finalmente escindir la subunidad grande del pro-dominio [72].

Una vez procesadas, ambas subunidades interaccionan para formar la enzima madura. No obstante, para ser totalmente funcional, deben de interaccionar con otra enzima madura formando un tetrámero con dos subunidades pequeñas y dos grandes [103]. En 1997, Han *et al.* observaron que la activación de caspasa-3 requería de la actividad de al menos dos proteasas. De este modo, usando inhibidores selectivos para los sitios de corte de caspasa-3 (Ac-ESMD-CHO y Ac-IETD-CHO), bloqueaban totalmente el procesamiento. Sin embargo, al usar Ac-DEVD-CHO, un inhibidor de las caspasas 3, 5, 7 y 9, sólo bloqueaban el procesamiento de p20 (segundo corte), pero no el primer corte, mientras que CrmA (inhibidor de la caspasa iniciadora 8) bloqueaba el primero [104]. Hoy día sabemos que las caspasas efectoras requieren de la activación previa de otras caspasas para iniciar su procesamiento.

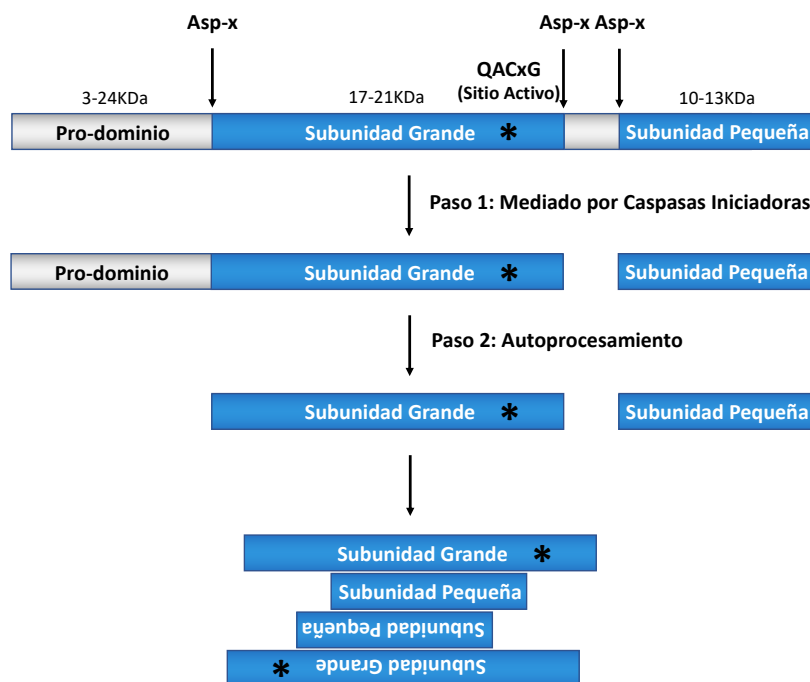


Figura 7. Activación secuencial en dos pasos de caspasas [103].

En humanos hay 11 caspasas: caspasas 1 a 10 y la caspasa 14. Pueden ser clasificadas por criterios funcionales y estructurales. Por función, pueden ser divididas en tres grupos: pro-apoptóticas, pro-inflamatorias y la caspasa-14, que tiene un papel especial en la diferenciación de queratinocitos.

En cuanto a la clasificación estructural, podemos diferenciar entre iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras presentan dominios de reclutamiento (CARD o DED) y se activan por dimerización y auto-procesamiento al ser reclutadas en plataformas de activación (apoptosoma, PIDDosoma o DISC). Por el contrario, las caspasas efectoras o ejecutoras no presentan motivos de reclutamiento y tienen que ser activadas por caspasas iniciadoras [73]. Como muestra la **Tabla 4** anterior, los subgrupos pueden diferenciarse de acuerdo a sus características estructurales. Las caspasas-8 y 10 presentan dos dominios DED (DED1 y DED2). Ambas son caspasas iniciadoras de la ruta intrínseca e interactúan con FADD en el DISC a través de su dominio DED1. Por otra parte, caspasa-9, iniciadora de la ruta intrínseca, presenta un dominio CARD de interacción con el apoptosoma [73].

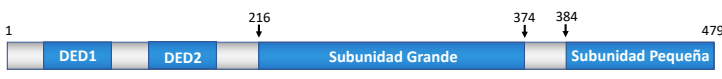
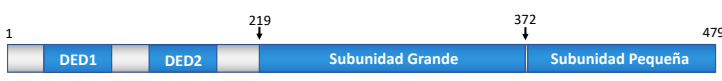

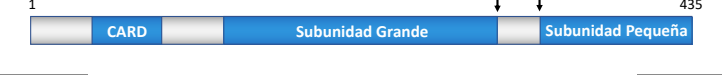




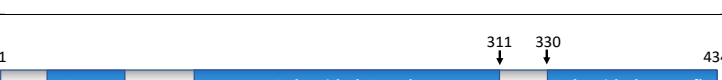


Nombre	Estructura	Tipo	Diana
Caspasa-8		Apoptosis iniciadora (DISC)	L-E-T-D
Caspasa-10		Apoptosis iniciadora (DISC)	L-E-X-D
Caspasa-9		Apoptosis iniciadora (Apoptosoma)	L-E-H-D
Caspasa-2		Apoptosis iniciadora (PIDDosoma)	D-E-H-D
Caspasa-3		Apoptosis efectora	D-E-V-D
Caspasa-6		Apoptosis efectora	V-E-H-D
Caspasa-7		Apoptosis efectora	D-E-V-D
Caspasa-1		Inflamatoria	W-E-H-D
Caspasa-4		Inflamatoria	W/L-E-H-D
Caspasa-5		Inflamatoria	W/L-E-H-D
Caspasa-14		Diferenciación queratocitos	W-E-H-D

Tabla 4. Estructura de las caspasas [73, 96].

Caspasa-2, conocida como la “caspasa huérfana” es un caso especial, ya que es considerada caspasa iniciadora y efectora. Presenta un dominio CARD, pero no es reclutada por el apoptosoma. En su lugar, interacciona con la proteína RAIDD en un complejo denominado PIDDosoma (PIDD + RAIDD). Aquí se activa para iniciar su señalización. Su función aún no ha sido del todo esclarecida, pero algunas evidencias sugieren que está relacionada con la progresión del ciclo celular.

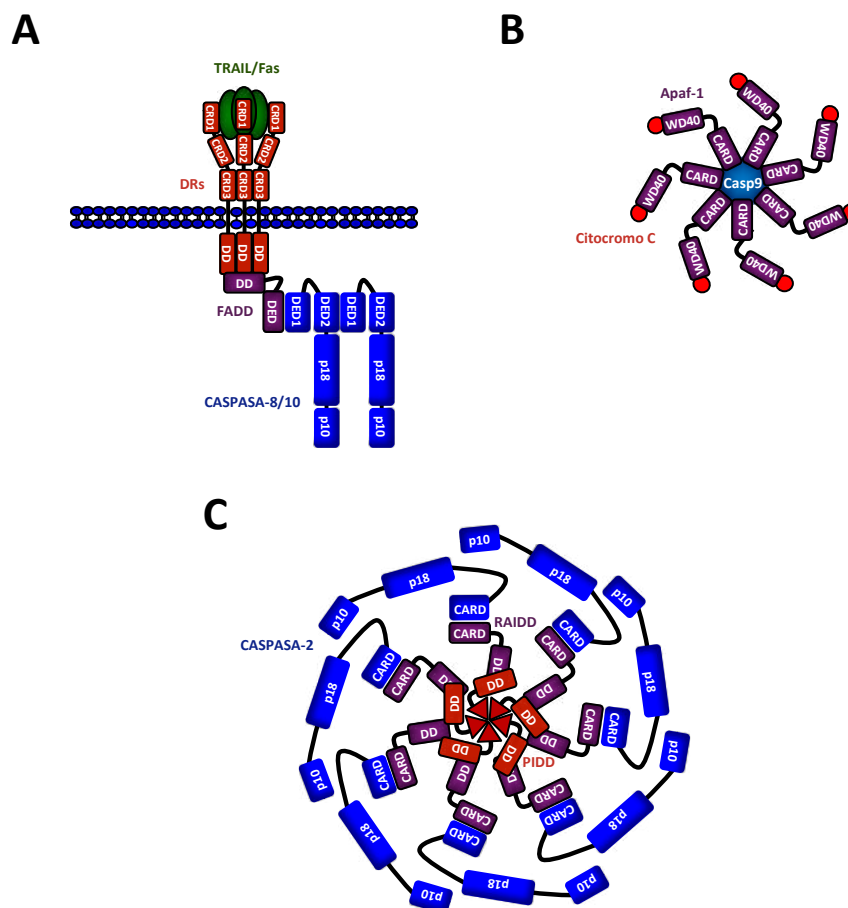


Figura 8. Plataformas de activación de caspasas. (A) DISC. (B) Apoptosoma. (C) PIDDosoma.

Se ha demostrado que caspasa-2 puede procesar a Bid, regulando la vía mitocondrial de apoptosis, aunque la capacidad para llevar a cabo dicha acción es cuatro veces menor que en caspasa-8. *In vitro*, también muestra capacidad de procesar iCAD, aunque esto no se ha podido probar *in vivo* [105]. Por su relación con el ciclo celular y la capacidad de activar la vía mitocondrial, ha sido propuesta como la caspasa efectora en la “catástrofe mitótica”, un tipo de muerte por apoptosis regulada por proteínas de control del ciclo celular en contexto de mitosis aberrante que puede dar lugar a células gigantes multinucleadas [106].

Las caspasas iniciadoras se activan entre pares en las plataformas de activación. El DISC, del que hablaremos en profundidad más adelante, se forma anclado a membrana. Según el modelo propuesto por MacFarlane *et al.*, se compone de tres ligandos, tres receptores y una molécula de FADD [107]. El apoptosoma se forma en el citosol tras la liberación de citocromo C de la mitocondria. Según Yuan *et al.*, se compone por siete moléculas de Apaf-1, interaccionando con citocromo C hacia el exterior. En el interior quedan los dominios CARD formando una estructura en forma de disco (*disk*). Caspasa-9 entra en el *disk* en estequiometría 1:1 con respecto a Apaf-1

[91, 93]. El PIDDosoma, se forma por el auto-procesamiento de PIDD, lo que induce la interacción con RAIDD en estequiometría 5:7. Los dominios CARD quedan al exterior, donde se une la caspasa-2 para su activación por contacto [105, 108].

Las caspasas-3, 6 y 7 son efectoras de la apoptosis y se encargan de dismantelar la maquinaria celular. En lugar de presentar dominios de reclutamiento, presentan un pro-dominio vestigial carente de función aparente. A nivel estructural son muy similares, aunque difieren en las proteínas diana que reconocen [73].

Las Caspasas-1, 4 y 5 están relacionadas con inflamación y juegan un papel importante en la respuesta inmune, incluida la piroptosis, que bloquea la replicación de patógenos en la célula. Caspasa-1 es reclutada por receptores citosólicos NOD conformando el inflamosoma, donde es activada. Han sido descritos diferentes inflamosomas. Por un lado, Nlrp1b y Nlrc4 presentan dominios CARD y directamente unen caspasas. Sin embargo, otros activadores como Nlrp3, AIM2 y Pirina carecen de dicho dominio y usan su dominio PYD para interactuar con ASC, que hace de adaptador para la activación de caspasas. Las caspasas-4 y -5 presentan baja expresión en macrófagos, pero su expresión se ve favorecida por lipopolisacáridos (LPS) e interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). La activación de caspasas pro-inflamatorias modula la secreción de las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$  y IL-18 [73, 109].

### Proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs)

Dada la importancia de la apoptosis en el mantenimiento de la homeostasis tisular, es evidente pensar que esta ruta esté finamente regulada. En este sentido, las IAPs son proteínas inhibidoras de la ruta apoptótica altamente conservadas en la evolución. En humanos se han descrito seis miembros: NIAP, IAP1, IAP2, XIAP, BRUCE y survivina. Estructuralmente, las IAPs muestran estructuras dispares, pero todas presentan al menos un dominio BIR, necesario para la interacción proteína-proteína. Hay dos tipos de dominio BIR: BIR1 y BIR2. BIR2 es el encargado de interactuar e inhibir a las caspasas. El dominio BIR1 en cambio parece estar relacionado con otras funciones alternativas, ya que se ha demostrado que interactúa con otras proteínas como TAK1 o TRAF2. Las IAPs que presentan dominios BIR2 en tándem aumentan la capacidad de interacción, favoreciendo por ejemplo la interacción con proteínas diméricas. Adicionalmente, cIAP1, cIAP2 y XIAP presentan un dominio RING en el extremo carboxilo, lo que les confiere

actividad E3-ligasa para la transferencia de cadenas de poli-ubiquitina. No está muy claro si ambos dominios son necesarios para la inhibición de la apoptosis, ya que ha sido descrito que son capaces de mantener su función en ausencia del dominio RING, aunque parece claro que este dominio regula la apoptosis en determinados contextos celulares. cIAP1 y 2 presentan además motivos CARD que, aunque no es esencial para inhibir la apoptosis, les permite interactuar con el inflamosoma [110, 111].

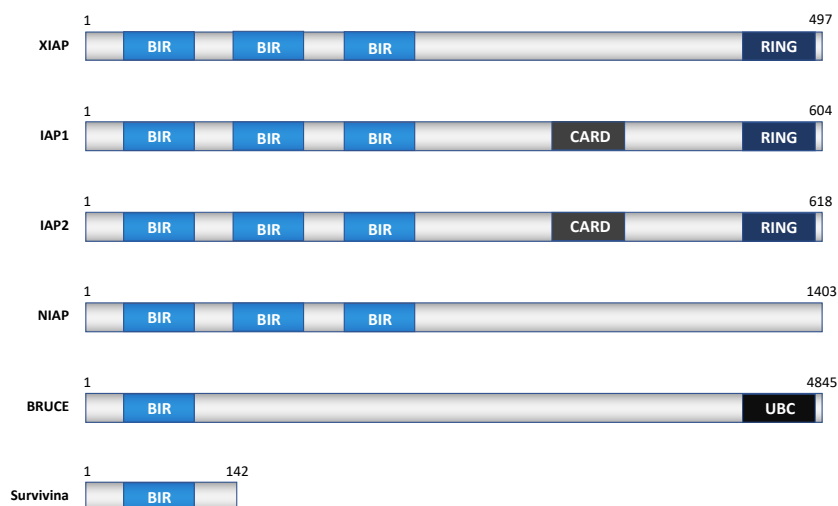


Figura 9. Estructura de los miembros de la familia IAP.

A pesar de que las IAPs inhiben la apoptosis por interacción con las caspasas efectoras y su unión a caspasas iniciadoras ha sido descartada [110], se ha descrito que indirectamente puede regular la estabilidad de caspasa-8 a través del “rioptosoma”. El ripoptosoma es un complejo formado por RIPK1, FADD que activa alternativamente a caspasas-8 de forma independiente de ligando. Este complejo se forma por la disminución de IAPs mediada por estrés genotóxico. La presencia de IAPs ubiquitina a RIPK1, lo que impide la formación del complejo. Por otra parte, el procesamiento de cFLIP produce un fragmento p43 que favorece la formación del complejo cFLIP(p43)-caspasa-8-TRAF2. Las IAPs ubiquitinan a TRAF2 induciendo la degradación del complejo [111, 112].

La survivina es la más pequeña de todas las proteínas de la familia de las IAPs. Básicamente se reduce a la presencia de un dominio BIR. Sin embargo, es una proteína muy destacada en el contexto tumoral ya que se encuentra altamente expresada en numerosos cánceres. Tanto es así que se ha propuesto como diana terapéutica, ya que la inhibición de su expresión reduce la radio- y quimio-resistencia [113].

La capacidad de las IAPs de inhibir la apoptosis y su desregulación en numerosas enfermedades, incluido el cáncer, ha promovido el desarrollo de inhibidores farmacológicos basados en la proteína Smac/DIABLO, que es el inhibidor natural de estas proteínas. Estos miméticos de Smac se encuentran en la actualidad en ensayos de fase clínica [111].

### Apoptosis mediada por TRAIL

TRAIL/Apo2L (del inglés: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) es una citoquina pro-apoptótica perteneciente a la súper-familia TNF. Este ligando de muerte fue identificado de forma simultánea por Wiley *et al.* y Pitti *et al.* en los años 90 [114]. De forma similar a Apo1/FasL, TRAIL activa la vía extrínseca de apoptosis por interacción con receptores de muerte (DRs). En 1999, TRAIL llamó la atención de la comunidad científica cuando se demostró que TRAIL era capaz de inducir apoptosis de forma selectiva en células tumorales con baja toxicidad en células normales [115, 116], emergiendo como una prometedora terapia antitumoral. Sin embargo, la posterior observación de que numerosas células tumorales son resistentes al tratamiento con esta citoquina en monoterapia redujo mucho el optimismo inicial, más si cabe tras la escasa eficacia que ha mostrado este tipo de tratamiento en ensayos clínicos [117]. No obstante, debido a la alta capacidad de inducir apoptosis de este ligando, en la actualidad se están desarrollando varias estrategias de investigación, creando nuevas moléculas más eficaces basadas en TRAIL [118], o buscando nuevas dianas terapéuticas que sensibilicen a las células resistentes a estas terapias.

Aunque la función fisiológica de TRAIL no está del todo descrita, numerosos tejidos fetales y adultos expresan el gen (TNFSF10). La proteína endógena es expresada principalmente en células *natural killers* (NK), linfocitos, macrófagos y células dendríticas, donde se ha relacionado con la respuesta inmune a virus y células malignas. Además, pacientes con esclerosis múltiple y lupus eritromatoso presentan altos niveles de TRAIL en suero [22, 114, 119-121]. Los ratones TRAIL KO son totalmente viables y no presentan defectos en el desarrollo. Por el contrario, Crethey *et al.* demostraron que ratones TRAIL KO presentaban más aparición de tumores al ser tratados con el carcinógeno 3-metilcolantreno (MCA). Además, mostraban más nódulos metastásicos, confirmando el rol de TRAIL en el proceso de formación de tumores [122].

TRAIL es inicialmente expresado como una proteína de membrana tipo II de 281 aminoácidos, que es procesada por cathepsina E, liberando la forma soluble [123]. Al igual que otras citoquinas de la súper-familia TNF, TRAIL interacciona con otros dos monómeros formando un trímero

activo. La presencia de un ion de zinc en la Cys230 de cada monómero le confiere solubilidad, estabilidad y actividad al complejo [22]. El trímero activo interactúa con los receptores de muerte, iniciando la ruta de apoptosis extrínseca.

### Receptores de TRAIL, el primer nivel de regulación de la ruta.

Existen 5 receptores que interactúan con TRAIL: TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, TRAIL-R3/DcR1, TRIL-R4-DcR2 and Osteoprotegerina (OPG), aunque DR5 presenta dos formas de *splicing*: DR5(L) y DR5(S), que difieren en un fragmento de 29 aminoácidos del dominio extracelular. A los receptores que transmiten la señal de TRAIL se les denomina receptores de muerte (DRs). La interacción citoquina-receptor puede ser considerada el primer nivel de regulación de la vía porque no todos los receptores son totalmente activos para inducir apoptosis. A este respecto, mientras que TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 son aptos para formar DISC, TRAIL-R3/DcR1 y TRAIL-R4/DcR2 presentan un dominio intracelular truncado o carecen de él, lo que les inhabilita para la formación de complejos con FADD y caspasa-8/10. De este modo DcR1 y DcR2 son considerados receptores trampa o “*decoy*”, ya que secuestran TRAIL, pero no activan apoptosis. El quinto receptor, OPG, es un receptor soluble relacionado con la maduración de osteoclastos, previniendo la formación de estos y la reabsorción ósea. A diferencia de humanos, en ratones solo se expresa un DR activo (mDR5), que, pese a su nombre, no es un homólogo de TRAIL-R2/DR5, sino que comparte una homología similar con ambos DRs humanos. El ratón *knockout* para mDR5 es viable, pero es más propenso al desarrollo de tumores de pulmón en respuesta a radiación ionizante [22].

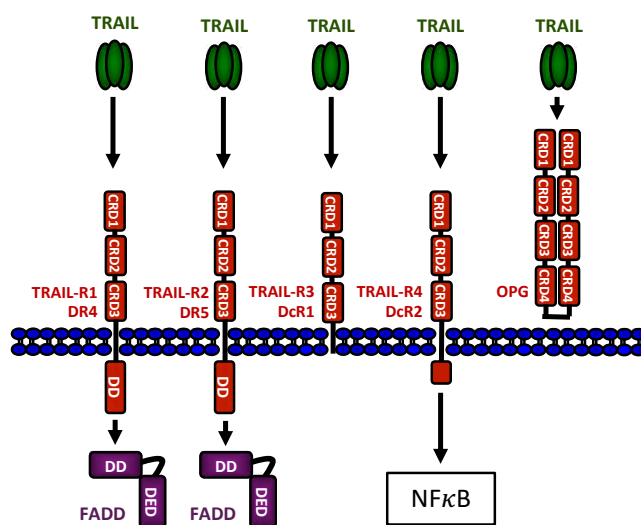


Figura 10. Receptores de TRAIL.



En su dominio extracelular, los receptores de muerte presentan tres dominios ricos en cisteína: CRD1, CRD2 y CRD3, con la excepción de OPG que presenta además un CRD4. La interacción entre TRAIL y los DRs se produce a través de CRD2 y CRD3. El dominio CRD1 está involucrado en la interacción receptor-receptor. En su región intracelular, los receptores presentan el denominado dominio de muerte (DD, del inglés: *death domain*) a través del cual interaccionan con FADD para formar el DISC [22].

El dominio intracelular del receptor DcR2 es ineficiente para transmitir la señal apoptótica por su incapacidad para unirse a FADD. Sin embargo, este dominio truncado no está carente de función. En un reciente trabajo de 2018, Yang *et al.* han demostrado que DcR2 activa la vía de NFκB en leucemia. Los autores observaron una alta expresión del ligando que correlacionaba a su vez con altos niveles de TRAIL soluble. Al interrumpir la señalización mediada por DcR2 y al inhibir la ruta de NFκB la proliferación se veía mermada. Estos resultados demuestran que los receptores trampa, o al menos DcR2, tienen una función en la señalización celular y deben dejar de ser considerados como meros secuestradores del ligando de muerte [124].

Centrándonos en los receptores activos de TRAIL, a pesar de que no se han descrito diferencias funcionales significativas entre DR4 y DR5, se ha demostrado que solo DR4 puede modificarse por palmitoilación, lo que podría favorecer su estabilización en los *rafts* lipídicos, zonas donde se ha descrito una mejor respuesta al ligando [125]. Lo que sí parece claro es que cada tipo celular presenta prioridad por uno u otro receptor para activar apoptosis. De esta manera, las células de leucemia parecen poder inducir muerte celular vía DR4 [125]. En glioma en cambio, parece que la prioridad es a través de DR5 [21].

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la pre-asociación de receptores previa a la unión con ligando a través del dominio PLAD (*pre-ligand assembly domain*). Esta asociación ha sido reportada tanto en DR4 como en DR5 [22]. En ausencia de ligando, los DRs interaccionan entre sí a través del CRD1 formando dímeros de receptores. Ante una estimulación de ligando suficiente, las pre-unioniones a través de PLAD crean redes de agregación de trímeros de receptor-ligando [126, 127]. Hoy día, como revisaron recientemente Vanamee y Faustman, se acepta el modelo hexagonal propuesto por Scott *et al.* en 2009 [127, 128]. Estas estructuras en agregados hacen más eficiente la activación de la ruta extrínseca de apoptosis.

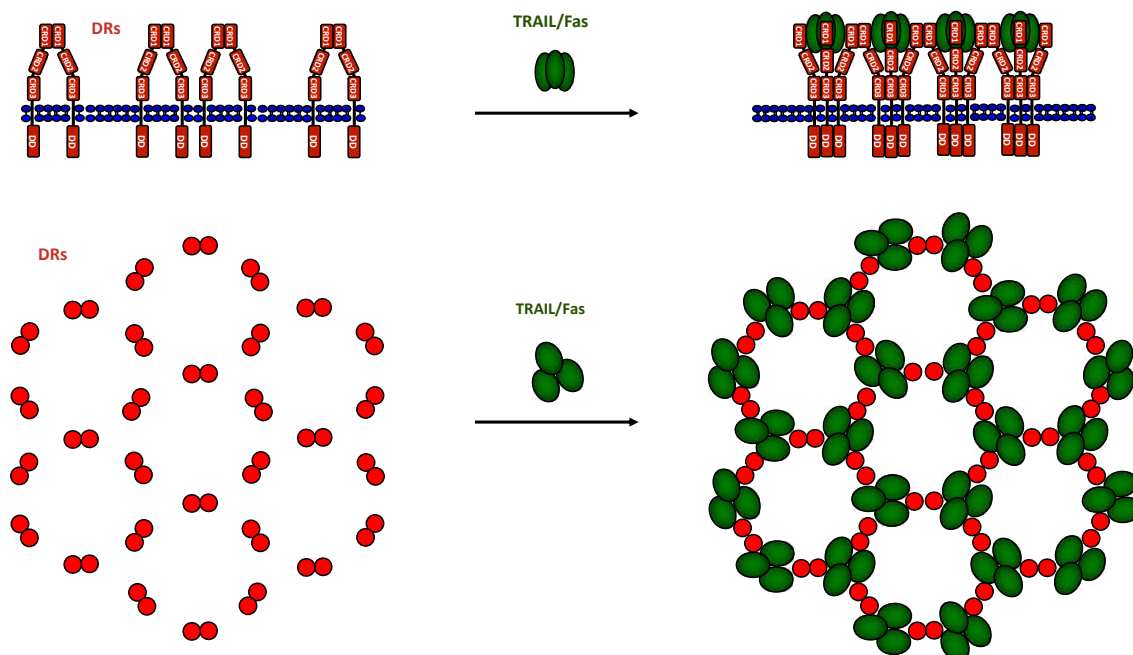


Figura 11. Modelo de interacción hexagonal de receptores [127].

Algeciras-Schimmich *et al.* en 2002, diferenciaron cuatro etapas en el inicio de la señalización por vía extrínseca: (1) interacción de receptor-ligando y formación de trímeros; (2) formación del DISC; (3) formación de agregados de complejos en la membrana; (4) internalización del DISC [129]. Las interacciones de receptores previa unión al ligando, al ser propuestas con posterioridad, podrían alterar este paradigma. Como veremos más adelante, determinadas modificaciones post-transduccionales como la glicosilación del receptor pueden jugar un papel importante en la formación de agregados.

A pesar de que las interacciones a través de PLAD a priori han sido relacionadas con una mayor sensibilidad a la muerte inducida por TRAIL, Clancy *et al.* demostraron que estas interacciones también pueden darse entre DRs y DcR2, lo que aumentaría la resistencia a la muerte por ligando. Este hecho profundiza en la idea de que los DcR no son solo receptores trampa para el secuestro de TRAIL, sino que juegan un papel activo en la regulación de la vía extrínseca [130].

En el 2000, Chan *et al.* demostraron que las uniones PLAD podían inducir señalización independiente de ligando en la vía de TNF [131]. Micheau *et al.* obtuvieron las mismas conclusiones con el ligando de muerte Fas [132], lo que indica que las uniones PLAD no solo juegan un papel importante en la activación de caspasas-8, sino que podrían ser ellas mismas

responsables de la activación en ausencia del propio ligando, abriendo una nueva vía de investigación en las terapias de activación de apoptosis por vía extrínseca.

Otras estructuras que juegan un papel importante en la activación del DISC son los *lipid rafts*, o balsas lipídicas de la membrana. Estos *rafts* lipídicos son zonas de la cara externa de la membrana plasmática enriquecidas en colesterol y esfingolípidos que juegan un papel fundamental en la segregación y compartimentación de determinados componentes de la bicapa [133]. Estas balsas son fundamentales para la agregación de receptores de membrana [134]. Diferentes estudios han mostrado que estos *rafts* regulan la sensibilidad a la muerte inducida por TRAIL [134-136]. En 2009, Rossin *et al.* demostraron que la palmitoilación de DR4 era crítica para la localización de estos en los *lipid rafts*, siendo requerimiento indispensable para inducir muerte celular por ligando. Por el contrario, no observaron lipidación de DR5. Pero quizás lo más importante de este trabajo fue la demostración de que la palmitoilación de los DRs favorecía la oligomerización [137]. Garate *et al.* han demostrado que se puede inducir muerte celular independiente de ligando por aglutinamiento de DRs en los *lipid rafts*, tratando a las células con fosfolípidos sintéticos como edifosina o perifosina [138, 139].

## Formación del DISC

La llegada de trímeros de TRAIL favorece la trimerización de DRs en la membrana, lo que produce la conformación espacial necesaria para el ensamblado del DISC. Tras la estimulación con el ligando se produce el reclutamiento de FADD a la región intracelular de los receptores a través de su dominio DD, lo que guía la unión de las caspasas iniciadoras 8 y 10. La integración de caspasas con FADD se lleva a cabo por interacción homotípica de los dominios DED de ambas proteínas. Las caspasas son activadas en el DISC liberándose las subunidades activas que procesan a las caspasas efectoras. Aunque la estequiometría del DISC es un tema complejo, trabajos de espectrometría de masas (MS-MS) han ayudado a aclarar mucho el panorama. En la actualidad, se acepta que el DISC está formado por tres moléculas de TRAIL, tres receptores y una de FADD (3:3:1) [107]. En cuanto a las caspasas, está establecido que se procesan por trans-activación mediante un modelo de proximidad. De acuerdo con la activación en dos pasos previamente definida, la proximidad de dos caspasas en el DISC hace que se activen entre sí, liberando primero el fragmento de 10KDa (p41+p10), y posteriormente el de 18KDa (p23+p18+p10) [140]. Estas caspasas presentan dos dominios DED. A través del dominio DED1 interaccionan con FADD, quedando el DED2 libre para la entrada de otra caspasa,

creando cadenas en el DISC, lo que amplifica notablemente la activación de apoptosis a este nivel [107, 141]. Como se ha mencionado previamente, hay dos caspasas iniciadoras de ruta extrínseca: caspasa-8 y caspasa-10. Ambas presentan una alta similitud estructural y funcional. Sin embargo, un reciente trabajo de Horn *et al.* ha demostrado que, mientras que caspasa-8 es esencial para la formación del DISC, caspasa-10 no solo no es esencial, sino que impide la correcta activación de caspasas-8. Los autores sugieren la necesidad de más investigación para esclarecer este escenario, pero la falta de un homólogo para caspasa-10 en ratón complica el estudio en modelos *in vivo* [142].

Además de las caspasas, existen otras proteínas con dominio DED que pueden interactuar con FADD. Al no ser catalíticamente activas, ocupan el espacio destinado para la entrada de caspasas al DISC, y por tanto, tienen la capacidad de bloquear la vía extrínseca. Entre estas proteínas destacan cFLIP y PEA-15.

cFLIP fue identificada inicialmente como una proteína producto de un gen viral (vFLIP), pero posteriormente se determinó el gen homólogo en mamíferos (FLICE). A pesar de que se han descrito numerosas variantes de *splicing*, existen tres isoformas mayoritarias: FLIP<sub>L</sub>, FLIP<sub>S</sub> y FLIP<sub>R</sub>. Las isoformas R y S son muy similares. Ambas presentan dos DED. La diferencia entre ellas se establece en el extremo C-terminal, donde la forma S presenta una cola de ~20 aminoácidos necesaria para ubiquitinación y degradación. Por el contrario, la isoforma larga (L), presenta en su extremo C-terminal un dominio estructuralmente similar al de caspasa-8 y 10, aunque este carece de funcionalidad catalítica. Esta proteína se encuentra codificada en el cromosoma 2, muy cerca de caspasa-8 y 10, lo que sugiere un origen de esta proteína por duplicación [143].

A pesar de que cFLIP está considerado un inhibidor de la activación de caspasas iniciadoras en el DISC, investigaciones recientes han demostrado que su papel en la regulación es más complejo de lo esperado. A pesar de presentar un dominio catalítico inactivo, FLIP<sub>L</sub> confiere la conformación espacial necesaria a caspasa-8 para producir una activación parcial. La interacción entre FLIP<sub>L</sub> y caspasa-8 tiene la capacidad de producir el primer corte, lo que hace que se libere la subunidad pequeña de caspasa-8 (p10) así como un fragmento equivalente en FLIP. Esto deja a ambas proteínas en su forma de 43KDa (p43). Sin embargo, la subunidad grande (p18) es totalmente dependiente de trans-activación, de modo que no se da una activación total. P43-FLIP recluta a RIP1 y TRAF2, favoreciendo la activación de la ruta de NFκB. FLIP<sub>S</sub> y PEA-15 carecen

totalmente del extremo C-terminal. Esto impide el acomodo estructural de caspasa-8 inhibiendo su activación [143].

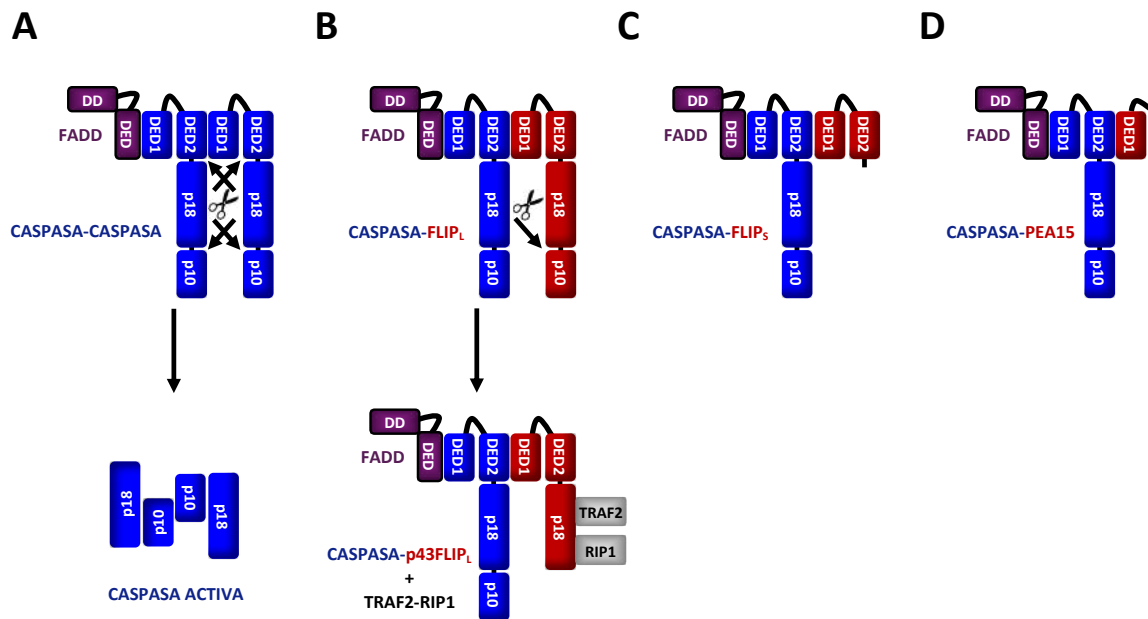


Figura 12. Modelos de regulación entre caspasa-8, cFLIP y PEA-15.

Los trabajos iniciales de Scaffidi *et al.* demostraron que la sobre-expresión ectópica de FLIP, en cualquiera de sus variantes, bloqueaba la muerte inducida por ligando [144]. Sin embargo, dada la actividad parcial que subyace de la interacción entre caspasa-8 y FLIP<sub>L</sub> cuando los niveles fisiológicos de la isoforma larga son moderados, la capacidad de dicha isoforma de inhibir la activación de apoptosis en el DISC se ha puesto en entredicho [145]. Recientemente, los experimentos de modelo unificado del grupo de Marion MacFarlane han arrojado luz al respecto. En estos ensayos de formación de DISC *in vitro* observaron cómo pequeñas cantidades de FLIP<sub>L</sub> eran necesarias para la formación del complejo y posterior activación de caspasa-8, mientras que a altas concentraciones ejercía un rol inhibitorio. Por el contrario, al adicionar FLIP<sub>S</sub> solo mostraba inhibición del sistema, independientemente de la concentración utilizada [146].

PEA-15/PED es una proteína de 15KDa que presenta un solo DED. La ausencia de un segundo DED invita a pensar en su alta capacidad para inhibir la activación de caspasas en el DISC, ya que al entrar en el complejo no dejará un segundo DED libre para formar cadenas de activación. En 1999, Condorelli *et al.* demostraron que la sobre-expresión de esta proteína inhibía la ruta extrínseca por interacción con el DED de FADD. Sin embargo, también observaron que el efecto de la sobre-expresión se podía revertir con inhibidores de la proteína quinasa C (PKC) [147]. Hoy

día se sabe que esta proteína juega un papel importante en la regulación negativa de la muerte inducida por TRAIL en gliomas [148].

### Señalización no apoptótica de TRAIL

Además de la función apoptótica de TRAIL, se le han atribuido otras funciones no relacionadas con la apoptosis. La activación de señalización no apoptótica se ha atribuido a la unión al DISC (Complejo I) de determinadas proteínas como RIP1, TRAF2 o NEMO, que contribuyen a la formación del complejo II [149]. En la señalización mediada por  $\text{TNF-}\alpha\text{/TNF-R1}$  se ha descrito que la formación del complejo II se escinde de los receptores, presentándose de forma soluble en el citosol [150]. Sin embargo, pese a que Lavrik *et al.* demostraron en 2008 que en el DISC también se puede producir la solubilización del complejo II [151], lo cierto es que a día de hoy no está claro si la solubilización o compartimentación del complejo II es necesaria para la señalización no apoptótica de TRAIL. Varfolomeev *et al.* encontraron que la presencia de RIP1 y NEMO en el DISC favorece la fosforilación del complejo IKK, el cual, fosforila al inhibidor  $\text{I}\kappa\text{B}$ , produciendo su degradación. Esto permite la translocación de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  al núcleo, donde induce la expresión de sus genes diana. Entre estos genes se encuentran cFLIP, IAP1, IAP2, XIAP y Bcl-xL, por lo que la activación de esta vía promueve la supervivencia [22, 149]. Varfolomeev *et al.* también demostraron que RIP1 favorecía la señalización mediada por p38 MAPK, mientras que TRAF2 era la responsable de activar la señalización mediada por JNK [149].

En otros trabajos, también se ha demostrado la influencia de TRAIL sobre rutas no apoptóticas. En células de neuroblastoma, el tratamiento con TRAIL produce la fosforilación de ERK1/2 y Akt, además de la mencionada activación de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  [152]. En el modelo de melanoma también se ha demostrado una fuerte fosforilación de ERK1/2 tras el tratamiento con TRAIL. En este trabajo de Zhang *et al.* comprobaron la sensibilidad a TRAIL en 12 líneas de melanoma con distinta sensibilidad a TRAIL. Al tratar con el inhibidor de MAPK/ERK observaron que se producía una sensibilización en células resistentes. Los autores relacionaron la sensibilización con una reducción en la expresión de Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 [153]. En otro trabajo llevado a cabo en líneas celulares de cáncer gástrico, Wu *et al.* obtuvieron resultados similares. En este caso, la inhibición de ERK producía la disminución de XIAP, cIAP2 y Mcl-1 [154]. En ambos trabajos relacionan la activación con bloqueos producidos aguas debajo del DISC. En el modelo de GBM cambia el escenario. Vilimanovich *et al.* observaron fosforilación de ERK tras el tratamiento con

TRAIL y encontraron además que esta fosforilación estaba mediada por MEK1. En este caso, a diferencia de los otros modelos, la inhibición de ERK reduce la proliferación, pero no sensibiliza a TRAIL. Como veremos más adelante, las células de GBM presentan una fuerte resistencia a la activación de caspasas en el DISC, y los inhibidores de ERK producen su efecto aguas debajo de este. En cambio, cuando silenciaban FLIP sí observaban sensibilización, pero además, impedían la activación de ERK, lo que sugiere que la estimulación de la vía de ERK puede estar mediada por componentes del DISC, pero la resistencia la ejerce aguas abajo [21, 155].

Otra vía de supervivencia que puede ser activada por TRAIL es la de PI3K/Akt. Esta ruta está sobre-activada en muchos tumores. A veces, el gen responsable de la inhibición de esta ruta, PTEN, se encuentra mutado o ausente. Existen varios trabajos que demuestran que el tratamiento con TRAIL aumenta la fosforilación de Akt [156, 157]. Además, la pérdida de PTEN confiere resistencia al tratamiento con ligando, lo que refuerza esta afirmación. El silenciamiento de Akt, la restauración de PTEN o la inhibición química de PI3K sensibilizan a TRAIL [157]. Como mecanismo, el trabajo de Sun *et al.* demostraron que la fosforilación de Akt inducida por TRAIL es mediada por p38/HSP27 [156].

### Regulación post-transduccional de la apoptosis

La apoptosis es una ruta esencial y su regulación no se reduce solamente al ratio de expresión entre proteínas pro- y anti-apoptóticas. En este sentido, las investigaciones que profundizan sobre la regulación de los componentes de la ruta a nivel post-transduccional han sido numerosas. Existen modificaciones que regulan la actividad de una determinada proteína, activando o inhibiendo su acción. Otras veces, la modificación puede determinar su estabilidad.

**Fosforilación:** La regulación de proteínas por fosforilación es muy frecuente durante la apoptosis. Consiste en la incorporación de grupos fosfato a residuos de Serina (S), Treonina (T) o Tirosina (Y). Es mediada por las proteínas quinasas y puede revertirse por la acción de fosfatasas. Hasta la fecha, han sido numerosas las fosforilaciones descritas en caspasas. Si nos centramos en las caspasas que median la ruta de señalización de TRAIL, la activación de caspasa-8 en el DISC está regulada por fosforilación. Hasta hoy, se han identificado fosforilaciones en: Thr293, 380 y 448, así como Tyr287, 305 y 347. De todas ellas, la más estudiada es la Y-380, que se localiza entre las subunidades p18 y p10. Está mediada por Src e inhibe la activación de caspasa-

8 en el DISC, ya que supone un impedimento estérico para la activación por dimerización [158]. Durante la mitosis, Cdk1/ciclina B1 fosforila a caspasa-8 en Ser387, lo cual genera un fosfoepítipo para la unión de Plk1, que produce una segunda fosforilación en Ser305. Estas fosforilaciones resultan en la inhibición de caspasa-8 durante la mitosis haciendo a la célula más resistente a la apoptosis por vía extrínseca [159]. La fosforilación de Thr263 también regula negativamente la actividad de caspasa-8. Esta fosforilación es mediada por RSK2 y modifica el sitio activo de la enzima impidiendo acción. Además, RSK2 favorece la ubiquitinación y degradación de caspasa-8 [160].

A diferencia de caspasa-8, la fosforilación en caspasa-10 no está estudiada. Se acepta la idea de que es redundante en función con caspasa-8, pero su ausencia en ratones complica bastante su estudio [161].

En caspasas efectoras también se han demostrado numerosas fosforilaciones. En caspasa-3, la fosforilación de la Ser150 por p38 $\alpha$  inhibe su actividad, mientras que la fosforilación por PKC $\delta$  la activa. Caspasa-7 está regulada negativamente por PAK2 en los residuos Ser30, Thr173 y Ser239. Caspasa-6 es fosforilada por ARK5 en el residuo Ser257, inhibiendo su función [161].

También se han reportado fosforilaciones en otras proteínas del DISC. La fosforilación de PEA-15 en Ser116 es necesaria para la unión de esta a FADD. Esta fosforilación es mediada por CamKII o por Akt [162]. La propia FADD también es fosforilada en Ser194, aunque las funciones controladas por esta modificación no están relacionadas con su función apoptótica [163].

**Ubiquitinación:** La ubiquitinación consiste en la modificación de proteínas por la unión de la proteína Ubiquitina (Ub) a residuos de Lisina (K). Estas Ub pueden unirse entre sí a través de sus residuos de K formando largas cadenas de poli-Ub. Las cadenas más frecuentes son las formadas por Ub, unidas a través de Lys48 (K-48) y Lys63 (K-63). Dependiendo del tipo de modificación la regulación tendrá un determinado sentido u otro. En sentido amplio, la modificación por mono-Ub o por poli-K-63 Ub regulan la señalización de proteínas, mientras que la modificación por poli-K-48 Ub marca a las proteínas para degradación. La activación de caspasa-8 en el DISC está finamente regulada por procesos de ubiquitinación. Cull3/RBX1 interactúan con el DISC y poli-ubiquitan a caspasa-8 con cadenas K-63, favoreciendo su activación en un proceso mediado por p62/SQSTM1 [164]. Como propusieron posteriormente Békés y Salvesen, una vez



activa, caspasa-8 no es muy estable. Sin embargo, la ubiquitinación favorecería la interacción con p62/SQSTM1, lo que aportaría estabilidad a la enzima [165]. Por otra parte, parece que la asociación de Cull3 con el DISC no se da en todos los modelos celulares [107]. La des-ubiquitinasa A20 es la enzima capaz de revertir la ubiquitinación mediada por Cull3, inhibiendo la activación de caspasa-8 [164].

Gonzalves *et al.* demostraron que TRAF2 también puede interactuar con el DISC y modificar a caspasa-8. Es un proceso posterior a la acción de Cull3 y en este caso se marca a caspasa-8 con cadenas K-48 en varios residuos de la subunidad p18 (Lys224, 229 y 231). Esta modificación induce la degradación por vía proteosomal de caspasa-8 y consecuentemente inhibe la apoptosis [166].

HECTD3 también ubiquitina a caspasa-8 con cadenas K-63 en el residuo Lys215, impidiendo la activación de caspasa-8 en el DISC. Tanto la disminución de HECTD3 como la mutación de Lys215 en caspasa-8 favorecen la sensibilización a TRAIL [167].

El complejo LUBAC, formado por las proteínas SHARPIN, HOIL-1 y HOIP, tiene la peculiaridad de generar cadenas lineales de poli-Ub unidas por Met1. Este complejo es reclutado en el DISC a través de FADD. Caspasa-8 es linealmente ubiquitinada por HOIP. La presencia del complejo LUBAC atrae al DISC a des-ubiquitinatasas, entre ellas A20. En conjunto, la presencia de este complejo inhibe la acción apoptótica de TRAIL, activando a su vez la ruta de NFκB [168].

También se ha descrito ubiquitinación en receptores. MARCH-8 es una proteína encargada de la ubiquitinación de proteínas de membrana para su internalización. Entre sus sustratos se encuentra TRAIL-R1/DR4. MARCH-8 ubiquitina a TRAIL-R1 en el residuo Lys273, reduciendo su presencia en membrana [169].

**O-glicosilación:** Este proceso ha demostrado ser un importante mecanismo de modificación para la susceptibilidad a TRAIL. Analizando 119 líneas celulares de tumores humanos, Wagner *et al.* concluyeron que la expresión de la O-glycosyltransferasa GALNT1 correlacionaba con la sensibilidad a TRAIL. Tanto siGALNT1 como la mutación de los sitios de O-glicosilación reducían notablemente la sensibilidad al ligando de muerte [170]. La N-glicosilación de TRAIL-R1 y mTRAIL-R también ha mostrado un aporte positivo a la sensibilización a TRAIL [171]. Otra relación entre la glicosilación y la sensibilidad a TRAIL es mediada por Galactina-3. Como se ha

descrito anteriormente, el aglutinamiento por uniones PLAD de DRs favorece la correcta activación de caspasa-8 en el DISC. Galactina-3, debido a su afinidad con la  $\beta$ -galactósido de las glicosilaciones en los DRs, hace de puente entre los dominios extracelulares de diferentes receptores, lo que permite la agregación de estos previa a la estimulación con ligando, favoreciendo la sensibilización. Este fenómeno ha sido descrito en más detalles en otros receptores de membrana [172].

### Estabilización del DISC en la membrana

La endocitosis es un proceso fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular. Austin *et al.* demostraron que los DRs se internalizan para su degradación en un proceso mediado por la maquinaria de internalización de la clatrina [78]. La ruta de internalización por clatrina es un mecanismo general de las células eucariotas que emplean para la internalización de proteínas de membrana. En este proceso, la clatrina crea una red que envuelve una invaginación de la membrana celular hasta formar vesículas citoplasmáticas. La clatrina no interacciona directamente con los receptores de membrana, utiliza proteínas adaptadoras como AP2 y otras proteínas accesorias [173]. Han sido descritas vías que requieren de la internalización del complejo ligando-receptor para llevar a cabo el proceso de señalización [174]. Sin embargo, Kohlhass *et al.* en 2007 demostraron que, pese a que tras el tratamiento con TRAIL los DRs eran rápidamente internalizados, esta internalización no era necesaria para la inducción de apoptosis [175]. Por otra parte, el trabajo de Austin *et al.* previamente mencionado demostró que la endocitosis mediada por clatrina era desmantelada e interrumpida al ser diana de caspasas, siendo el adaptador AP20 diana de caspasa-8 y la cadena pesada de clatrinaDyn-1 diana de caspasa-3. Esto produce una amplificación de la funcionalidad del DISC, aumentando la muerte celular [78]. Posteriormente, Reis *et al.* demostraron que este proceso era mediado por dinamina 1 (Dyn-1). Mecánicamente, determinaron que la estimulación de caspasa-8 con TRAIL producía la liberación de calcio del retículo endoplasmático a través de RyR (receptor ryanodina), lo que favorecía la activación de Dyn-1 y posterior endocitosis [176]. En 2008, Zhang *et al.* encontraron una fuerte asociación entre la constitutiva internalización de DRs y la resistencia a TRAIL en cáncer de mama. También observaron que inhibiendo la internalización de receptores restauraban la sensibilidad a TRAIL [177].

La glicosilación también se ha propuesto como un evento necesario para la estabilización de los receptores de TRAIL en membrana. Como se ha descrito previamente, GALNT utiliza las glicosilaciones para formar agregados de receptores que incrementan la acción de TRAIL. Estas glicosilaciones pueden mediar también la estabilización de receptores en la membrana [172]. Wu *et al.* demostraron que el silenciamiento de la proteína transmembrana syndecano-1 (CD-138) sensibilizaba a TRAIL. Ellos demostraron que el silenciamiento de esta proteína estaba directamente relacionado con un incremento en la expresión de la GALNT3, favoreciendo la glicosilación de los receptores [178].

La estabilidad en membrana del complejo TRAIL-DRs también puede ser regulada por mono-Ub mediada por c-Cbl [179]. El silenciamiento de esta ubiquitin-transferasa sensibiliza a TRAIL incrementando los niveles de DRs [180]. c-Cbl juega un papel importante en la rápida degradación de DRs tras el tratamiento con TRAIL [181].

### Escenario actual en la investigación con TRAIL

A pesar del interés que despertaron las terapias con TRAIL en estudios preclínicos, la realidad es que actualmente, las dos estrategias terapéuticas probadas en ensayos clínicos (TRAIL recombinante y anticuerpos anti DRs), han mostrado unos resultados muy poco alentadores [118]. Además, en estudios preclínicos, muchas células tumorales son resistentes a TRAIL. Los mecanismos de resistencia mayoritarios con los que se enfrentan las terapias con TRAIL a nivel preclínico son:

- Baja expresión de DRs y alta expresión de receptores trampa [22].
- Alta expresión de cFLIP, que produce el bloqueo de la activación de caspasas iniciadoras en el DISC [117].
- Desequilibrio entre la expresión de proteínas de la familia de Bcl-2 y proteínas BH3-Only, que impide la activación de la vía mitocondrial [117].
- Alta expresión de IAP, que inhibe la activación de caspasas efectoras y median la regulación de otros eventos en la ruta a través de su papel en ubiquitinación [117].

Dada la gran cantidad de células que presentan resistencia al tratamiento con ligandos de muerte, numerosas investigaciones se centran en la búsqueda de nuevas dianas que potencien la apoptosis inducida por TRAIL. Entre estas estrategias, las que más interés han suscitado son:

- ***Estrés en el retículo endoplasmático (RE)***. El plegamiento de proteínas en el RE es un proceso crucial para la fisiología de la célula y su mal funcionamiento puede inducir estrés en el RE. Para solventarlo, se activa la respuesta a proteínas mal plegada (UPR, del inglés: *unfolded protein response*). Si el estrés persiste, la UPR puede favorecer la inducción de apoptosis. En 2014, Martín-Pérez *et al.* y Lu *et al.* demostraron en laboratorios independientes que una activación descontrolada de la UPR favorecía un aumento de la expresión de DR5 [182, 183]. En estos trabajos se emplearon taspigargina y tunicamicina como inductores de estrés, pero a día de hoy se sabe que fármacos aceptados por la FDA como bortezomib también pueden sensibilizar a TRAIL a través de la UPR, mostrando buenos resultados a nivel preclínico, tanto en cultivos celulares [184], como en modelos murinos [185].
- ***Miméticos de SMAC***. La alta expresión de IAPs es una de las causas más comunes en las células resistentes a TRAIL. De hecho, el balance entre XIAP y Smac es crucial para la sensibilización en células tipo II [186]. En este sentido, los miméticos de Smac han mostrado una gran eficacia en la sensibilización a TRAIL de numerosos modelos celulares [187], incluso, como veremos más adelante, en modelos tan resistentes a TRAIL como el GBM [188].

Una cuestión interesante sobre la que hay que profundizar en los ensayos preclínicos es el destino de las células que sobreviven al tratamiento con TRAIL. Pese a la gran homogeneidad genética que presentan las líneas celulares, el tratamiento con TRAIL en la mayoría de los casos no acaba con el 100% de la población. La variabilidad que presentan las células en un cultivo puede favorecer una respuesta fraccionada a estímulos pro-apoptóticos [189]. En 2010, Lovric *et al.* demostraron que dosis sub-letales de TRAIL podían inducir una actividad residual de CAD, lo que favorecía mutaciones en el ADN en células supervivientes [190]. Esto es un punto importante a tener en cuenta a la hora de valorar una estrategia ante posibles recidivas derivadas de este tipo de tratamientos.

En cuanto a los ensayos clínicos, tanto los test con TRAIL recombinante (Dulanermin) como los anticuerpos anti-DRs han mostrado una buena tolerancia y un alto nivel de seguridad. Realizando una comparativa entre los distintos fármacos, los anticuerpos anti-DRs presentan una vida media de varios días a una semana, mientras que Dulanermin perdura solo unas horas en el organismo. En cuanto a la afinidad por receptores, la molécula recombinante puede inducir apoptosis a través de DR4 y DR5, mientras que los anti-DRs solo actúan a través de su receptor epítipo. De este modo, es muy importante conocer a nivel preclínico qué receptor es el utilizado predominantemente por TRAIL para inducir apoptosis en cada modelo tumoral. Por otra parte, Durlanermin presenta el inconveniente de ser secuestrado por receptores trampa, dificultad fácilmente solventada por los anticuerpos [117].

A pesar de los pobres resultados obtenidos hasta la fecha, la buena tolerancia y seguridad, así como los buenos resultados preclínicos que muestran este tipo de terapias, hacen que, en la actualidad, numerosas investigaciones se estén centrando en la elaboración de nuevas moléculas basadas en TRAIL y la búsqueda de nuevas terapias combinadas, con la intención de mejorar el efecto de estos tratamientos en ensayos con pacientes. A día de hoy existen moléculas de TRAIL de nueva generación que tienen como objetivos mejorar sus prestaciones de solubilidad y estabilidad, así como potenciar su acción citotóxica con la intención de evitar la combinación con drogas quimioterapéuticas menos selectivas. De este modo, existen moléculas de TRAIL conjugadas con cremalleras de leucina e isoleucina que mejoran la estabilidad y potencian la acción pro-apoptótica. También se ha conjugado con moléculas con propiedades farmacocinéticas favorables, como HSA (albúmina de suero humana) o PEG (Polietileno glicol). Se han utilizado sistemas de nano-partículas siguiendo dos estrategias: encapsulando a TRAIL para ser liberada de forma estable y eficiente en su tejido diana, o inmovilizando a TRAIL en la membrana de la nano-partícula. Además, otro punto fuerte que apoya el uso de estas nano-partículas es la posibilidad de cargarlas con alguna droga adicional, terapias que han mostrado poca toxicidad *in vivo* [118].

En 2015, Avi Ashkenazi, uno de los investigadores que más ha aportado en la comprensión de los mecanismos que regulan la señalización mediada por TRAIL, especulaba sobre la actualidad y el futuro de este tipo de terapias. En esta revisión, destacaba la necesidad de reflexionar sobre los motivos que explican las discrepancias observadas entre los resultados preclínicos y los ensayos en pacientes. En esta línea, fija tres puntos estratégicos a abordar para mejorar la eficacia de estas terapias en el futuro [191]:

- Diseñar nuevas moléculas basadas en TRAIL que aumenten la potencia citotóxica del tratamiento.
- Identificar nuevos bio-marcadores que nos permitan estratificar de forma razonable a los pacientes.
- Buscar nuevas dianas terapéuticas que combinadas con TRAIL favorezcan la letalidad sintética en el tumor.

### Sensibilización a TRAIL en el modelo de GBM

Como explicamos en el capítulo anterior, las células de glioma presentan una fuerte capacidad para evadir tratamientos que inducen apoptosis. Salvo contadas excepciones, los resultados preclínicos muestran una alta resistencia a la apoptosis mediada por TRAIL en el modelo de GBM. En el año 2010, Bellail *et al.* estudiaron la resistencia a TRAIL en un amplio grupo de líneas celulares y células primarias de GBM para definir los niveles de resistencia al tratamiento con ligandos de muerte. Evaluando la expresión de DRs en una batería de 8 líneas celulares y 10 líneas de pacientes encontraron que todas expresaban DR5, mientras que por el contrario la expresión de DR4 se daba solo de forma débil en algunas células. No detectaron una fuerte expresión de receptores trampa en ninguna línea. A pesar de que encontraron algunas células sensibles a TRAIL, la mayoría de las testadas presentaron resistencia a TRAIL. Comparando células sensibles y células resistentes, identificaron una alta expresión de RIP, cFLIP y PEA-15 como la causa de dicha resistencia y determinaron que caspasa-8 era reclutada al DISC, pero no procesada. Descartaron que las células resistentes presentaran una activación diferencial de la ruta de NFκB. Finalmente, encontraron que la resistencia a TRAIL podía vencerse con el silenciamiento de RIP, cFLIP y PEA-15 [21]. Estos mismos autores demostraron que la des-ubiquitinasa A20 está altamente expresada en GBM. Además, observaron una mayor expresión en las células resistentes a TRAIL con respecto a las sensibles. Observaron que sólo las células resistentes presentaban A20 y RIP1 en experimentos de inmunoprecipitación de DISC. Los autores demostraron que en GBM se producen constitutivamente complejos de DR5, TRAF2, RIP1 y A20 que explican la presencia de todas estas proteínas anti-apoptóticas en el DISC al tratar con TRAIL [192].

Como se ha descrito previamente, en GBM existe una alta expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 [23]. Esto ha guiado a diversos investigadores a buscar dianas que sensibilicen

a TRAIL aguas abajo del DISC. Cristofanon y Fulda demostraron que el mimético de BH3-*Only* ABT-737 sensibiliza a las células GBM a la muerte inducida por TRAIL. En este caso, la formación del DISC no se veía alterada. La sensibilización se debía a la estabilización de tBid y posterior amplificación producida por caspasa-3 que retroalimentaba la activación de la vía mitocondrial [193]. En otro trabajo coordinado por Simone Fulda, Bangert *et al.* demostraron que los inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) también sensibilizan a TRAIL en células de GBM. El tratamiento con estos inhibidores reducía la expresión de cFLIP y por tanto su reclutamiento al DISC, lo que favorecía la activación de caspasas y la consecuente apoptosis. La expresión ectópica de cFLIP revertía este efecto [194]. En otro trabajo de este mismo grupo, Fulda *et al.* demostraron que los miméticos de Smac también eran una buena opción para sensibilizar a células de glioma a la apoptosis inducida por TRAIL. En este trabajo, los autores demuestran que los miméticos de Smac antagonizaban con la proteína anti-apoptótica XIAP, lo que favorecía la sensibilización incluso en condiciones de alta expresión de Bcl-2. Estos resultados indicaban que los miméticos de Smac serían una buena opción para sensibilizar a células tipo II sin necesidad de revertir el bloqueo mitocondrial. Pero los datos más impactantes de este trabajo fueron los obtenidos *in vivo*, donde tras la implantación de las células de GBM U87MG en modelos ortotópicos, el tratamiento localizado con la combinación (miméticos de Smac + TRAIL) tras 7-9 días de la implantación del tumor conseguía la regresión total del tumor. Los autores muestran una gráfica de supervivencia en la que el 100% de los ratones tratados con la combinación llegaban vivos y sin síntomas neurológicos hasta los 70 días (tiempo final de medición), mientras que los ratones control presentaron una media de supervivencia de 30 días [188]. Este trabajo, publicado en 2002, es posiblemente el mayor logro obtenido en estudios *in vivo* con TRAIL en el modelo de GBM y nos invita a reflexionar sobre el gran potencial que ofrece la investigación con TRAIL en este modelo. Sin embargo, a pesar de los avances a nivel preclínico, en la actualidad no existe ningún ensayo clínico con TRAIL en pacientes de GBM.

## Capítulo 3: Pim quinasas

### Introducción a la familia de las Pim quinasas

Las proteínas Pim (*Proviral insertion site in Moloney murine leukemia virus*) son una familia de enzimas compuesta por tres serin/treonin quinasas (Pim1, Pim2 y Pim3). El primer miembro identificado de esta familia (Pim1) fue descrito en 1987 por similitud con el gen homólogo en linfocitos T de ratón [195]. Desde entonces, la expresión de Pim quinasas ha sido detectada en multitud de cánceres líquidos y sólidos, donde juega un papel importante en procesos tumorales como proliferación, inhibición de la apoptosis o migración. A día de hoy, estos oncogenes son objetivo de múltiples investigaciones, incluidos ensayos que testan la eficiencia y seguridad de inhibidores contra estas proteínas en humanos.

Los tres miembros de la familia Pim presentan una alta similitud estructural, siendo el grado de coincidencia de secuencia de Pim1 con respecto a Pim2 y a Pim3 del 61% y 71% respectivamente.



Como consecuencia de esta alta similitud resulta lógico pensar que se da entre ellas una gran redundancia funcional [196, 197]. Sin embargo, algunos trabajos como el de Beharry *et al.* que veremos más adelante, han definido funciones específicas entre los miembros de la familia Pim [198]. Otras veces en cambio, la expresión específica de tejido de cada una de las Pim (Tabla 5) puede explicar funciones particulares de una u otra en cada tipo de tumor.

Pim1 (cromosoma 6) y Pim2 (cromosoma X) contienen sitios de inicio de la traducción alternativos, presentando dos y tres isoformas respectivamente. Por el contrario, solo se conoce un subtipo de Pim3 (cromosoma 22). El ARN mensajero de PIM muestra una secuencia AUUU(A) en la región 3'-UTR que le confiere una baja estabilidad, lo que explica la escasa vida media del transcrito [196, 197]. La traducción del ARNm de Pim quinasas, al igual que otros oncogenes como c-Myc, está regulada por IRES. Estos IRES son sitios internos de entrada del ribosoma que permiten la expresión de genes en situaciones de estrés [199]. La traducción mediada por IRES permite la expresión de genes incluso durante apoptosis, teniendo la capacidad de revertir el destino de la célula. A pesar de que Pim1 es diana de caspasas, las Pim quinasas se expresan durante apoptosis y protegen de etapas clave durante la muerte celular, como la despolarización de la membrana mitocondrial [200, 201]. Pese a que se conoce que la expresión de Pim está regulada por IRES, aún se desconoce cómo este sistema regula la expresión de las isoformas que se traducen a partir de codones alternativos [199].

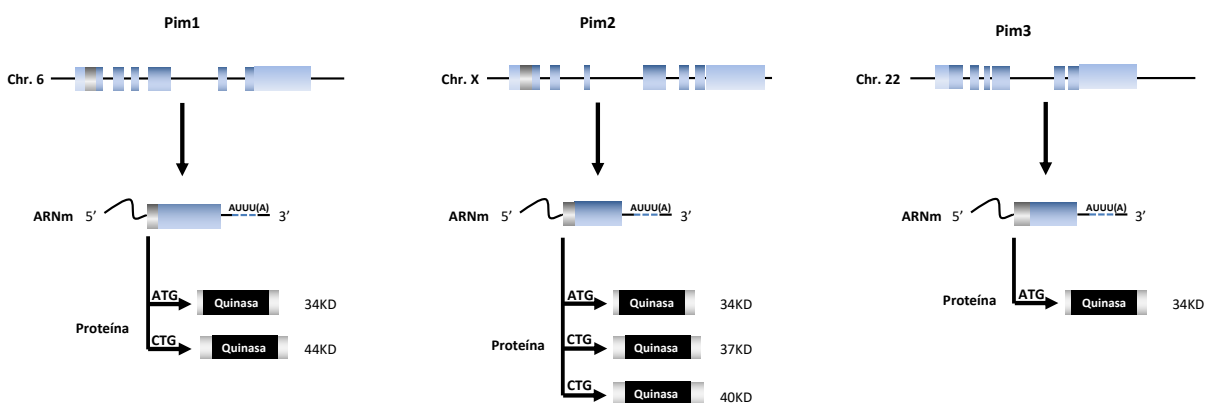


Figura 13. Genes, transcrito y proteínas de la familia Pim quinasas [197].

PIM es un gen de respuesta primaria, por lo que es rápidamente regulada por estímulos mitogénicos. Este tipo de respuestas, generalmente transitorias, está mediada por factores de crecimiento presentes en el microambiente. En este sentido, citoquinas como EPO, TNF- $\alpha$  e interleuquinas regulan la expresión de PIM mediante la ruta de señalización JAK-STAT [202-204]. La señalización mediada por CD40 también aumenta la expresión de PIM. Este incremento

está mediado por la vía de NFκB y puede ser revertido por el inhibidor de la ruta BAY 11-7082 [205]. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en modelos de leucemia. Otros factores de transcripción como IF-4E y KLF5, así como los microARNs miR1 y miR328 regulan la expresión de PIM1 [197].

Las Pim quinasas son unas proteínas constitutivamente activas, de corta vida media (5 minutos). Sin embargo, determinados factores pueden regular su acción catalítica y su estabilidad. La quinasa ETK fosforila a Pim1 en el residuo Tyr218, incrementando su actividad. Por otra parte, la sobre-expresión de la fosfatasa PP2A desfosforila a Pim1, lo que induce su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasomal [206]. De hecho, la ubiquitinación es crucial para la estabilidad de las estas quinasas. La chaperona HSP90 interacciona con las Pim incrementando su estabilidad, mientras que HSP70 promueve su ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Dicha degradación se inhibe en condiciones de hipoxia [207].

Como hemos mencionado ya anteriormente, la rápida proliferación de muchos tumores sólidos somete al tumor a un déficit de vascularización, lo que origina una disminución de los niveles de oxígeno en determinadas áreas. Esto desencadena la respuesta a hipoxia que transforma drásticamente el perfil de expresión de la célula. La hipoxia ha sido propuesta como un regulador positivo de la expresión de PIM1 [208]. Además, juega un papel importante en la quimio-resistencia mediada por hipoxia y su inhibición ha sido propuesta para solventar este problema [209, 210]. El mecanismo descrito para la regulación de PIM1 en hipoxia es independiente de HIFs. Chen *et al.* demostraron que la sobre-expresión de Pim1 incrementaba la resistencia a cisplatino en condiciones de hipoxia, mientras que un dominante negativo de Pim1 revertía el efecto, favoreciendo la activación de apoptosis por vía mitocondrial [209].

### Proteínas sustrato de Pim quinasas

Las Pim son una familia típica de serin/treonin quinasas que regulan a un amplio espectro del proteoma celular, lo que les vincula a numerosos procesos celulares. Desde su identificación, muchos han sido los sustratos encontrados para estas enzimas. Gran parte de estas dianas han sido identificadas por estudios de interacción proteína-proteína, como: SND1, RP9, CBX3, SNX6, BCR, API5, NUMA, PTPRO, RelA, SOCS-1, RuNX1/3, HP1, NFATc1, c-MYB y p100 [196]. Sin embargo, el hecho de que no se haya descrito ningún dominio de interacción en Pim

quinasas da pie a pensar que muchos de los sustratos a los que fosforilan no puedan ser identificados por estudios de interacción. Mediante un *screening* de librería de péptidos se ha propuesto a A-R-K-R-R-R-H-P-S-G-P-P-T-A como secuencia consenso [211], aunque posteriormente, a través de estudios comparativos de diferentes sustratos se ha simplificado al motivo K/R-X-X-X-S/T (donde X no puede ser un aminoácido largo hidrofóbico ni básico). Curiosamente, el motivo consenso de Pim es muy similar a R-X-R-X-X-S/T, a la secuencia diana de Akt. PRAS40, p21, p27 o MDM2 han sido identificadas como diana para ambas quinasas, sugiriendo un solapamiento de funciones entre las dos enzimas [207]. En la tabla comparativa que se muestra a continuación se enumeran algunos sustratos de Pim y Akt, lo que reafirma el alto grado de solapamiento y el paralelismo entre sus secuencias de reconocimiento. Es importante indicar que muchos de los sustratos juegan un papel importante en el desarrollo del GBM, como se ha mostrado anteriormente, con lo que la relación de estas quinasas con este modelo tumoral parece evidente.

Proteína	Aminoácido	Motivo	Quinasa	Bibliografía
Ask-1	Ser83	R-P-R-T-T-S	Akt, Pim	[212]
BAD	Ser112*	R-S-R-H-S-S	Akt, Pim	[207]
CHK1	Ser280	R-P-R-V-T-S	Pim	[213]
c-Myc	Ser329	R-V-K-L-D-S	Pim	[214]
CXCR4	Ser339	R-G-G-H-S-S	Pim	[215]
eIF-4B	Ser406	R-E-R-H-P-S	Pim	[207]
FOXP3	Ser422	R-S-Q-R-P-S	Pim	[216]
GSK3 $\beta$	Ser9	R-P-R-T-T-S	Akt, Pim	[212]
Histona H3	Ser10	Q-T-A-R-K-S	Pim	[217]
MDM2	Ser166	R-R-R-A-I-S	Akt, Pim	[218, 219]
MDM2	Ser186	R-K-R-H-K-S	Akt, Pim	[218, 219]
Notch1	Ser2152*	K-V-R-K-P-S	Pim	[220]
p21 <sup>CIP1/WAF1</sup>	Thr145	R-K-R-R-Q-T	Akt, Pim	[221, 222]
p27 <sup>kip</sup>	Thr157	R-K-R-P-A-T	Akt, Pim	[207]
PRAS40	Thr246	R-P-R-L-N-T	Akt, Pim	[207]
RelA	Ser276	Q-L-R-R-P-S	Pim	[223]
TSC2	Ser1798	R-K-R-L-I-S	Pim	[224]

Tabla 5. Comparativa entre sustratos para Pim quinasas y Akt. \*Los autores utilizan la numeración en Ratón. En humanos corresponden a BAD-Ser75 y Notch-Ser2162.

La fosforilación actúa como “interruptor” en la regulación de proteínas. A veces incrementa la estabilidad o su actividad enzimática, mientras que, en otros casos, la inhibe o induce su degradación. Dado que las Pim presentan un patrón marcadamente oncogénico muchas de las proteínas que regulan están relacionadas con el desarrollo de tumores, favoreciendo la supervivencia y protegiendo de la muerte celular por apoptosis.

### Papel de Pim quinasas en el desarrollo de tumores

A pesar de que las Pim quinasas presentan genes muy conservados en la evolución, lo cierto es que la función de esta familia de proteínas no está claro. Los ratones *knockout* para las Pim quinasas, incluso los triple *knockout*, son viables y fértiles, por lo que su función fisiológica parece no ser esencial o puede ser suplida por otras proteínas. A pesar de todo, los ratones PIM *knockout* presentan un tamaño corporal reducido y una respuesta deficiente a factores de crecimiento hematopoyéticos [225].

Desde que el gen de Pim1 fue descubierto en ratones con linfoma, muchas son las evidencias experimentales que demuestran que las Pim quinasas están sobre-expresadas en un amplio rango de tumores humanos. Frecuentemente, esta sobre-expresión correlaciona con un mal pronóstico. En la **Tabla 5** se resume la expresión de Pim quinasas en diferentes modelos tumorales:

Tumor	Expresión de Pim	Pronóstico
<b>Tumores Hematopoyéticos</b>		
Leucemia linfática crónica	<i>PIM1, PIM2</i>	ND
Linfoma de células de manto	<i>PIM1, PIM2</i>	Pobre
Linfoma difuso de células B grandes	<i>PIM1, PIM2</i>	Pobre
Linfoma de Burkitt	<i>PIM1</i>	ND
Linfoma de células B	<i>PIM1, PIM2</i>	Pobre
Leucemia mieloide aguda	<i>PIM2</i>	ND
<b>Tumores sólidos</b>		
Cáncer de próstata	<i>PIM1, PIM2</i>	Pobre, favorable
Cáncer de vejiga	<i>PIM1</i>	ND
Cáncer de páncreas	<i>PIM1, PIM3</i>	Favorable ( <i>PIM1</i> )
Carcinoma gástrico	<i>PIM1, PIM3</i>	Pobre
Carcinoma escamoso de cabeza y cuello	<i>PIM1</i>	Pobre
Carcinoma escamoso oral	<i>PIM1</i>	ND
Carcinoma colorectal	<i>PIM1, PIM3</i>	ND
Cáncer de hígado	<i>PIM1, PIM2, PIM3</i>	ND
Liposarcoma	<i>PIM1</i>	ND
Sarcoma de Ewing	<i>PIM3</i>	ND

Tabla 6. Expresión de Pim quinasa en diversos tipos de cáncer.

De acuerdo a la base de datos Rembrandt, en GBM la sobre-expresión de Pim quinasa correlaciona con mal pronóstico.

Pim quinasas regulan numerosos procesos relacionados con el desarrollo de tumores, como progresión del ciclo tumoral, inhibición de la apoptosis, migración o metabolismo:

**Ciclo celular y proliferación.** Las Pim regulan la proliferación favoreciendo la progresión del ciclo celular. Pim1 inactiva a p21<sup>CIP1/WAF1</sup> por fosforilación directa en el residuo Thr145. Como hemos descrito anteriormente, p21<sup>CIP1/WAF1</sup> inhibe la progresión del ciclo celular y su fosforilación bloquea la translocación al núcleo [222]. De manera similar, se ha sido descrito que las tres Pim quinasas inhiben a p27<sup>kip</sup> por fosforilación en los aminoácidos Thr157 y Thr198, favoreciendo su interacción con la proteína 14-3-3, lo que favorece su bloqueo en el citosol y posterior degradación por el proteasoma. Adicionalmente, las Pim reprimen la expresión de p27 por fosforilación e inactivación del factor de transcripción FoxO3a [226]. La inhibición de p21 y p27 impide la regulación negativa que ejercen estas proteínas sobre las ciclinas/CDK, permitiendo a la célula tumoral superar la parada en G1/S. Las Pim quinasas también pueden regular positivamente el ciclo celular en G2/M a través de Cdc25. Cdc25 es una familia de fosfatasas que activan a CDK1 (Cdc2) por eliminación de sus fosforilaciones inhibitorias en Thr14/Tyr15 [227]. La quinasa c-Tak1 fosforila a Cdc25C inactivándola. Pim1 fosforila a c-Tak1 de manera inhibitoria, lo que favorece la acción de Cdc25C y consecuentemente la activación de CDK1 [228]. Además, Pim puede interaccionar y fosforilar a Cdc25C activándola [229]. De forma similar, también se ha demostrado que Pim puede interaccionar y fosforilar a Cdc25A [230]. Adicionalmente, las Pim fosforilan a Chk1 en Ser280 inhibiéndola. Las Chk son serin/treonin quinasas que fosforilan entre otros sustratos a Cdc25A y Cdc25C. Por tanto, la inhibición que ejercen las Pim sobre Chk1 favorece la activación de las Cdc25 incrementando la proliferación [213].

**Apoptosis.** Una de las funciones que se ha estudiado más en profundidad es la capacidad de las Pim de inhibir apoptosis a través BAD. Como hemos descrito en el capítulo dos, BAD es una proteína perteneciente a la familia de las BH3-Only que interacciona con proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 favoreciendo la activación de la ruta intrínseca. Pim fosforila directamente a BAD en Ser112 (de acuerdo con su numeración en ratón), lo que favorece su secuestro por 14-3-3, inhibiendo la apoptosis [231]. Por otra parte, Pim también fosforila a Ask-1 en Ser83, inhibiendo la activación de vía de JNK/p38, lo que inhibe la activación de apoptosis

inducida por estrés. Pim-1 también incrementa la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 a través del factor de transcripción c-Myc [232]. Como hemos visto en el capítulo dos, otra forma de regular negativamente la apoptosis es mediante la fosforilación de caspasas. Sin embargo, a pesar de que Akt fosforila e inhibe directamente a la caspasa-9 en Thr263 [207, 233], nadie ha investigado el posible papel de Pim quinasas en la regulación directa de caspasas.

**Metástasis.** Las Pim quinasas han sido relacionadas también con migración. Santio *et al.* demostraron que la fosforilación de GSK3 $\beta$  y FOXP3 por Pim1 anulaba el papel anti-metastásico de ambas proteínas en el contexto tumoral. Como muestran los autores, Pim fosforila a GSK3 $\beta$  y FOXP3 en Ser9 y Ser422. Mientras que el inhibidor de Pim DHPCC-9 inhibía totalmente la migración, los mutantes GSK3 $\beta$ -S9A y FOXP3-S422A la reducían parcialmente, lo que sugiere un rol compartido de ambas proteínas en el control de la movilidad. Tanto GSK3 $\beta$  como FOXP3 están relacionadas con la expresión de la proteína anti-metastásica PTGS2. La regulación de la migración propuesta por Santio *et al.* parece estar mediada por un mecanismo pleiotrópico, siendo dependiente de PTGS2 en el caso de GSK3 $\beta$ , e independiente de PTGS2 en FOXP3 [234]. Pim también regula la metástasis a través de la fosforilación en Ser339 de CXCR4, el receptor de la citoquina quimio-táctica CXCL12 [215]. La sobre-expresión de CXCR4 correlaciona con proliferación, angiogénesis, metástasis, recaída y resistencia terapéutica en tumores. Determinadas proteínas sobre-expresadas en cáncer como EGF, VEGF o HIF regulan positivamente la expresión de CXCR4. Por el contrario, los nichos metastásicos más frecuentes (cerebro, médula ósea, hígado, pulmón, etc.) presentan niveles altos de proteína, lo que favorece la estabilización de nódulos metastásicos [235]. La expresión de Pim correlaciona con altos niveles de CXCR4 en membrana. La inhibición de Pim revierte la fosforilación en Ser339 de CXCR4, favoreciendo su internalización y reduciendo la externalización tras privación de CXCL12 [215]. En un reciente trabajo de 2018, Bialopiotrowicz *et al.* han demostrado que la migración inducida por CXCR4 está mediada por mTOR, vía que también puede ser bloqueada por inhibición de Pim [236]. Notch1 también ha sido determinado como mediador de la migración inducida por Pim. Los tres miembros de la familia Pim fosforilan a Notch1 en Ser2152, fosforilación necesaria para su localización nuclear y posterior señalización, lo que promueve la migración en la línea de cáncer de próstata PC-3 [220]. No obstante, se precisan más estudios para confirmar la relación entre Pim y Notch en migración.

**Expresión génica.** Pim juega un papel importante a distintos niveles de la regulación de la expresión génica. A nivel transcripcional, las Pim regulan a numerosos factores de transcripción

como c-Myc, RUNX o FOXP3. Pim fosforila a c-Myc en la Ser329. La sobre-expresión de Pim1/2 incrementa los niveles y la actividad transcripcional de c-Myc, mientras que el silenciamiento de Pim reduce dicho factor de transcripción, inhibiendo su función [214, 237]. Pim1 puede interactuar físicamente con c-Myc para facilitar su actividad transcripcional. Zippo *et al.* demostraron que la función de Pim1 en este complejo es fosforilar a la Histona H3 en Ser10, contribuyendo positivamente a la expresión de los genes dependientes de c-Myc. Los autores determinaron que Pim1 contribuye al menos a la expresión de un 20% de los genes diana de c-Myc [217]. La familia de factores de transcripción RUNX, de marcado carácter oncogénico en linfomagénesis, está relacionada con la proliferación celular y diferenciación. Pim interactúa físicamente con RUNXs, fosforilándolos y potenciando su actividad transcripcional [238]. FOXP3, del que hemos hablado con anterioridad, es fosforilado por Pim en Ser422, lo que inhibe su unión a la cromatina. Sin embargo, la fosforilación en Ser418 previene la fosforilación mediada por Pim en Ser422 [216], lo que pone de manifiesto la delicada regulación que ejercen las modificaciones post-transduccionales sobre la actividad de las proteínas. Pim quinasas también regulan la actividad de NFκB por fosforilación de RelA en la Ser276. Nihira *et al.* demostraron que Pim1 fosforilaba a RelA en respuesta a TNF-α. Esta fosforilación es esencial para la actividad transcripcional del complejo NFκB. En cambio, el silenciamiento de Pim1 combinado con el tratamiento con TNF-α inducía la muerte celular por lo que Pim1 no solo era fundamental para la señalización mediada por NFκB inducida tras el tratamiento con TNF-α, sino que era la responsable de definir el destino celular [223].

Las Pim quinasas también pueden regular la expresión génica a nivel transduccional. Pim fosforila 4EBP1 y eIF4E, reguladores de la traducción dependiente de 5'-Cap. 4EBP1 reprime la expresión génica por interacción con el factor de inicio de la traducción eIF4E, encargado de reclutar a la subunidad 40S del ribosoma al extremo 5' del ARNm. Pim fosforila a directamente a 4EBP1. 4EBP1 presenta un patrón jerárquico de fosforilación que es fundamental en la regulación de su interacción con eIF-4E. 4EBP1 hipo-fosforilada interactúa con eIF4E, mientras que su hiper-fosforilación revierte dicha unión. Gingras *et al.* demostraron que las fosforilaciones en 4EBP1 se dan de forma secuencial: primero en Thr37/Thr46 (4EBP1 hipo-fosforilado) y después en Ser65/Thr70 (4EBP1 hiper-fosforilada). La hiper-fosforilación revierte la unión 4EBP1-eIF-4E [239]. En un contexto de eliminación de eIF4E, 4EBP1 hipo-fosforilado es ubiquitinado y degradado por vía lisosomal, por lo que los niveles de eIF-4E son fundamentales para la estabilidad de 4EBP1 [240]. Pim hipo-fosforila e hiper-fosforila a 4EBP1, lo que libera a eIF-4E para ejercer su acción transduccional [196, 232, 241]. eIF-4E es el factor limitante en la traducción

dependiente de 5'-Cap [242]. Pim regula a eIF-4E al menos a tres niveles: a nivel transcripcional, ya que su expresión esta modulada positivamente por c-Myc [243], a través de 4EBP1 y por fosforilación directa en el residuo Ser209 [241]. El sistema 4EBP1/eIF-4E también puede ser controlado por la vía de mTOR, la cual puede ser regulada por Pim quinasas a distintos niveles. Sustratos de Pim como PRAS40, TSC2, AMPK o CXCR4 son reguladores de la vía aguas arriba de mTOR [207, 236, 244].

**Resistencia a radio y quimioterapia.** Las Pim quinasas están involucradas en otras funciones relacionadas con la malignidad tumoral, como la resistencia a drogas por estabilización de transportadores ABC [199]. Los transportadores ABC son proteínas de membrana que utilizan la hidrólisis de ATP para translocar sustancias a través de la membrana. Tienen un papel activo en la expulsión de toxinas en la célula, lo que les confiere una función esencial en la resistencia a fármacos característica de las células tumorales [245]. Pim-1 protege a la glicoproteína-P (gpP) de la degradación. En este trabajo, Xie *et al.* demostraron que Pim-1 interacciona y fosforila a gpP, lo que le protege de la ubiquitinación y posterior degradación vía proteasomal [246]. Esta proteína también es conocida como MDR (*multi-drug resistant*) y pertenece a la familia de los transportadores ABC. La resistencia a fármacos es una causa frecuente en el fracaso de la terapia antitumoral, por lo que los inhibidores de Pim quinasas han sido propuestos como sensibilizadores en varios tipos de tumores [246-248].

**Metabolismo energético.** La Pim quinasas regulan a AMPK, que es el principal sensor energético de la célula. De este modo, AMPK se activa cuando el ratio AMP/ATP es elevado. Al activarse, inhibe a mTOR a través de TSC2, lo que bloquea la costosa demanda requerida para la síntesis de proteínas dependiente de Cap, por el sistema 4EBP1/eIF4. La inhibición de Pim quinasas induce la activación de AMPK. Dicha activación requiere de la fosforilación en Thr172 mediada por LKB1. En un trabajo de Beharry *et al.*, demostraron que ratones triple KO para la familia de las Pim quinasas presentaban más activación de AMPK que los ratones control. La actividad de AMPK correlacionaba con una depleción de los niveles de ATP encontrados en el triple KO, los cuales mostraban un descenso en los niveles de síntesis proteica. Los autores encontraron que mientras la síntesis dependiente de Cap se mostraba muy reducida en el triple KO, la expresión dependiente de IRES (independiente de Cap) aparecía inalterada, lo que sugería la mediación de mTOR/4EBP1/eIF-4E en la inducción de la síntesis proteica mediada por Pim. Curiosamente, los autores observaron que al restaurar las Pim quinasas de manera individual, solo Pim3 revertía el escenario producido por las triple KO, demostrando que las funciones entre los



tres miembros de la familia Pim no son del todo solapantes [198]. Un reciente estudio de 2018 ha demostrado que el estrés metabólico producido por la privación de glucosa incrementa fuertemente la expresión de Pim1, promoviendo el efecto Warburg, por el que la célula obtiene energía a partir de glucólisis anaeróbica, con la consiguiente producción de lactato. La correlación entre la expresión de Pim1 y los niveles de lactato en pacientes de cáncer colorectal indujo a Zhang *et al.* a investigar dicha relación. De este modo, los autores encontraron que el silenciamiento de Pim1 hacía a las células más vulnerables a la privación de glucosa. También observaron que la inhibición del efecto Warburg, atenuaba la proliferación. En lo que se refiere al mecanismo, los autores observaron que Pim1 regulaba positivamente la expresión de las enzimas HK2 y LDHA, fundamentales para la transformación de glucosa en lactato [249].

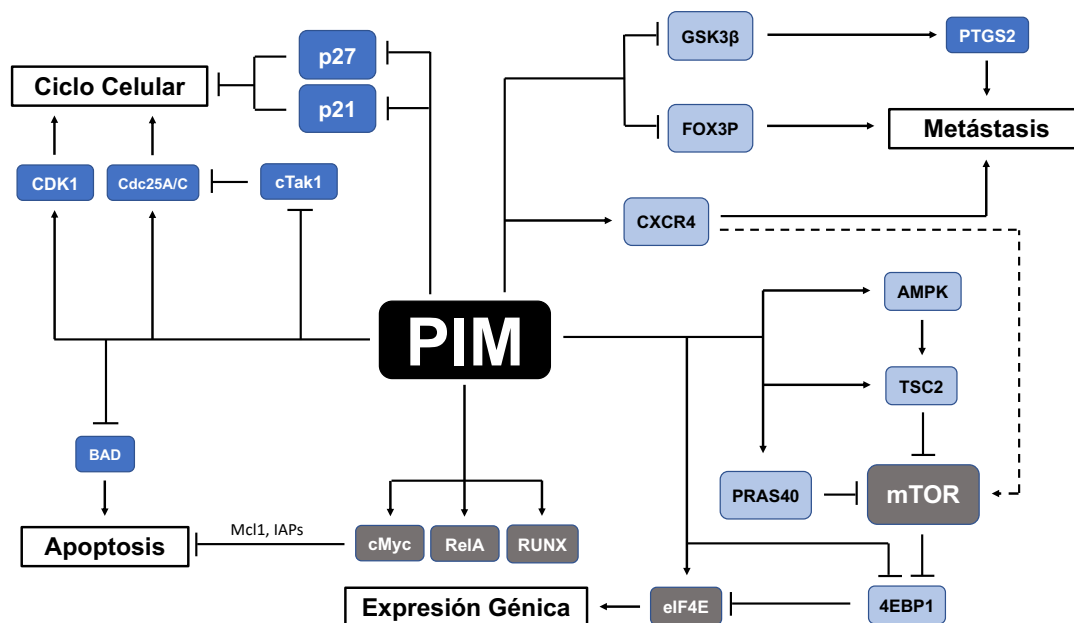
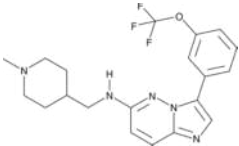
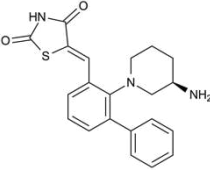
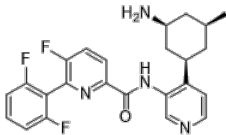
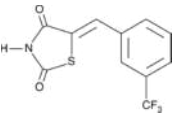
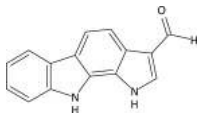
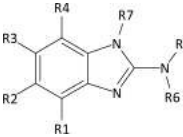
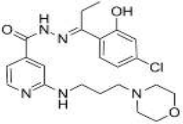
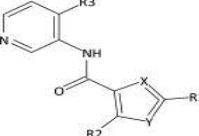


Figura 14. Papel de Pim quinazas en el desarrollo tumoral.

### Inhibidores de Pim quinasa

El ingente incremento de investigaciones que relacionan a las Pim quinazas con el desarrollo de tumores ha puesto en el punto de mira a esta familia de proteínas como diana terapéutica en el tratamiento contra el cáncer. Con el objetivo de desarrollar terapias de precisión contra estas quinazas, se ha conseguido el desarrollo de más de 100 inhibidores, pero sólo un reducido grupo ha llegado a ser ensayado en estudios clínicos [196]. En la **Tabla 6** se resumen los inhibidores que en la actualidad están disponibles.

La estructura cristalográfica de las Pim revela la presencia de dos lóbulos con una hendidura profunda en los lóbulos C y D-terminal. A pesar de que muestra una alta homología estructural con otras serin/treonin quinasas, el sitio de unión a ATP es diferente y confiere una alta selectividad a los inhibidores de Pim. Pim1 muestra como peculiaridad un residuo de prolina en la posición 123 pero este no altera la conformación en el bolsillo del sitio activo [250]. Algunos inhibidores son moléculas pequeñas que se dirigen directamente al dominio de unión de ATP a la proteína.

Nombre	Estructura química	IC50	Desarrollo
SGI-1776		Pim1=7nM Pim2=363nM Pim3=69nM FLT3=44nM Haspina=34nM	Ensayo clínico fase I
AZD1208		Pim1=0.4nM Pim2=5nM Pim3=1.9nM	Ensayo clínico fase I
PIM447 (LGH447)		Pim1=6pM Pim2=9pM Pim3=18pM	Ensayo clínico fase I
SMI-4a		Pim1=24nM Pim2=100nM	Estudios preclínicos
DHPCC-9		Pim1=120nM Pim2=510nM Pim3=10nM	Estudios preclínicos
SEL24-B58		Pim1=31nM Pim2=154nM Pim3=152nM	Estudios preclínicos
M-110		Pim1=2.5μM Pim2=2.5μM Pim3=47nM	Estudios preclínicos
GENE-652		Pan-inhibidor de PIM en rango picomolar	Estudios preclínicos

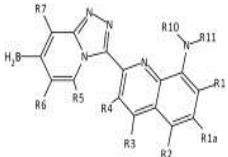
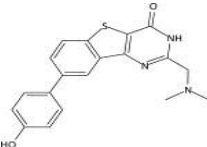
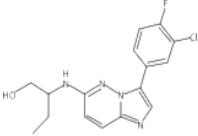
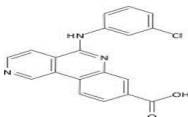
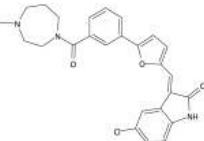
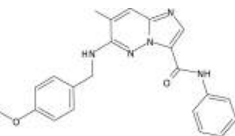
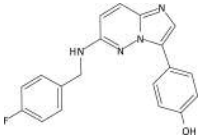
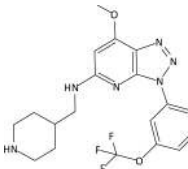
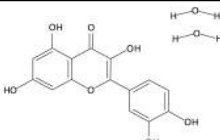
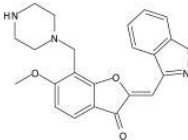

AR00459339		Pim1=0.8nM Pim2=52.4nM Pim3=36nM	Estudios preclínicos
A953864.1		Pim1=2nM Pim2=0.5nM Pim3=0.5nM	Estudios preclínicos
K00486		Pim1=40nM Pim2=2500nM	Estudios preclínicos
CX-4595		Pim1=46nM Pim2=186nM	Estudios preclínicos
CX-6258		Pim1=5nM Pim2=25nM Pim3=16nM	Estudios preclínicos
ETP-45299		Pim1=60nM Pim2=1098nM Pim3=162nM	Estudios preclínicos
ETP-39010		Pim1=130nM Pim2=420nM Pim3=79nM	Estudios preclínicos
Cpd 9a		Pim1=1nM Pim2=29nM Pim3=0.8nM	Estudios preclínicos
Quercetagina		Pim1=340nM Pim2=3450nM RSK2=2820nM	Estudios preclínicos
Cpd 14		Pim1=6nM Pim2=1160nM Pim3=13nM FLT3=47nM	Estudios preclínicos
CXR1002		Pim1=40mM Pim2=170mM Pim3=240mM	Estudios preclínicos

Tabla 7. Inhibidores de Pim quinazas [250].

El SGI-1776 (Imidazo[1,2-b]piridazina) fue el primer compuesto identificado que inhibía a todos los miembros de la familia Pim [251]. A nivel preclínico, ha sido muy utilizado en el estudio de

diferentes tipos de leucemias. En 2011, Chen *et al.* ensayaron este inhibidor en leucemia mieloide aguda (AML), un tumor líquido que presenta una fuerte sobre-expresión de Pim quinasas. El inhibidor fue probado en monoterapia en dosis entre 0,1 y 10 $\mu$ M, reduciendo la fosforilación de sustratos de Pim a partir de 3 $\mu$ M e induciendo muerte celular a 10 $\mu$ M. Pese a que no lograron revertir la muerte celular con inhibidores de caspasas, testaron el tratamiento en xenógrafos, observando una clara regresión del tumor. Mecánicamente, observaron una activación de BAD por reversión de la fosforilación en Ser112 y una caída de la proteína anti-apoptótica de Mcl-1, un gen dependiente de c-Myc [232]. Estos resultados venían a confirmar los obtenidos en 2009 en leucemia linfocítica crónica (CLL), cuando el mismo grupo identificó a este compuesto como inhibidor específico de Pim quinasas [252].

Otros trabajos han evaluado el efecto de SGI-1776 en combinación con otras drogas. De este modo, Siu *et al.* demostraron que tanto el tratamiento con SGI-1776 como el silenciamiento de Pim1 incrementaban la expresión de MIG6, un regulador negativo de la señalización de EGFR. Adicionalmente, encontraron que el inhibidor de Pim quinasas potenciaba el efecto anti-proliferativo del inhibidor de EGFR gefitinib. Este trabajo se desarrolló en las líneas de cáncer de próstata DU-154 y PC-3 tras identificar a MIG6 como resultado del cribado de genes diferencialmente expresados tras el tratamiento con el inhibidor de Pim M-110 [253]. Kim *et al.* demostraron que el inhibidor SGI-1776 sensibilizaba a las células de ratón a la radioterapia. En este trabajo, los autores observaron que el tratamiento con el inhibidor de Pim reducía la fosforilación de PRAS40, impidiendo la trimerización con 14-3-3 y FoxO3a, favoreciendo la localización nuclear de esta última. En el núcleo, FoxO3a promueve la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bim o FasL, que promueven la sensibilización. La terapia combinada mostró un claro efecto potenciador en xenógrafos [254]. PRAS40 interacciona con mTOR regulándola negativamente. Zhang *et al.* demostraron que Pim fosforila directamente a PRAS40, lo que revierte la interacción con mTOR, favoreciendo la activación de este último [244].

Como se ha explicado con anterioridad, las células tumorales utilizan estos transportadores ABC para expulsar compuestos citotóxicos. La sobre-expresión de ABCB1 y ABCG2 es muy frecuente en cáncer de mama y correlaciona con una peor respuesta a la quimioterapia. Ambas proteínas son diana de Pim quinasas. Natarajan *et al.* demostraron que el inhibidor SGI-1776, al igual que el silenciamiento de Pim1 revertía la resistencia a drogas quimioterapéuticas mediada por ABC [248].

El SGI-1776 fue el primer pan-inhibidor de Pim que se probó en pacientes. Se llevaron a cabo dos ensayos clínicos en fase I, uno en pacientes de cáncer de próstata y linfoma no-Hodgkin (NCT00848601), y el segundo en casos de leucemias recurrentes (NCT01239108). El inhibidor fue declarado no seguro para su uso en humanos ya que mostraron toxicidad por prolongación del ciclo cardíaco (QTc). A pesar de esto, el inhibidor SGI-1776 se sigue empleando a día de hoy en estudios preclínicos como prueba de concepto, dada la alta capacidad de inhibir a todos los miembros de la familia Pim.

Tras los intentos fallidos con SGI-1776, los investigadores han desarrollado ensayos clínicos con el pan-inhibidor AZD1208. A día de hoy se han llevado a cabo dos estudios en fase I (NCT01489722, NCT01588548). El segundo ensayo terminó en octubre de 2015 y los resultados mostraron que el inhibidor se toleraba de forma segura por debajo de 900mg, pero no mostró una gran eficacia como terapia antitumoral [255]. Este ensayo pone de manifiesto la necesidad de combinarlo con otros fármacos.

El PIM447 (LGH447) es un pan-inhibidor de Pim quininas que se administra de forma oral. Tras el primer ensayo clínico en 54 pacientes con mieloma múltiple recurrente (NCT014566889) 48 pacientes presentaron respuesta a dosis menores de 150mg, mientras que el resto (11%), presentó respuesta parcial, mejorando a dosis entre 150 y 500mg. El ensayo concluyó que este fármaco tiene un potente efecto en este tipo de pacientes [251].

En conjunto, la investigación en humanos con inhibidores de Pim quininas está en un estado muy inicial. Se requieren nuevos fármacos y más estudios en pacientes para trasladar a la clínica los beneficios antitumorales observados en las investigaciones preclínicas.

## Capítulo 4: p62/Sequestroma-1

### Introducción a p62: estructura y función

Las proteínas *scaffold* (de andamio), pese a no presentar una función enzimática por sí mismas, tienen un papel clave en numerosos procesos celulares, permitiendo la interacción entre otras proteínas para cubrir determinados procesos fisiológicos y estructurales. Una de las proteínas *scaffold* más importantes es el sequestosoma-1 (SQSTM1/p62). Codificada por el gen SQSTM1, está altamente conservada en metazoos, pero ausente en plantas y hongos. Fue originalmente identificada por Park *et al.* en 1995, por interacción con el dominio SH2 de p56lck [256]. Este mismo grupo demostró un año más tarde que esta proteína interactuaba de forma no covalente con ubiquitina. Sin embargo, la proteína no presentaba homología ni con hidrolasas ni con la subunidad S5a del proteasoma. De esta manera se identificaba una nueva clase de proteína de unión a ubiquitina que regulaba procesos de señalización a través de la degradación mediada por

ubiquitinación [257]. A día de hoy, SQSTM1/p62 se considera el primer receptor de autofagia identificado, siendo su función principal capturar sustratos ubiquitinados para su degradación en los autofagosomas [258].

SQSTM1 (5q35.3) es un gen de respuesta a estrés y su sobre-expresión correlaciona con mal pronóstico en diversos tipos de cáncer [259-263]. Se expresa ubicuamente en multitud de tipos celulares, presentándose tanto en el citoplasma como en el núcleo. Debido a su función, se encuentra de forma abundante en autofagosomas y lisosomas [264]. A nivel transcripcional, su expresión es inducida por el factor de transcripción NRF2 en condiciones de estrés oxidativo. A su vez, p62 interacciona con Keap1 bloqueándola, lo que favorece la estabilización de NRF2, incrementando su función transcripcional. Esto crea un “bucle” de retroalimentación que favorece aún más la expresión de p62 [265]. La vía de señalización de NFκB también regula positivamente la expresión de p62, lo que genera una retroalimentación de la ruta [266, 267]. El estrés reticular también favorece la expresión de p62. Este incremento favorece la formación de agregados de proteínas mal plegadas. Estos complejos co-localizan con las chaperonas HSP40 y HSP90, indicando un re-plegamiento en estas estructuras, lo que confiere un papel activo de p62 en la UPR. Esta respuesta requiere de la activación de NFκB y mTOR. La respuesta a proteínas mal plegadas es independiente de la eliminación de estas por vía autofágica [268]. P62 también puede ser positivamente regulada por la ruta de JNK [269, 270], mientras que el microARN miR-372 inhibe su expresión [271]. A nivel post-transduccional p62 es constantemente degradada por autofagia por lo que el acúmulo de esta proteína, una vez descartado el aumento transcripcional, suele deberse a la interrupción del flujo autofágico y es empleada como criterio para determinar dicha parada [272]. La hipoxia en cambio puede aumentar la autofagia favoreciendo su degradación [273].

Los ratones p62 KO son viables y no muestran diferencias reseñables con respecto al *wildtype* al menos durante las primeras 8 semanas. En estadios más adultos presentan una regeneración ósea atípica producida por un déficit en la osteoclastogénesis [274]. En estadios adultos presentan cuadros de obesidad y alteraciones en el metabolismo de la glucosa [275]. A partir de los 6 meses se observa una acumulación anormal de tau hiper-fosforilada en el hipocampo y córtex cerebral, lo que genera apoptosis y neurodegeneración [276].

Estructuralmente, se trata de una proteína de 62KDa que presenta diversos dominios para la regulación de su función: una región N-terminal PB1 de oligomerización, un motivo de dedos de

zinc (ZZ) para la interacción con RIP1 y otro de unión a TRAF6 (TB), un dominio LIR para la unión con LC3 (LIR) y otro de interacción con Keap1 (KIR). Finalmente, en el extremo C-terminal presenta la región UBA para asociación con ubiquitina [264].

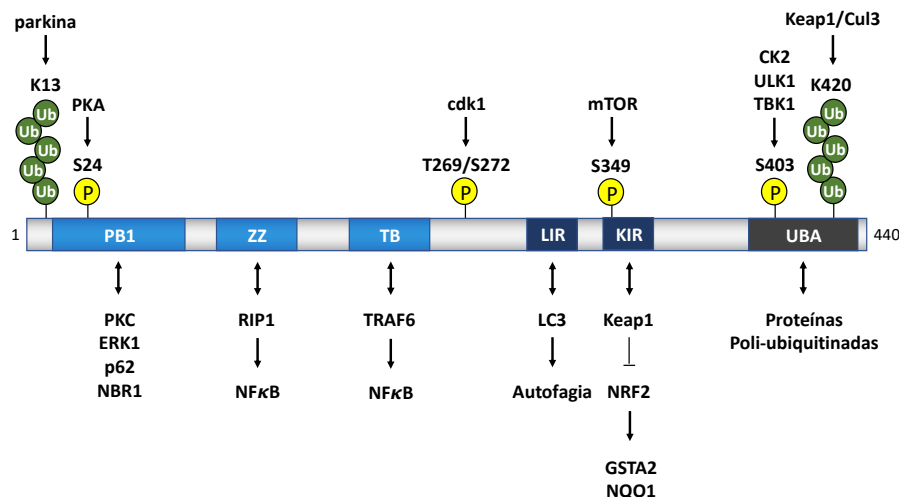


Figura 15. Estructura de SQSTM1/p62.

**Dominio N-terminal Phox/Bem1p (PB1).** Es un dominio de interacción proteína-proteína fundamental para la regulación de sus funciones. El dominio PB1 es crítico para la actividad de p62 [277]. A través de él, puede oligomerizar consigo misma. Esta interacción se produce entre el sitio básico Lys7 de un monómero y Asp69 del motivo OPCA de otro (ambos pertenecientes al dominio PB1) [278]. Además de p62, se han descrito otras proteínas como PKC $\zeta/\lambda$ , MEK5, NBR1, Par6, TFG, p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y MEKK2/3 que presentan dominios PB1 y pueden oligomerizar con ésta. PDE4A4 interacciona con p62 en el dominio PB1, lo que favorece la fosforilación en Ser24 de dicho dominio a través de la quinasa PKA. Esta fosforilación tiene como resultado la inhibición de estas uniones PB1-PB1 [279].

La interacción entre p62 y PKC a través de PB1 es fundamental para la activación de NF $\kappa$ B mediada por p62 [280]. En 1999, Sanz *et al.* demostraron que la interacción entre PKC y p62 favorecía la unión de RIP1 al motivo ZZ de p62, lo que fosforilaba a IKK, activando la vía de NF $\kappa$ B. Esta señalización puede ser inducida por TNF- $\alpha$  [281]. Adicionalmente, se ha demostrado que el tratamiento con TNF- $\alpha$  incrementa la interacción entre PKC $\zeta$  y p62. Dicha interacción es esencial para la fosforilación de JNK y la activación de caspasa-3 inducida por TNF- $\alpha$  [282].



En respuesta a la elevación en los niveles de aminoácidos, p62 contribuye a la activación de mTOR a través de TRAF6. Mecánicamente, todo empieza con la interacción entre los dominios PB1 de p62 y MEKK3. Esta unión activa a la cascada de señalización de MEK3/6 y p38 $\delta$  que fosforila a p62 en Thr269/Ser272. P62 fosforilado interactúa con TRAF6 que media la activación de mTOR por K63-poli-ubiquitinación, favoreciendo la proliferación e inhibiendo autofagia [283]. El complejo p62-MEKK3-TRAF6 también puede activar a la vía de NF $\kappa$ B [284].

La actividad de p62 también puede regularse por ubiquitinación del dominio PB1. NEDD4 interactúa con este dominio favoreciendo la poli-ubiquitinación K63, regulando positivamente su actividad como receptor de autofagia [285].

NBR1 también interactúa con p62 a través de PB1 [278]. Ambas proteínas presentan dominio LIR de interacción con LC3 y dominio UBA para el cargo de proteínas ubiquitinadas, de manera que ambas cooperan en procesos de autofagia selectiva [286].

***Dominio de interacción con LC3 (LIR).*** Como ya se ha mencionado brevemente, el dominio LIR es la región de p62 para la interacción con LC3, y por tanto, juega un papel esencial en autofagia selectiva, ya que hace de puente entre las proteínas captadas por los receptores de autofagia y la forma lipídica de LC3 en la cara interna del autofagosoma [287]. No es un dominio exclusivo de p62, otras proteínas como los receptores de autofagia (NBR1, NDP52, TAX1BP1, OPTN), receptores de mitofagia (FUNDC1, BNIP3, NIX, Atg32), receptores cvt (Atg19, Atg34) y algunos receptores especiales (Cbl, Stbd1) también presentan esta región [288, 289]. El término autofagia selectiva se refiere a la degradación específica de orgánulos (mitofagia, pexofagia), bacterias (xenofagia), ribosomas, macromoléculas o proteínas capturadas por los autofagosomas y degradadas posteriormente por la fusión de estos al lisosoma [289]. El dominio LIR fue identificado por Pankiv *et al.* cuando determinaron una región entre los aminoácidos 321 y 342 de p62 que interactuaba con LC3. Al mapear la región, los autores encontraron que la sustitución de los tres residuos de aspártico consecutivos (Asp335-Asp336-Asp337) por alanina reducía notablemente la interacción, por lo que propusieron un modelo de interacción electrostático entre esta secuencia de residuos ácidos y la superficie básica de LC3. Del mismo modo, la sustitución de Trp338 por alanina también disminuía notablemente la interacción, demostrando la importancia de dicho residuo. Por el contrario, la generación de mutantes no fosforilables en los residuos Ser332, Thr339 y Ser342 no mostraron ningún efecto sobre la unión. Sin embargo, los autores no mostraron estos resultados y no extendieron su estudio a la

generación de mutantes constitutivamente fosforilados, por lo que el estudio de la regulación post-transduccional vía fosforilación quedó incompleto [287]. Trabajos posteriores confirmaron que Leu341 también era necesaria para la interacción [290, 291]. De este modo, el motivo LIR presenta por convenio la secuencia D-D-D-W-X-X-L (siendo X cualquier aminoácido). La autofagia selectiva depende del dominio LIR. Sin embargo, este dominio por sí solo no une proteínas a la cara interna del autofagosoma, y la mayoría de las proteínas con este dominio no son por sí mismas sustrato de autofagia. La autofagia selectiva depende de la regulación y oligomerización del dominio PB1 [289]. A pesar de que la redundancia o colaboración entre distintos receptores de autofagia no está muy claramente estudiada, se sabe que p62 y NBR1 interaccionan a través de sus dominios PB1 [278, 292]. De este modo, se ha demostrado que, a pesar de que NBR1 es suficiente para inducir pexofagia, p62 puede colaborar incrementando la eficiencia del proceso [293].

***Dominio de interacción con Keap1 (KIR).*** A través de este dominio p62 interacciona con Keap1, activando la señalización mediada por Nrf2. Esta vía es la ruta más importante en la defensa celular contra el estrés oxidativo. En condiciones normales, Nrf2 es secuestrada en el citoplasma por su represor Keap1, favoreciendo la ubiquitinación y posterior degradación de esta ya de por sí inestable proteína ( $t_{1/2} \sim$  de 15 minutos), lo que mantiene inhibida la ruta. Por el contrario, en condiciones de estrés oxidativo, Nrf2 se separa de su represor, lo que permite su paso al núcleo, donde ejerce su acción transcripcional, favoreciendo la expresión de enzimas implicadas en la detoxificación como GSTA2 o NQO1 [294]. P62 compete con Nrf2 por Keap1, lo que libera a Nrf2. El motivo D-P-S-T-G-E y las argininas 380, 415 y 483 del dominio KIR de p62 son esenciales para esta unión. Dicha interacción promueve la degradación autofágica de Keap1 [265, 295]. Este mecanismo describe un claro ejemplo de regulación de autofagia selectiva, con la particularidad de en este caso no es necesario el dominio UBA para el secuestro de proteínas ubiquitinadas. El propio gen de p62 es regulado positivamente por Nrf2, lo que crea una retroalimentación de dicha señalización [265].

***Dominio de asociación a Ubiquitina (UBA).*** Situado en el extremo C-terminal, es el dominio encargado de reclutar proteínas ubiquitinadas para formar agregados citoplasmáticos [296]. Esta capacidad para secuestrar proteínas está mediada por el dominio UBA, pero requiere previamente de la oligomerización a través el dominio PB1 [277]. P62 puede dirigir estos agregados tanto al proteasoma como al lisosoma [287, 297]. Curiosamente, bajo condiciones de estrés por privación de nutrientes, p62 puede dirigir la degradación de la subunidad 26S del proteasoma por vía

autofágica [298]. Esto sugiere que, en determinadas condiciones, p62 juega un papel activo en la regulación de los mecanismos de degradación de la célula. A pesar de que se ha descrito que p62 puede reclutar tanto cadenas de poli-ubiquitina K48 como K63, Cabe *et al.* demostraron que una preferencialmente cadenas K63 [277].

El dominio UBA puede ser ubiquitinado en Lys420 por Keap1/Cull3, lo que aumenta la capacidad de p62 para secuestrar y degradar proteínas [299]. De este modo, la sustitución de Lys420 por arginina o la mutación de los sitios de unión Keap1-p62 reduce la capacidad de agregación de proteínas ubiquitinadas de forma similar a la delección del dominio UBA [299]. La agregación también se puede regular por fosforilación. Matsumoto *et al.* detectaron que la fosforilación de la Ser403 del dominio UBA colocalizaba con los agregados producidos por p62. A raíz de esto demostraron que dicha fosforilación estaba mediada por CK2 y que un mutante constitutivamente fosforilado en este residuo (S403E) favorecía el secuestro por p62 y la degradación vía autofagia de las proteínas ubiquitinadas [300].

Además de su acción secuestradora, el dominio UBA también media procesos de auto-dimerización. Ambas funciones son excluyentes, ya que la dimerización inhibe la unión de proteínas ubiquitinadas. Por el contrario, la dimerización favorece la activación de la señalización mediada por NFκB. Long *et al.* demostraron que las mutaciones en E409 y G410 desestabilizaban la dimerización, favoreciendo la agregación de proteínas ubiquitinadas y reduciendo la expresión de los genes dependientes de NFκB [301].

### **P62 y patología: su rol en cáncer**

La complejidad que le otorgan sus diferentes dominios funcionales unida a su alta capacidad de asociación a otras proteínas reguladoras, ha hecho que p62 haya sido asociada al desarrollo de diversos procesos patológicos.

Alteraciones en p62 han sido relacionadas con la enfermedad de Paget (PDB). Este síndrome consiste en una remodelación excesiva de los huesos y se caracteriza por la presencia exagerada del número y tamaño de osteoclastos hiper-nucleados (hasta 50 núcleos por célula). Esta morfogénesis descontrolada resulta en una formación ósea caótica y de mala calidad, con tendencia a la deformidad y propensión a la rotura. Aproximadamente el 30% de los casos de

PDB familiar están asociados a mutaciones en p62. En la actualidad se han descrito más de 30 mutaciones en esta proteína relacionadas con esta enfermedad [302].

P62 también ha sido relacionada con diversos desordenes metabólicos. De esta manera, ratones con adipocitos deficientes en p62 presentan fenotipos obesos y muestran una tasa metabólica disminuida y una termogénesis deficiente [303]. De forma similar, ratones p62 KO muestran obesidad y tasas metabólicas disminuidas, acompañadas de intolerancia a la insulina y alteraciones en el metabolismo de la glucosa [275].

El papel de p62 ha sido ampliamente descrito en enfermedades neurodegenerativas. Algunas de las mutaciones asociadas a PDB son identificadas también en esclerosis lateral amiotrófica (ELA) [304]. Análisis *post mortem* de pacientes con ELA muestran una acumulación excesiva de autofagosomas en tejidos. Algunas de las mutaciones identificadas se encuentran en el dominio LIR, lo que produce una disminución en el reconocimiento entre p62 y LC3, y como consecuencia una reducción del flujo autofágico [305]. La haplo-insuficiencia de TBK1 también ha sido relacionada con ELA [306]. Hasta la fecha se han descrito hasta 92 mutaciones distintas en TBK1. Esta quinasa fosforila a varios receptores de autofagia, como p62, OPTN y NDP52, incrementando su capacidad para interactuar con LC3 [307]. P62 también ha sido relacionada con la enfermedad de Huntington (HD). Esta enfermedad se debe a la mutación por introducción de tripletes de repetición de la proteína huntingtina (HTT). Esta proteína interactúa con p62 facilitando la unión con LC3 en el autofagosoma, lo que le otorga un papel importante en el correcto funcionamiento de procesos de autofagia selectiva. Además, HTT libera a ULK1 de la regulación negativa a la que le somete mTOR, lo que favorece la fosforilación del dominio UBA de p62 mediada por ULK1, promoviendo la autofagia [308]. En un contexto de HD el flujo autofágico no está alterado, pero si la capacidad de carga de los autofagosomas mediada por p62 [309]. Dado que la alteración en la fosforilación del dominio UBA juega un papel importante en los mecanismos que median esta enfermedad, Matsumoto *et al.* demostraron que la sobreexpresión de CK2 inducía la fosforilación en Ser403 del dominio UBA, lo que contribuye a eliminar la acumulación de HTT mutante [300]. P62 también puede intervenir en procesos relacionados con la enfermedad de Parkinson (PD). Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (SN) y el estriado (STR). P62 es sustrato de parkina, una E3 ubiquitin-ligasa cuya mutación favorece la aparición de PD. Ratones deficientes en parkina muestran elevados niveles de p62 en SN y STR, pero no en otras zonas del cerebro. Parkina ubiquitina a p62 en K13, lo que induce su degradación por la vía

proteasomal. Por el contrario, mutaciones en esta ubiquitin-ligasa favorecen la acumulación de agregados en estas zonas del cerebro, lo que explica la correlación negativa entre la actividad de parkina y los niveles de p62 [310].

El papel de p62 en cáncer es muy heterogéneo. A día de hoy han sido muchos los trabajos que relacionan a esta proteína con diversos tipos de tumores. Dada su complejidad, se han identificado funciones tanto pro- como anti-tumorales.

La acumulación de p62 como consecuencia de un ineficiente flujo autofágico ha sido relacionada con la progresión tumoral en cáncer de hígado. Takamura *et al.* generaron ratones que presentaban un defecto autofágico en el tejido hepático (*Atg7<sup>-/-</sup>*). Este defecto favorecía el desarrollo de tumores. Las células mostraron una gran acumulación de p62, unida a una mayor respuesta al estrés oxidativo y daño genómico. Además, encontraron una alta tasa de agregados en los que estaba presente p62. Los autores demostraron que el silenciamiento de p62 y NRF2 revertía el efecto pro-tumoral inducido por la inhibición de autofagia, lo que demostraba el papel oncogénico de p62 en la progresión de este tipo de tumores [311].

La alta expresión de p62 correlaciona con mal pronóstico en cáncer de mama. Xu *et al.* demostraron que los niveles de p62 son elevados en CSCs de estos tumores, favoreciendo su capacidad de auto-renovación. Los autores encontraron que el silenciamiento de p62 reducía la tasa de inicio de tumores y el crecimiento en modelos xenógrafos. A nivel de mecanismo encontraron que los niveles de p62 correlacionaban con los de Myc, factor de transcripción necesario para el mantenimiento de las características *stem* de estas CSCs. Finalmente, demostraron que p62 estabiliza post-transcripcionalmente a Myc y atenúa los niveles de let-7a y let-7b, microRNAs que regulan negativamente a Myc [259]. La alta expresión de p62 también correlaciona con mal pronóstico en otros modelos tumorales, como pulmón [261, 312] o próstata [260].

En los últimos años se ha demostrado la gran importancia del microambiente tumoral en relación a la agresividad de los tumores. Curiosamente, a diferencia de las células tumorales propiamente dichas, p62 parece tener un rol supresor de tumores en las células que rodean al tumor. Valencia *et al.* demostraron que la expresión de p62 en los fibroblastos adyacentes al tumor (CAF) de neoplasias de próstata se mostraba claramente disminuida. p62 es un inhibidor de la inflamación en el microambiente tumoral. A nivel funcional, la reducción de p62 en el estroma del tumor

favorece la producción de IL-6 y consecuentemente la síntesis de TGF- $\beta$ , promoviendo la progresión tumoral [313].

En GBM, p62 ha sido relacionada con migración e invasión. En células iniciadoras de GBM, la expresión de DRAM1 y p62 correlacionan con la expresión del marcador mesenquimal c-MET. Galavotti *et al.* encontraron que tanto p62 como DRAM1 regulaban el metabolismo energético en GSCs. En este sentido, el silenciamiento de p62 mostraba una disminución de los niveles de ATP y lactato del 50%. Adicionalmente, encontraron que la autofagia era inducida en GSCs implicadas en invasión. Funcionalmente, los autores demostraron que el silenciamiento de DRAM1 y p62 reducían la capacidad de migración de estas células iniciadoras [262].

En otras ocasiones, fosforilaciones en p62 pueden modificar la malignidad de un tumor. Linares *et al.* determinaron que cdk1 fosforila a p62 en Thr269 y Ser272 *in vitro* e *in vivo*. Estas fosforilaciones son necesarias para mantener niveles apropiados de ciclina B1, garantizando una regulación adecuada del ciclo celular. Por el contrario, la pérdida de estas fosforilaciones mediadas por cdk1 des-regula el control del ciclo celular, favoreciendo una salida rápida de mitosis, lo que incrementa la proliferación y tumorigénesis [314].

En cáncer de ovario, p62 ha sido relacionada con la resistencia al tratamiento con cisplatino. Cisplatino es uno de los quimioterapéuticos más empleados en terapias contra estos tumores. Sin embargo, la resistencia a estas terapias sigue lastrando la eficacia de este tipo de tratamientos. P62 está sobre-expresado en cáncer de ovario y dicha sobre-expresión correlaciona con la resistencia a cisplatino [315]. En 2017, Yan *et al.* descifraron el mecanismo de señalización que regula dicha resistencia. De acuerdo con este trabajo, RIP1 K63-poli-ubiquitinado interacciona con p62 en el dominio ZZ. Esto activa a la ruta de NF $\kappa$ B, lo que favorece la expresión de sus genes diana, promoviendo la supervivencia e inhibiendo la apoptosis inducida por el quimioterapéutico [316].

### **Papel de p62 en la regulación de apoptosis**

Como ya se ha mencionado con anterioridad, p62 activa la señalización mediada por NF $\kappa$ B, lo que favorece la expresión de genes anti-apoptóticos como IAPs, XIAP, cFLIP o Bcl-xL [22, 149]. Pero la regulación de la apoptosis a través de p62 no se reduce sólo a la señalización mediada por NF $\kappa$ B.

Shi *et al.* demostraron que p62 puede incrementar la resistencia a apoptosis a través de SKP2 [317]. SKP2 es un miembro de la familia F-box que regula procesos de degradación dependientes de ubiquitinación. Esta proteína está sobre-expresada en diferentes tumores y presenta un claro papel oncogénico [318]. Esta proteína favorece la proliferación, pero también ha sido relacionada con la resistencia a apoptosis a través de distintas vías de señalización [319, 320]. El trabajo de Shi *et al.* demostró que en condiciones de privación de suero, p62 interacciona con IKC1ota a través de su dominio PB1, lo que favorece la estabilización de SKP2, aumentando la resistencia a apoptosis [317].

Sin embargo, pese a la correlación ampliamente descrita entre expresión de p62 y malignidad del tumor, se ha definido que, tras la activación de la ruta extrínseca, p62 puede presentar un papel pro-apoptótico, ayudando a activar caspasa-8. Jin *et al.* demostraron que, tras el tratamiento con ligandos de muerte, Cull3 interacciona con el DISC y K63-poli-ubiquitina a caspasa-8 en el extremo C-terminal, lo que favorece el reconocimiento por p62, que también es detectada en el DISC. De acuerdo con los resultados obtenidos por los autores, p62 promueve la agregación de caspasa-8 ubiquitinada, lo que favorece la agregación y total activación de esta, contribuyendo positivamente a la inducción de la apoptosis. Por el contrario, el silenciamiento de p62 reducía notablemente los niveles de apoptosis. Experimentos de inmunofluorescencia mostraron una clara presencia de caspasa-8 en los agregados citoplasmáticos formados por p62 [164].

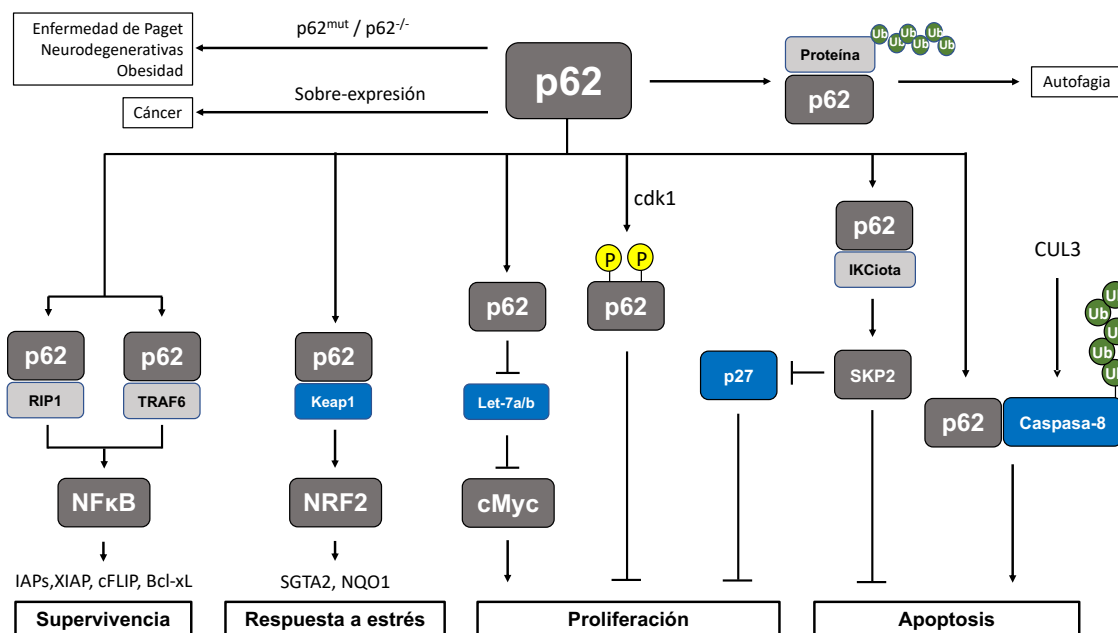


Figura 16. Señalización mediada por p62.

# OBJETIVOS

---





## Objetivos

El GBM es una enfermedad huérfana de tratamiento, ya que la terapia actual que se aplica a pacientes con esta enfermedad, consistente en una combinación de cirugía con radio- y quimioterapia, no ofrece al paciente una opción real de curación, sino más bien una terapia paliativa. Ante este escenario urge la necesidad de proponer nuevas alternativas para el tratamiento eficaz de estos tumores. Una alternativa interesante puede ser la terapia con el ligando de muerte TRAIL. Sin embargo, pese a las enormes ventajas que presenta esta alternativa terapéutica, las investigaciones preclínicas han mostrado una fuerte resistencia de las células de GBM a la apoptosis inducida por este ligando. Dado que no podemos obviar el enorme potencial que presenta este tipo de tratamiento, teniendo en cuenta su alta capacidad de inducir apoptosis y su escasa toxicidad en células no tumorales, la estrategia ahora consiste en buscar nuevas dianas terapéuticas que favorezcan la sensibilización de células de GBM a la muerte inducida por TRAIL.

El **objetivo general** de esta tesis es estudiar la sensibilización a TRAIL mediada por la inhibición de las proteínas Pim quinasas. Para lograrlo, el proyecto se plantea los siguientes **objetivos específicos**:

- Evaluar el efecto de la inhibición de Pim quinasas sobre la resistencia a la muerte inducida por TRAIL en distintos modelos de células de GBM (líneas celulares, células primarias y modelos de neuroesferas).
- Identificar el tipo de muerte celular que produce el tratamiento combinado (inhibición de Pim + TRAIL) sobre células de GBM.
- Estudiar la especificidad del efecto de la inhibición de las Pim quinasas sobre la sensibilización a la muerte mediada por TRAIL, inhibiendo genéticamente la acción de Pim mediante siRNAs.
- Evaluar la acción de la terapia combinada (inhibición de Pim quinasas + TRAIL) sobre la ruta extrínseca de apoptosis, que es la vía de señalización de TRAIL.
- Estudios ómicos (*arrays* y proteómica) para evaluar el efecto de la inhibición de Pim quinasas sobre las células de GBM e identificación de los mecanismos moleculares que median la sensibilización a TRAIL tras la inhibición de Pim quinasas.
- Estudio del impacto de la terapia combinada sobre otros modelos tumorales.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



# Materiales y Métodos

## Cultivo de células

Todas las células utilizadas para este estudio fueron proporcionadas y cultivadas según las especificaciones descritas a continuación.

***U87MG (ATCC HTB-14)***: Línea celular de GBM adquirida de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Cat. 89081402) a través del Servicio de Líneas Celulares de la Universidad de Granada. Fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (FBSi) y gentamicina (50µg/mL). Para el enriquecimiento en neuroesferas, las células fueron cultivadas en condiciones “*stemness*”: Medio DMEM-F12 sin FBS suplementado con N2 (Invitrogen), B27 (Invitrogen), G5 (Invitrogen), Anfotericina B (150µg/mL) (Gibco) y Penicilina-Estreptomicina

(1:1) (50µg/mL). Las neuroesferas U87MG se obtuvieron después de tres semanas de selección en medio “*stemmes*”.

**LN229 (ATCC CRL-2611):** Línea celular de GBM proporcionada por el Dr. Joan Seoane (Hospital Vall d’Hebron, Barcelona). Fueron cultivadas en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con un 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

**U118MG (ATCC HTB-15):** Línea celular de GBM proporcionada por el Dr. Guillermo Velasco (Universidad Complutense, Madrid). Las células se cultivaron en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con un 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

**SW-1783 (ATCC HTB-13):** Línea celular de astrocitoma grado III, proporcionada por el Dr. Guillermo Velasco (Universidad Complutense, Madrid). Fueron cultivadas en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con un 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

**Jurkat (ATCC TIB-152):** Línea celular de leucemia aguda, proporcionada por el Dra. Cristina Hernández (IPBLN, Granada). Fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con un 10% de FBSi, glutamina y gentamicina (50µg/mL).

**M504:** Células primarias de GBM, proporcionadas por el Dr. Víctor Yuste (Universidad Autónoma, Barcelona). Fueron cultivadas en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con un 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL) [85].

**HUVEC (ATCC GRL-1730):** células endoteliales de cordón umbilical humano, adquiridas comercialmente en Sigma-Aldrich (200-05N). Fueron cultivadas en medio de crecimiento endotelial 2 suplementado con BulletKit (CC-3202, LONZA) y gentamicina (50µg/mL).

**Astrocitos de ratón:** proporcionados por el Dra. Elena Gonzalez (IPBLN, Granada). Fueron cultivadas en medio DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con un 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

**G123:** Células primarias de GBM, proporcionadas por el Dr. José Luis Fernández Luna (Hospital Universitario Marqués de Valdecillas, Santander). Fueron cultivadas en condiciones “*stemmes*”:

Medio DMEM-F12 sin FBS suplementado con N2 (Invitrogen), B27 (Invitrogen), G5 (Invitrogen), Anfotericina B 150µg/mL (Gibco) y Penicilina-Estreptomocina (1:1) (50µg/mL).

**HeLa (ATCC CCL-2):** Línea celular de adenocarcinoma de cérvix proporcionada por la Dra. M. Carmen Ruiz (Universidad de Granada, Granada). Fueron cultivadas en DMEM bajo en glucosa (1000mg/L) suplementado con un 10% de FBSi, glutamina 2%, aminoácidos no esenciales (MEM) 1%, y gentamicina (50µg/mL).

**A549 (ATCC CCL-185):** Línea celular de cáncer de pulmón proporcionada por el Dr. Laszlo Virag (Universidad de Debrecen, Hungría). Fueron cultivadas en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con un 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

**G361 (ATCC CRL-1424):** Línea celular de melanoma cutáneo adquirida de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Cat. 88030401) a través del Servicio de Líneas Celulares de la Universidad de Granada. Fueron cultivadas en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

**293T (ATCC CRL-3216):** Línea celular de riñón embrionario proporcionada por el Dr. Carles Suñé (IPBLN, Granada). Fueron cultivadas en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

**HEPG2 (ATCC HB-8065):** Línea celular de cáncer de hígado adquirida de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Cat. 85011430) a través del Servicio de Líneas Celulares de la Universidad de Granada. Fueron cultivadas en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

**MCF7 (ATCC HTB-22):** Línea celular de cáncer de mama adquirida de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Cat. 86012803) a través del Servicio de Líneas Celulares de la Universidad de Granada. Fueron cultivadas en Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) suplementado con 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).



**MUM2B:** Línea celular de melanoma uveal proporcionada por el Dr. Juan Carlos Rodríguez Manzanque (GENyO, Granada). Fueron cultivadas en RPMI suplementado con 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

**PANCI (ATCC CRL-1469):** Línea celular de cáncer de páncreas adquirida de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Cat. 87092802) a través del Servicio de Líneas Celulares de la Universidad de Granada. Fueron cultivadas en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) suplementado con 10% de FBSi y gentamicina (50µg/mL).

Las células se cultivaron a 37°C en un incubador humidificado al 5% de CO<sub>2</sub>. Para crear condiciones de hipoxia, las células U87MG fueron incubadas en cámara de hipoxia (*in vivo*<sub>2</sub> 200, Ruskinn) con un 1% de oxígeno.

Las células fueron almacenadas por crio-preservación en nitrógeno líquido, usando medio de congelación: DMEM 69%, FBSi 20%, DMSO 10%, Glutamina 1%. Todas las líneas celulares fueron analizadas periódicamente mediante PCR para descartar contaminación por micoplasma. Las secuencias de los primers utilizadas para la detección fueron:

- *Sense:* 5'-GATGTCAAGAGTGGGTAAGGTT-3'
- *Antisense:* 5'-GATGTTTAGCCGGGTCGAGAG-3'

Sintetizadas por Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

## Inhibidores

Los inhibidores químicos usados para este estudio se resumen en la siguiente tabla:

Nombre	Diana	Almacenar	Concentración	Empresa	Referencia
PJ34	PARPs	-20°C	10-20µM	Alexis Biochemicals	ALX-270-289
Olaparib	PARP-1/2	-20°C	5µM	Selleckchem	S1060
SGI-1776	Pim quinasas	-20°C	5-6µM	Selleckchem	S2198
Q-VD-POh	Caspasas	-20°C	10-20µM	R&D Systems	13482356

Tabla 8. Inhibidores

## Obtención de TRAIL recombinante y TRAIL biotinilado

El TRAIL recombinante, así como el TRAIL recombinante biotinilado (TRAIL<sub>BIO</sub>), fueron producidos a partir de una construcción amablemente cedida por la Dra. Marion MacFarlane (MCR Toxicology Unit, University of Leicester, UK) que codifica para TRAIL recombinante (aminoácidos 95-281) insertada en BamHI/XhoI del vector pET-28b (+) con resistencia a kanamicina y una cola de seis histidinas para facilitar la purificación de la proteína recombinante. Para su obtención, se llevó a cabo en nuestro laboratorio el protocolo descrito por Harper *et al.* [321]:

1. Se transforman bacterias BL21 con 1-2 µg de ADN por choque térmico y se crecen en medio LB (Luria-Bertani), con 20mM de glucosa y 30µg/ml de kanamicina. Cuando el precultivo alcanza la densidad óptica de 0.6-0.8 a la longitud de onda de 600nm se induce la síntesis de la proteína recombinante añadiendo al cultivo 0.5µM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido).
2. Tras tres horas de inducción a temperatura ambiente, las bacterias se recogen por centrifugación y se lisan, tras un lavado con PBS 1X, en un tampón de lisis que contiene 30mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150mM de NaCl, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas.
3. Este lisado se incuba en un rotor circular durante 16 horas a 4°C, en una columna de sefrosa quelada con Níquel (Quelatin Sepharose Fast Flow; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suiza), a la que el TRAIL quedará unido por la cola de histidinas.
4. Transcurrido este tiempo, se lava la columna seis veces con PBS frío antes de eluir el TRAIL con una solución 100mM de EDTA en PBS. Las fracciones más purificadas se titulan en actividad realizando un ensayo de apoptosis en células HeLa, sensibles a TRAIL y se almacenan a -80°C.

En el caso del TRAIL biotinilado, antes de eluir la proteína de la columna, se incuba con 50 µg/ml de reactivo de biotinilización (Ácido D-biotil-e-aminocaproico N-Hidroxisuccinimida éster; Roche) durante 1 hora a 4°C, tras lo cual, se eluye con una solución 150mM de EDTA en PBS.

## Silenciamiento con siRNA

Los silenciamientos de genes se llevaron a cabo por transfección de siRNA utilizando el reactivo comercial jetPRIME (Polyplus), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante del producto:

1. Se siembran células en medio de crecimiento 24 horas antes de la transfección.
2. Se mezclan *buffer*, siRNA y jetPRIME según las instrucciones de la tabla de conversión proporcionada por el fabricante: siRNA a una concentración de 50nM, en 200µL de *buffer* y 4µL de jetPRIME. Se incuba la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Se cambia el medio de crecimiento y se añade la mezcla de transfección gota a gota. Se incuba durante 24 h.
4. Se sustituye el medio de transfección por nuevo medio de crecimiento y se incuba durante 24 horas.

Los siRNAs usados en esta tesis se detallan en la siguiente tabla:

Gen	Secuencia
Scrambled (Control)	5'- CCUACAUCCCGAUCGAUGAUG[dT][dT]-3'
PIM2#a	5'- GUGGAGUUGUCCAUCGUGACA[dT][dT]-3'
PIM2#b	5'- ACCUUCUCCCGACCCUCA[dT][dT]-3'
PIM3#a	5'- GGCGUGCUUCUCUACGAUA[dT][dT]-3'
PIM3#b	5'- GCACGUGGUGAAGGAGCGG[dT][dT]-3'
TRAIL-R1/DR4	5'- GGAACUUCCGGAAUGAC[dT][dT]-3'
TRAIL-R2/DR5	5'- GACCCUUGUGCUCGUUGUC[dT][dT]-3'
TRAIL-R2/DR5#b	5'- GACCCUUGUGCUCGUUGUC[dT][dT]-3'
p62/SQSTM1	5'- GCAUUGAAGUUGAUUAUCGA[dT][dT]-3'

Tabla 9. Secuencias de siRNA

Todas los siRNAs fueron sintetizadas por Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

## Determinación del porcentaje de apoptosis

El porcentaje de apoptosis se cuantificó mediante la contabilización de células hipo-diploides (eventos en SubG1) [322]. Para el marcaje de células utilizamos el protocolo detallado a continuación:

1. Se siembran células en placa de 6 pocillos a una densidad de  $1.5 \times 10^5$  por condición.
2. Después de los tratamientos correspondientes, se despegan las células con tripsina y se lavan con PBS frío.
3. Se fijan con etanol frío de 70% durante 10 minutos a 4°C y se lavan con PBS frío.
4. Se incuban con solución de extracción de ADN (4% de ácido cítrico 0,1M en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M a pH 7,8) para la extracción de fragmentos de ADN no genómico, durante 10 minutos a 37°C.
5. Se marcan las células con yoduro de propidio (40µg/mL) suplementado con ribonucleasa A (100µg/mL) (Sigma) en oscuridad durante 30 minutos a 37°C.

Las células hipo-diploides fueron identificadas por citometría de flujo (FACSCalibur), utilizando los softwares Cell Quest (Becton Dickinson) para la adquisición y FlowJO7.6.3 para el análisis (Tree Star).

## Western blot y anticuerpos

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e identificadas por inmuno-detección como se detalla en el siguiente protocolo:

1. Lisis celular: después del tratamiento las células se lavan con PBS frío y se lisan con raspador (*scraper*) en 60-100µL de buffer de lisis TR3 (3% SDS, 10% glicerol, 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro). La lisis se completa mediante sonicación.
2. Cuantificación proteica: se determina la concentración de proteínas con *DC Protein Assay* (BioRad) para la posterior corrección de volumen.
3. Reducción de muestra y desnaturalización: se añade *buffer* de carga 5X (250mM de Tris-HCl pH 7,5, SDS 10%, Glicerol 20%, 1,4M Mercaptoetanol, azul de bromofenol 1%) y se hierven las muestras durante 5 minutos a 95°C.

4. Electroforesis y transferencia: se separan la muestra por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfiere a membranas de PVDF (Amersham) por el método semi-seco en Trans-Blot Turbo (BioRad). A veces se precisa del método de transferencia húmeda para proteínas de alto peso molecular.
5. Inmuno-detección proteica: se bloquea la membrana con leche desnatada en polvo 5% en PBS-Tween 1% durante una hora antes del inmuno-marcaje. Se incuba O/N a 4°C con un anticuerpo primario específico y 90 minutos con el anticuerpo secundario *Horserradish Peroxidase* (HRP). Las proteínas son visualizadas por quimioluminiscencia con ECL (Millipore) en películas de rayos X medicinales (Konica Minolta).

Los anticuerpos usados para esta tesis se resumen en la siguiente tabla:

Nombre	Target	Huésped	Dosis	Firma
PARP-1 (C210) mAb	PARP-1	Ratón	1:1000	Enzo
GSK3 $\beta$ (3D10) Mouse mAb	GSK3 $\beta$	Ratón	1:1000	Cell Signaling
Phospho-GSK-3-beta (Ser9) (D3A4)	P-GSK3 $\beta$ (Ser9)	Conejo	1:1000	Cell Signaling
Caspase-8 (1C12) mAb	ProC8+p43+p18	Ratón	1:1000	Cell Signaling
Cleaved Caspase-8 (Asp391) (18C8) mAb	p43+p18 (C8)	Conejo	1:1000	Cell Signaling
Caspase-3 polyclonal antibody	ProC3+p19+p17	Conejo	1:1000	Enzo
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	p19+p17 (C3)	Conejo	1:1000	Cell Signaling
cFlip (NF6) mAb	cFlipL/S+p45	Ratón	1:1000	AdipoGen
PEA-15 (H-3)	PEA-15	Ratón	1:1000	Santa Cruz
Human TRAIL R1/TNFRSF10A Antibody	TRAILR1/DR4	Cabra	1:1000	R&D Systems
DR5 Antibody	TRAILR2/DR5	Conejo	1:1000	Cell Signaling
Serum Rabbit Anti-Bcl-XL	Bcl-xL	Conejo	1:1000	BD Biosciences
Purified Mouse Anti-Human FADD	FADD	Ratón	1:1000	BD Biosciences
SQSTM1/p62 Antibody	p62	Conejo	1:1000	Cell Signaling
Pim-2 (F-11)	Pim2	Ratón	1:100	Santa Cruz
Pim-3 (D17C9) mAb	Pim3	Conejo	1:1000	Cell Signaling
Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin antibody	$\alpha$ -Tubulina	Ratón	1:10000	Sigma
$\beta$ -Actin clone AC-74	$\beta$ -Actina	Ratón	1:10000	Sigma
GAPDH (0411)	GAPDH	Ratón	1:10000	Santa Cruz
Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	IgG de conejo	Cabra	1:10000	Dako
Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	IgG de ratón	Cabra	1:10000	Dako
Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	IgG de cabra	Conejo	1:10000	Dako

Tabla 10. Anticuerpos

## RT-PCR

Para determinar el perfil de expresión de PIM quinasas extrajimos el ARN de las células y tras la amplificación por RT-PCR identificamos las bandas en un gel de agarosa. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se siembran  $5 \times 10^5$  células en una placa p60.
2. Se extraen ARN con RNAeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se eluye el ARN en  $30 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril.
3. Se eliminan posibles restos de ADN genómico con DNAsa I/RNAsin (Invitrogen).
4. Se cuantifican con Nanodrop para corregir volúmenes.
5. Se retro-transcribe  $1 \mu\text{g}$  de ARN a cDNA con iScriptcDNA Synthesis Kit (BioRad)
6. Se amplifican por PCR usando Q5 <sup>®</sup> Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (M0494S, New England Biolabs) en el termociclador CFX96 real-time PCR detection systems.
7. Se resuelve el producto de amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 2%, añadiendo Gel Red Nucleic Acid Stain (BIOTUM) 1:30000, para posteriormente identificar las bandas en Gel Doc EZ Imager (BioRad).

Los *primers* utilizados para las amplificaciones fueron:

Gen	Secuencia
36B4 Sense (Control)	5'- CAGATTGGCTACCCAAGTGT -3'
36B4 Antisense (Control)	5'- GGCCAGGACTCGTTTGTACC -3'
PIM1 Sense	5'- CAGAGTGGATCCGCTACCAT -3'
PIM1 Antisense	5'- TGGATTCTTCGAAGGTTGG -3'
PIM2 Sense	5'- TGGGCATCCTCCTCTATGAC -3'
PIM2 Antisense	5'- GTACTACCTCGGCTGGTGTT -3'
PIM3 Sense	5'- AAGCTCATCGACTTCGGTTC -3'
PIM3 Antisense	5'- AGGATCTCCTCGTCCTGCTC -3'

Tabla 11. Secuencia de *primers*

Todas los *primers* fueron sintetizadas por Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

## Ensayo de Clonogenicidad

Los ensayos de clonogenicidad se emplearon para determinar el efecto a largo plazo de los tratamientos empleados. Se llevaron a cabo de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se siembran 500 células por condición en placas de 12 pocillos.
2. Se tratan las células durante 48 horas y después se cultivan en medio fresco durante dos semanas.
3. Se fijan y se tiñen las colonias con 0,5% de cristal violeta en metanol/agua (1:1). Se aclara el exceso con agua del grifo.
4. Para la cuantificación de los ensayos disolver las colonias con isopropanol/agua (1:1) O/N a 37°C. Medir la Absorbancia a 580nm.

## Ensayo de formación de neuroesferas

Para el ensayo de formación de neuroesferas se utilizó tanto un cultivo enriquecido en neuroesferas de U87MG como un cultivo de células primarias (G123) cultivadas desde su obtención en medio *stemness*. Para el recuento de neuroesferas se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se disgregan el cultivo en suspensión de neuroesferas.
2. Se siembran 150000 células por pocillo y se añaden tratamiento e incuban 48 horas.

Después de 48 horas, la habilidad de formar neuroesferas fue comprobada recontando el número de neuroesferas por contaje ciego de 10 campos para cada condición experimental. El resultado mostrado es la media del recuento de estos diez campos.

## Sobre-expresión de Bcl-xL

La sobre-expresión ectópica de Bcl-xL se llevó a cabo mediante vectores retrovirales. Los plásmidos pBcl-xL y pBABE (control) fueron proporcionados por Dra. Cristina Muñoz (IDIBELL, Barcelona, España). El protocolo tiene dos fases: transfección del sistema de

plásmidos (VSV/PV-PACK) en células hospedadoras para la generación de las partículas víricas; e infección de las células de interés para generar la sobre-expresión.

Para la generación de las partículas víricas se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se siembran  $11 \times 10^6$  de células 293T por condición (pBcl-xL, p-BABE y control negativo) e incuban O/N.
2. Cuando los cultivos alcanzan el 80% de confluencia, se sustituye el medio por DMEM fresco filtrado dos horas antes de la transfección.
3. Se prepara la mezcla de transfección e incuba 15 minutos a temperatura ambiente:
  - 22,5µg de pBABE/pBcl-xL
  - 7,9µg de VSV
  - 14,6µg de PV-PACK
  - 600µL de TE
  - 350µL H<sub>2</sub>O tamponada.
  - 113µL de CaCl<sub>2</sub> 2,5M
  - 1140µL de HeBS
4. Se añade la mezcla gota a gota e incuba O/N a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en sala de cultivos P2.
5. Se retira el medio de transfección e incubar 48 horas.

Para la infección de las células de interés se realizó el siguiente protocolo:

1. Se siembran  $3 \times 10^5$  células U87MG por placa p100 e incuban 24 horas.
2. Se recoge el sobrenadante de las células 293T infectadas tras 48 horas desde la transfección. Se centrifuga a 1500rpm, 5 minutos y se filtra el sobrenadante.
3. Se sustituye el medio de las U87MG por 4ml de medio de las células infectadas suplementado con 4µL de Polybrene (8µg/ml). Se incuban 6 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en sala de cultivos P2.
4. Se sustituye el medio de infección por medio fresco y se incuba 48 horas.
5. Se selecciona con puromicina (1,5µg/ml) durante 48-72 horas y se confirma que las células no transfectadas mueren al 100%.



## Medida de la internalización del receptor de TRAIL DR5 por citometría de flujo

Para determinar la internalización de los receptores de TRAIL marcamos los receptores en membrana con un anticuerpo conjugado con ficoeritrina y cuantificamos por citometría de flujo siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se siembran  $1,5 \times 10^5$  células en placas de 6 pocillos y tras 24 horas se aplican los tratamientos correspondientes.
2. Se lavan tres veces con PBS frío.
3. Se elimina TRAIL en superficie con tres lavados ácidos (DMEM alto en glucosa, 0.2% BSA, pH 3.5 con HCl), durante 5 minutos a 4°C.
4. Se lavan tres veces con PBS frío.
5. Se despegan las células con Tripsina y se re-suspenden en medio de crecimiento durante 15 minutos a 37°C.
6. Se lavan tres veces con PBS frío.
7. Se resuspenden en 100µL de PBS frío con 5µg/mL de anti-DR5-PE y IgG-PE (isotipo control) durante 30 minutos en oscuridad a 4°C.

TRAIL-R2/DR5 fue cuantificado por citometría de flujo (FACSCalibur), utilizando el *software* de Cell Quest (Becton Dickinson) para la adquisición y FlowJO7.6.3 para el análisis (Tree Star).

## Ensayo de aislamiento del DISC

Para analizar la formación del DISC las células fueron tratadas con TRAIL conjugado con biotina y tras la lisis los complejos fueron aislados con bolas de estreptavidina siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se siembran  $2,5 \times 10^6$  células por placa p150. Tras 48 horas de transfección las células alcanzan el 90-100% de confluencia.
2. Se trata con TRAIL<sub>BIO</sub> 1µg/mL y se incuba 37°C y 5%CO<sub>2</sub> durante 90 minutos.
3. Parar la incubación en hielo, se retira el medio y se lavan tres veces con PBS frío.
4. Se extraen las proteínas con buffer de lisis (30mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 0.1% de desoxicolato sódico suplementado con inhibidores

- de proteasas e inhibidores de fosfatasa) durante 30 minutos en hielo con agitación suave cada 10 minutos.
5. Se centrifuga durante 30 minutos a 13000rpm y 4°C. Se descarta el precipitado de restos celulares.
  6. Se cuantifican proteínas, igualan volúmenes y se aparta el *INPUT*.
  7. Se incuba O/N con bolas de estreptavidina previamente estabilizadas como se indica en el prospecto facilitado por el fabricante.
  8. Se descarta el sobrenadante y se lava las bolas 6 veces con buffer de lisis.
  9. Se re-suspenden las bolas en el mismo volumen de buffer de carga 2X (ver protocolo de western blot) y se calienta 5 minutos a 95°C agitando a 1200rpm en termo-bloque.

Para determinar los componentes del DISC seguimos el protocolo de western blot previamente descrito.

### **Array de expresión de genes relacionados con apoptosis**

Para determinar posibles cambios transcripcionales en genes relacionados con apoptosis medimos su expresión con el *array* RT<sub>2</sub>ProfilerPCR para apoptosis (PAHS-012Z, Qiagen) siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se siembran  $5 \times 10^5$  células en una placa p60.
2. Se aplican los distintos tratamientos.
3. Se extrae ARN con RNAeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se eluye en 30µL de H<sub>2</sub>O estéril.
4. Se eliminan posibles restos de ADN genómico con DNAsa I/RNAsin (Invitrogen)
5. Se cuantifican con Nanodrop para corregir volúmenes
6. Se lleva a cabo la retro-transcribir de 2µg de ARN a cDNA con RT2 First Strand kit (Qiagen) para un volumen de reacción de 20µL. Una vez realizada la reacción en el termociclador, se diluye el producto de dicha reacción en agua estéril para tener 100µL de producto final. Se emplea todo el volumen para preparar la mix de PCR.
7. Se prepara la mezcla de PCR: cDNA + RT2 SYBR Green Mastermix + Agua estéril. Tras agitar y se carga el *array*.

8. Se amplifica por PCR en el termociclador CFX96 real-time PCR detection systems programando como se recomienda en las instrucciones indicadas en el protocolo comercial del *array*.
9. Se normaliza y analiza con la herramienta online suministrada por la web de Qiagen.

### Detección de fosfoproteínas por espectrometría en masas (MS-MS)

Para definir la firma de fosforilación de las células U87MG se desarrolló el siguiente procedimiento experimental:

1. Se siembran  $2,5 \times 10^6$  células por placa p100.
2. Se transfecta con jetPRIME el siRNA correspondiente.
3. Se lisa en 300  $\mu$ L de buffer de extracción GST-FISH (NP40 1:100, Glicerol 1:10 en Tris-HCl 10mM con NaCl 5mM, suplementado con inhibidores de proteasas y de fosfatasa) durante 30 minutos en hielo con agitación suave cada 10 minutos.
4. Se centrifuga a 13000rpm 30 minutos a 4°C y se descarta el precipitado de restos celulares.
5. Se cuantifican proteínas con *DC Protein Assay* (BioRad) para la posterior corrección de volumen.

En el servicio de proteómica de Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), en colaboración con el Dr. Ignacio Casal, se procesaron las muestras de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se precipitan 300  $\mu$ g de proteínas con acetona y se re-suspende el precipitado en urea 8M/bicarbonato amónico 50mM.
2. Tras reducción y alquilación, se digiere con Tripsina y se desala con *Clean-Up*.
3. Se enriquece en péptidos fosforilados mediante cromatografía de afinidad en columnas de  $\text{TiO}_2$ .
4. Se analizan las muestras por nano-LC-MS en fracciones de 1/6. Se separan en gradiente de 180 minutos (60 min de 0-21% de Buffer B; 100 min 21%-35% Buffer B; 10 min 95% Buffer B y 10 min 0% Buffer B, (Buffer A: 0,1% ácido fórmico, 2% acetonitrilo; Buffer B: 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo) con flujo de 250nL/min en nano Easy-nLC 1000 (Proxeon) acoplado a una fuente iónica con nano-electrospray (Thermo Scientific).

5. Se adquiere en espectrómetro de masas LTQ–Orbitrap Velos (ThermoScientific) trabajando en modo positivo. Los espectros de masas correspondientes al barrido completo ( $m/z$  400-1.500) se obtienen con una resolución de 30.000 y se seleccionan los 15 iones más intensos de cada barrido para su fragmentación mediante disociación inducida por colisión (CID) en la trampa iónica, con la energía de colisión normalizada al 35%. Los iones con carga única o sin asignación de carga se desechan. Se lleva a cabo una exclusión dinámica con una duración de 30 segundos.
6. Se enfrentan los archivos de espectros (.raw) a la base de datos uniprot-human (42117 secuencias) usando el motor de búsqueda Sequest a través de Proteome Discoverer (versión 1.4.0.288, Thermo Scientific). En los parámetros de búsqueda, se establece como modificación fija la carbamidometilación de cisteínas. Modificaciones dinámicas: acetilación N-Terminal, oxidación C-Terminal y fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas. La tolerancia de la selección de los precursores y los iones producto se fijó en 10ppm y 0,6Da, respectivamente. Emplear el nodo 3 phosphoRS como algoritmo de *scoring*: evalúa la confianza en la localización de los sitios de fosforilación). Validar la identificación de los péptidos mediante el algoritmo Percolator usando un valor  $q \leq 0,01$  [323].

Consideramos proteínas diferencialmente fosforiladas aquellas que presentaban una variación de detección de 1.6 veces. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional de la lista de proteínas diferencialmente fosforiladas mediante aplicación AmiGO de las de la web de Gene Ontology.

En segundo lugar, para identificar posibles interacciones entre las proteínas identificadas y los componentes del DISC se realizó un doble análisis de acuerdo al flujo de trabajo descrito a continuación:

1. Se compara la lista de proteínas diferencialmente fosforiladas con la lista de proteínas que interaccionan con TRAIL-R2, FADD y caspasa-8 anotadas en la base de datos BioGrid.
2. Para definir el modelo de interacción se analiza la lista resultante, incluyendo la proteína de interés (TRAIL-R2, FADD o caspasa-8) en la base de datos STRING.

## Co-inmunoprecipitación

Para confirmar la interacción entre las proteínas identificadas por MS-MS y el DISC utilizamos ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se siembran  $1,5 \times 10^6$  células por placa p100 incluyendo un pocillo para el control negativo de inmuno-precipitación (IgG no relacionada).
2. Tratamientos.
3. Se extraen proteínas con GST-FISH (NP40 1:100, Glicerol 1:10 en Tris-HCl 10mM con NaCl 5mM, suplementado con inhibidores de proteasas y de fosfatasas). Se lisan durante 30 minutos en hielo con agitación cada 10 minutos. Se centrifugan a 13000rpm, 30 minutos, 4°C y se descarta el precipitado.
4. Se Cuantifican proteínas y se toma 1mg de proteína corrigiendo errores de volumen entre muestras.
5. Se incuba con el anticuerpo de captura O/N a 4°C en agitación por rotación.
6. Se captura el anticuerpo con bolas magnéticas de proteína G estreptavidina Dynabeads (Invitrogen) durante 6 horas a 4°C en agitación por rotación.
7. Se lava 6 veces el precipitado en gradilla magnética con *buffer* GST-FISH.
8. Se re-suspenden las bolas en buffer de carga 2X y se hierven durante 5 minutos para desnaturalizar las muestras.

Las proteínas de interés fueron identificadas por western blot utilizando TrueBlot ULTRA secondary antibody (Tebu-bio) para evitar señal inespecífica de IgG.

## Mutagenesis dirigida

Para mutar la Ser332 de p62 utilizamos el plásmido HA-p62/SQSTM1 (Plasmid#28027, Addgene) siguiendo directrices del protocolo comercial Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (E0554S, New England BioLabs):

1. Se amplifica el plásmido por PCR usando Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (M0494S, New England BioLabs). El diseño de *primers* se lleva a cabo mediante el *software* NEBaseChanger y son suministrados por Sigma-Aldrich:

- Sense: 5'-GGATAACTGTGAAGGAGGAGATG-3'
  - Antisense: 5'-GACTCCATCTGTTCCTCAG-3'
2. Se re-circulariza el plásmido mediante la reacción KLD (M0554S, New England BioLabs) de acuerdo a las instrucciones suministradas por el fabricante.
  3. Se transforman bacterias con el plásmido mutante, se crecen y se aísla por maxiprep.

El plásmido se transfectó utilizando el doble de volumen de reactivo jetPRIME que de ADN.

### **Análisis estadístico**

El coeficiente de interacción entre drogas (CDI) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula matemática:

$$CDI = AB / (A \times B)$$

Donde A es el efecto de TRAIL, B el efecto de la inhibición de Pim quinasa y AB el efecto del tratamiento combinado. Si el valor obtenido es mayor que 1 existe sinergia entre ambas drogas.

Los resultados mostrados son la media y el error estándar ( $\pm$ SEM) de tres experimentos independientes. La significación estadística fue determinada por test *t* de Student o ANOVA, considerando significativos valores de *p* por debajo de 0,05 (\*= $<0.05$ ; \*\*= $<0.01$ ; \*\*\*= $<0.001$ ).



# RESULTADOS

---



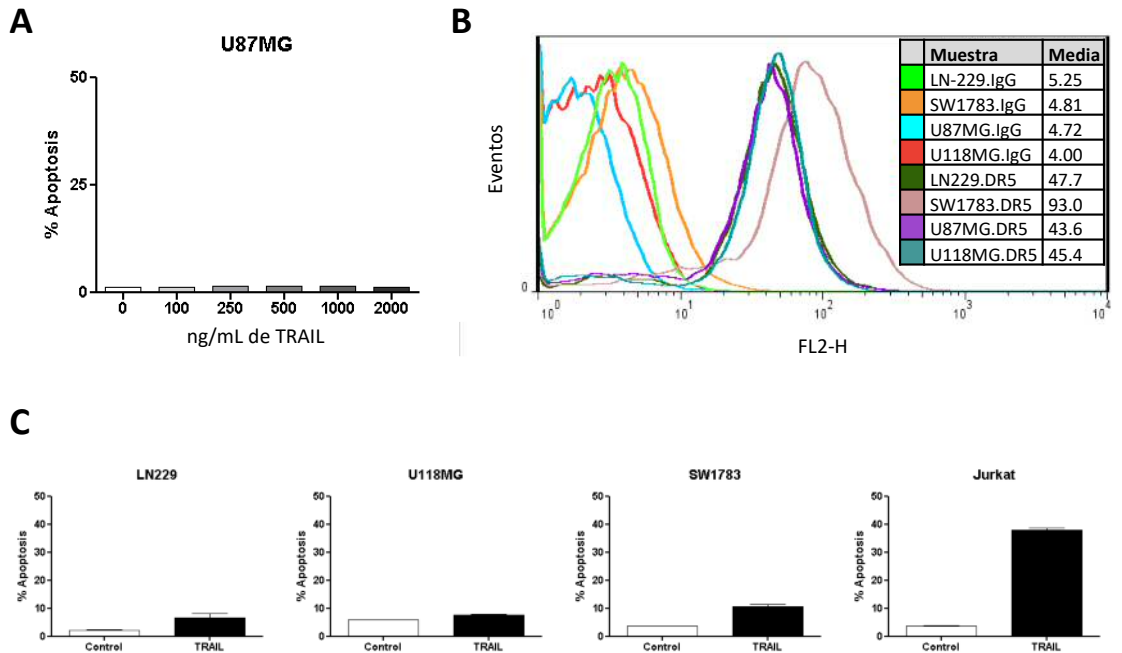


## Resultados

### Las células de GBM son resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL

Antes de comenzar a abordar los objetivos centrales de la Tesis decidimos estudiar la respuesta a TRAIL en las distintas líneas celulares que posteriormente se iban a emplear en el estudio. Para clarificar este punto, llevamos a cabo una dosis-respuesta tratando la línea celular U87MG con dosis comprendidas entre 100 y 2000ng/ml de TRAIL y medimos muerte celular por citometría de flujo (SubG1). 500ng/ml está considerada como dosis saturante [324], de modo que nuestros resultados muestran que la línea celular U87MG es totalmente resistente al tratamiento con el ligando de muerte (**Figura 17A**). Comparando la expresión en membrana de receptores por citometría de flujo, medimos unos niveles similares de TRAIL-R2/DR5 entre las tres líneas de GBM testadas (U87MG, LN-229 y U118MG). Sin embargo, SW1783, una línea celular de astrocitoma grado III, mostró el doble de receptores (**Figura 17B**). Al determinar apoptosis en todas las líneas se confirmó la fuerte resistencia que presentan las células de GBM a la muerte

inducida por TRAIL. Curiosamente, las células de astrocitoma grado III presentaron ligeros niveles de apoptosis. Por el contrario, las células de leucemia linfocítica aguda Jurkat, sensibles a TRAIL, fueron utilizadas como control positivo y presentaban altos niveles de apoptosis (**Figura 17C**).

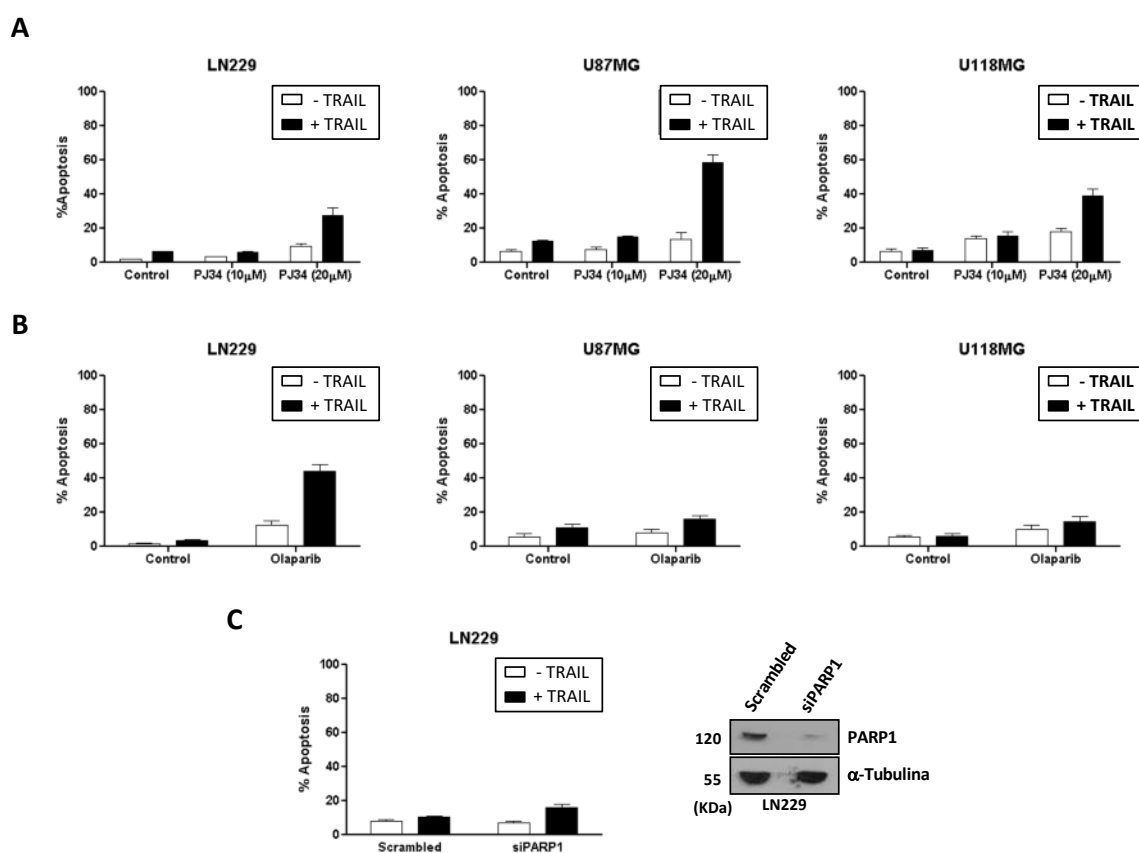


**Figura 17. Las células de GBM son resistentes a la muerte inducida por TRAIL.** (A) Células U87MG fueron tratadas 48 horas con dosis crecientes de TRAIL, de 100 a 2000ng/mL. La apoptosis fue medida por citometría de flujo (SubG1). (B) Medida de TRAIL-R2/DR5 en membrana por citometría de flujo. (C) Medida de apoptosis (SubG1) en dos líneas celulares de GBM (LN229 y U118MG) y en una línea de astrocitoma grado III (SW1783) tras 48 horas de tratamiento con TRAIL 500ng/mL. Las células Jurkat fueron tratadas con 100ng/mL de TRAIL en paralelo como control positivo de muerte.

### Altas dosis del inhibidor de PARP PJ34 sensibilizan a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL a través de un mecanismo independiente de PARP

En nuestro laboratorio estamos interesados en la capacidad de los inhibidores de PARP como terapia anti-tumoral [325-327]. Siguiendo este propósito, investigamos la capacidad de los inhibidores de PARP para sensibilizar a las células de GBM a la apoptosis inducida por TRAIL. Para ello testamos diferentes dosis del inhibidor de PARP PJ34 en combinación con TRAIL en tres líneas celulares de GBM (LN229, U87MG y U118MG). El inhibidor de PARP solo sensibilizó al ligando de muerte a altas dosis (20 $\mu$ M) (**Figura 18A**). Este hecho nos indujo a repetir los experimentos con otro inhibidor. Olaparib es un inhibidor de PARP aprobado por la FDA y empleado actualmente en clínica para el tratamiento de tumores de mama y ovario que presentan mutaciones BRCA1 y 2 [328, 329]. A diferencia del PJ34, Olaparib solo mostró

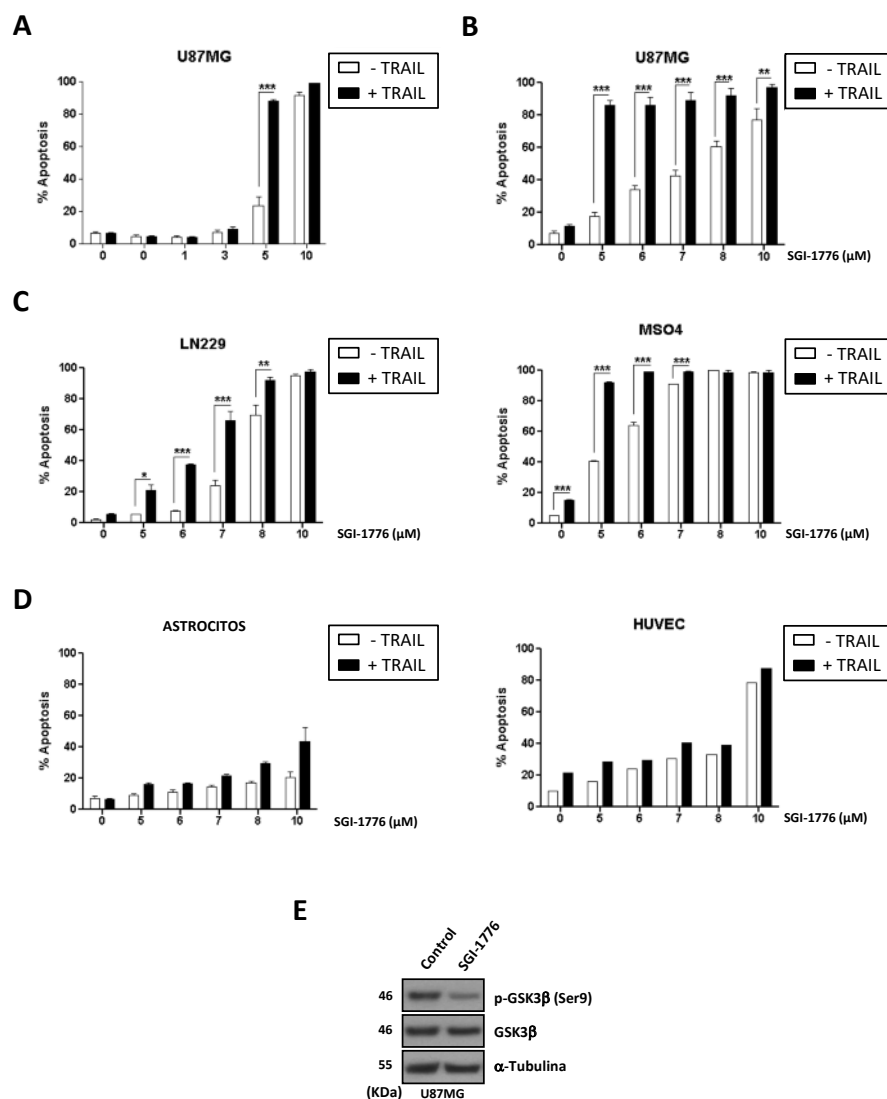
sensibilización en la línea LN-229, pero no en las restantes (**Figura 18B**). Estos resultados nos hicieron plantearnos si a las dosis utilizadas de los inhibidores de PARP estaban afectando a otras funciones celulares en su efecto sobre la sensibilización a TRAIL. Entre la familia PARP, PARP-1 es el miembro principal, siendo el responsable del 90% de la PARilación de la célula [330]. Para comprobar si el efecto observado sobre la sensibilización a TRAIL en LN229 era debido a la inhibición de PARP, silenciamos PARP-1 en combinación con TRAIL. El siPARP-1 no sensibilizó a LN229 a la apoptosis mediada por TRAIL, demostrando que los efectos de los inhibidores de PARP sobre la sensibilización a TRAIL eran independientes de la inactivación de PARP (**Figura 18C**). En este sentido, Antolín *et al.* habían demostrado que altas dosis del inhibidor PJ34 inhibían a las quinasas Pim1 (IC<sub>50</sub>=3.7μM) y Pim2 (IC<sub>50</sub>=16μM) [331]. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que 10μM de PJ34 es una dosis suficiente para inhibir completamente la PARilación. Dado que en el caso de sensibilización a TRAIL se necesitaba una dosis de 20μM de PJ34, dedujimos que el efecto de este inhibidor se podía deber a una diana distinta de PARP, tal vez mediado por la inhibición de Pim quinasas.



**Figura 18.** Altas dosis de PJ34 sensibilizan a las células de GBM a TRAIL. (A-B) Medida de apoptosis en células de GBM tratadas con inhibidores de PARP combinado con 500ng/mL de TRAIL. PJ34 fue utilizado a 10 y 20μM y Olaparib a 5μM. El tiempo de tratamiento fue de 48 horas. (C) Medida de apoptosis en LN-229 siPARP-1 tratadas 48 horas con TRAIL 500ng/mL. La apoptosis fue determinada por citometría de flujo (SubG1).

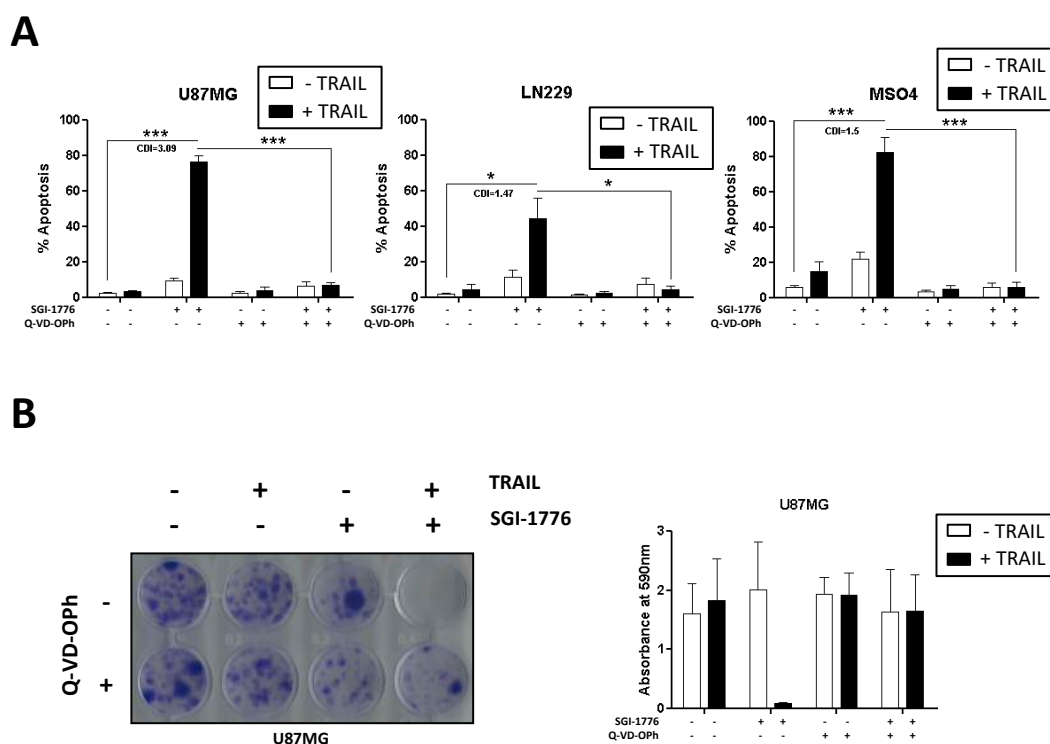
## Los inhibidores de Pim sensibilizan a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL

En un principio, focalizamos los esfuerzos en testar el efecto, dosis y especificidad del inhibidor de Pim SGI-1776 sobre la sensibilización a TRAIL en células de GBM. Aunque somos conscientes de que este inhibidor ha sido retirado de ensayos clínicos por su alta cardio-toxicidad, su eficiencia en ensayos *in vitro* como inhibidor de Pim nos permitía evaluar su función en la potenciación de la muerte celular mediada por TRAIL. Para determinar la concentración llevamos a cabo una dosis respuesta entre el rango de concentraciones recomendadas por el fabricante para este inhibidor (0,1 a 10 $\mu$ M).



**Figura 19. El inhibidor de Pim SGI-1776 sensibiliza a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL.** (A) Dosis-respuesta de SGI-1776 (0,1-10 $\mu$ M) en combinación con TRAIL 500ng/mL durante 48 horas en U87MG. (B) Dosis-respuesta de SGI-1776 (5-10 $\mu$ M) en combinación con TRAIL 500ng/mL durante 48 horas en U87MG. El experimento mostrado en B fue reproducido en LN229 y MSO4 (C) y en astrocitos no tumorales de ratón y células HUVEC (D). La apoptosis se determinó midió por citometría de flujo (SubG1). (E) Western blot de P-GSK3 $\beta$  tras tratamiento con SGI-1776 O/N a 5 $\mu$ M.

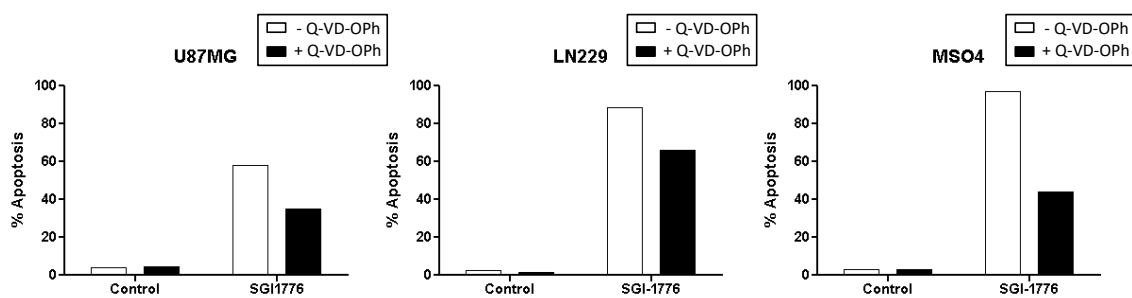
Los resultados mostraban una fuerte sensibilización a 5 $\mu$ M, mientras que a 10 $\mu$ M todo el efecto se debía al inhibidor (**Figura 19A**). Dada la gran diferencia mostrada entre las dosis de 5 y 10 $\mu$ M llevamos a cabo una segunda dosis-respuesta, donde se apreció en un rango más estrecho la dependencia de la dosis (**Figura 19B**). Reproduciendo los experimentos en la línea LN229 y las células primarias MSO4 observamos resultados similares (**Figura 19C**). Guiados por la intención de determinar una dosis sub-lethal de inhibidor de Pim que sensibilizara a las células de GBM a TRAIL, reprodujimos los experimentos también en astrocitos no tumorales de ratón y en células no tumorales humanas (HUVEC) (**Figura 19D**). De acuerdo a los resultados obtenidos, dosis de 5-6 $\mu$ M mostraron una alta capacidad de sensibilizar a TRAIL, con escasa toxicidad. Los resultados obtenidos en células no tumorales demostraron que estas dosis podían considerarse “seguras” a nivel preclínico. Finalmente, para comprobar la capacidad de esta dosis de inhibir a Pim, determinamos su efecto sobre la fosforilación de la Ser9 de GSK3 $\beta$ , un sustrato de Pim quinasa previamente descrito en varios trabajos [332]. Aunque GSK3 $\beta$  también ha sido determinado como sustrato de Akt, el tratamiento con SGI-1776 disminuyó significativamente la fosforilación en Ser9 (**Figura 19E**).



**Figura 20. Q-VD-Oph bloquea la muerte inducida por la combinación (TRAIL+SGI-1776).** (A) Medida de apoptosis (SubG1) tras 48 horas de tratamientos (SGI-1776 5 $\mu$ M, TRAIL 500ng/mL y Q-VD-Oph 20 $\mu$ M) en U87MG, LN-229 y MSO4. El CDI se calculó como se describe en materiales y métodos. (B) En sayo de clonogenicidad en U87MG (500cells/well) tratadas 48 horas con SGI-1776 5 $\mu$ M, TRAIL 500ng/mL y Q-VD-Oph 20 $\mu$ M y cultivadas durante dos semanas. La viabilidad se determinó por medida de la absorbancia a 590nm.

Para confirmar que la muerte inducida por la combinación SGI-1776 + TRAIL era apoptosis, probamos estos tratamientos junto al pan-inhibidor de caspasas Q-VD-OPh. Los resultados demuestran que la inducción de apoptosis por el tratamiento combinado en las diferentes líneas tumorales se inhibió completamente por el inhibidor de caspasas. Para confirmar el efecto sinérgico entre el inhibidor de Pim y el ligando de muerte calculamos el coeficiente de interacción entre drogas (CDI), como se ha descrito previamente en materiales y métodos, confirmando la interacción en la sensibilización (**Figura 20A**). Adicionalmente, para confirmar que la protección a la muerte celular por el Q-VD-OPh tenía también lugar a largo plazo, llevamos a cabo ensayos de clonogenicidad y medimos la viabilidad tras un tratamiento de 48 horas seguido de dos semanas de cultivo. Los resultados obtenidos confirman los mostrados anteriormente, corroborando la protección conferida por el inhibidor de caspasas (**Figura 20B**).

Los inhibidores de Pim quininas han sido propuestos como terapia anti-tumoral contra varios tipos de tumores hematológicos y sólidos [250]. Los resultados mostrados en la **Figura 19** ponen de manifiesto una fuerte inducción de muerte celular por parte del inhibidor a dosis de 10 $\mu$ M en todas las células de GBM testadas. A partir de estos resultados quisimos también estudiar el potencial citotóxico de la inhibición de Pim como monoterapia. Sin embargo, a pesar de la fuerte inducción de muerte celular que presenta esta dosis, el inhibidor de caspasas sólo revirtió sus valores parcialmente, sugiriendo que estas dosis, además de apoptosis, se induce algún otro tipo de muerte celular (**Figura 21**).

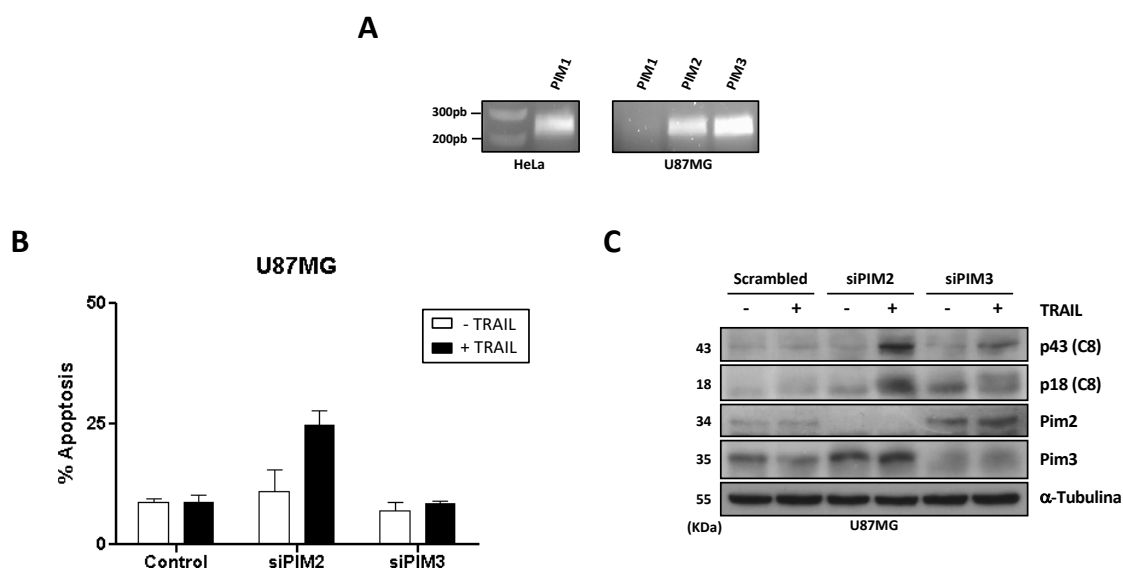


**Figura 21. La inhibición de caspasas no bloquea la muerte celular inducida por altas dosis de SGI-1776.** La apoptosis fue medida por citometría de flujo (SubG1) tras 48 horas de tratamiento con SGI-1776 (10 $\mu$ M) en U87MG, LN229 y MSO4.

Puesto que el objetivo fundamental de nuestra investigación es inducir apoptosis de manera específica en células de GBM, descartamos la monoterapia y centramos nuestra investigación en la combinación de la inhibición de Pim y el tratamiento con TRAIL.

## El silenciamiento de Pim también sensibiliza a las células de GBM a la muerte inducida pro TRAIL

A continuación, focalizamos nuestros esfuerzos en verificar la especificidad del tratamiento con el inhibidor de Pim silenciando las proteínas de la familia Pim con siRNA en la línea celular U87MG. Previamente, comprobamos el perfil de expresión de todos los miembros de la familia Pim en esta línea por PCR. Como se muestra en la **Figura 22A**, U87MG expresa PIM2 y PIM3, pero no PIM1. Para descartar errores experimentales en la cuantificación de la expresión de PIM1 utilizamos en paralelo células HeLa, una línea que expresa todos los miembros de la familia Pim [333]. En una primera aproximación experimental, comprobamos la sensibilización a TRAIL en combinación con el silenciamiento de Pim2 y Pim3 de forma individual. Curiosamente, sólo siPIM2 mostró ligeros valores de sensibilización y activación de caspasa-8 tras el tratamiento con TRAIL (**Figura 22B-C**). De cualquier modo, los valores de apoptosis obtenidos estaban bastante alejados de los obtenidos tras la inhibición química mostrados en el apartado anterior. También es destacable que el silenciamiento de Pim2 incrementaba los niveles de Pim3 y viceversa.



**Figura 22. El silenciamiento de independiente de PIM2 y PIM3 no sensibiliza a las células de GBM a TRAIL. (A)** Determinación de la expresión de los genes de la familia PIM en U87MG. **(B)** Medida de apoptosis en U87MG tras siPIM 2 y 3 seguido de 48 horas de tratamiento con TRAIL 500ng/mL. **(C)** Medida de activación de caspasa-8 en U87MG siPIM2 y siPIM3 tras 6 horas de tratamiento con TRAIL 500ng/mL.

Estos resultados unidos a la alta redundancia funcional presentada por los miembros de la familia Pim nos indujo a repetir los resultados anteriores combinando el silenciamiento de ambas Pim con el tratamiento con TRAIL (**Figura 23**).



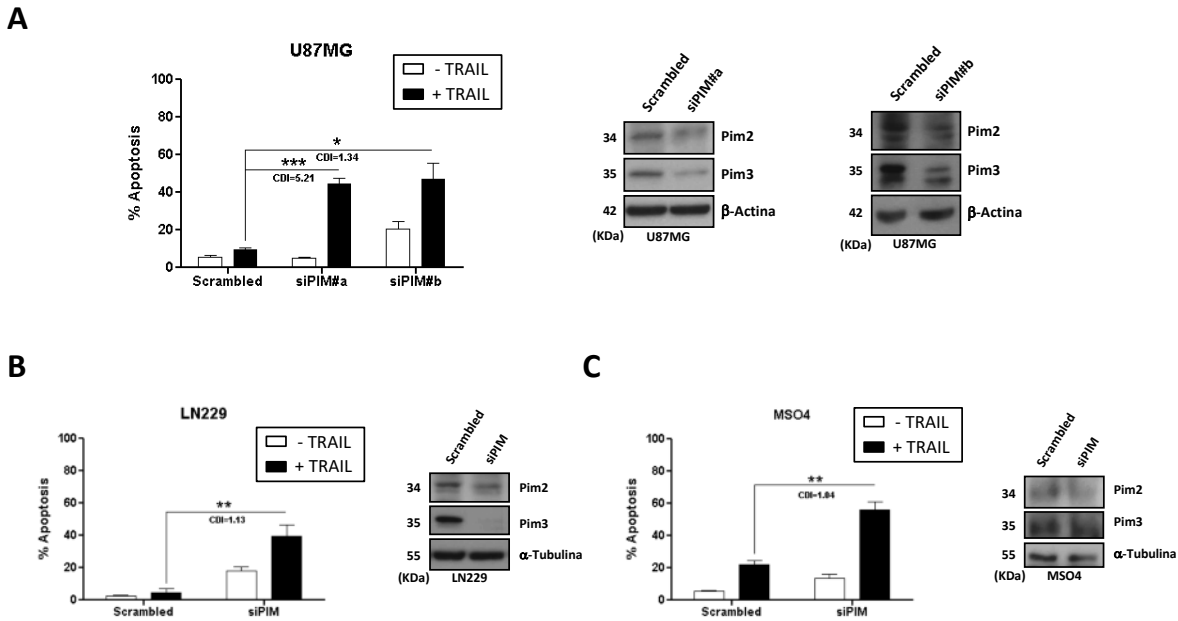


Figura 23. siPIM2/3 sensibiliza a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL. (A) Apoptosis (SubG1) en células U87MG siPIM2/3 tratadas con 500ng/mL de TRAIL durante 48 horas. Se usaron dos siRNA alternativos (siPIM#a y siPIM#b). (B-C) Los experimentos de A fueron reproducidos en LN229 (B) y MSO4 (C). Los silenciamientos fueron chequeados por western blot.

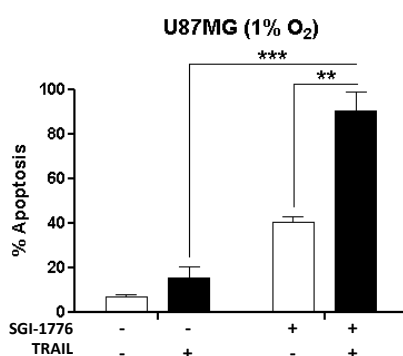
El silenciamiento de ambas Pim sensibilizó a las células U87MG a TRAIL, mostrando valores más aceptables que en los silenciamientos individuales, confirmando la alta redundancia funcional de estas proteínas previamente descrita [333]. Para descartar posibles inespecificidades confirmamos la sensibilización con dos siRNA diferentes para cada gen (Figura 23A). Los resultados fueron reproducidos tanto en LN229 como en MSO4, lo que descarta cualquier posible peculiaridad de las U87MG en los resultados observados (Figura 23B-C).

Es importante destacar que ni los silenciamientos individuales ni los combinados mostraron una elevada muerte celular por sí mismos. Este hecho viene a confirmar que la muerte celular producida por altas dosis de SGI-1776 (10 $\mu$ M), además de no ser en su totalidad apoptótica, no se debe probablemente a la inhibición de Pim quinasas. Por el contrario, siPIM sensibiliza a las células de GBM a TRAIL de manera similar al efecto producido por dosis sub-letales de SGI-1776 (5-6 $\mu$ M), lo que confirmó la especificidad del tratamiento combinado.

### El tratamiento combinado con SGI-1776 + TRAIL también induce apoptosis en condiciones de hipoxia

Para estudiar más en profundidad el efecto del tratamiento combinado sobre células de GBM decidimos probar su eficacia ante situaciones que favorecen el crecimiento tumoral en un

contexto *in vivo*. Como hemos definido en el capítulo 1 de la introducción, el GBM es un tumor altamente agresivo debido en parte a su rápida proliferación, la cual favorece la aparición de zonas hipóxicas y anóxicas en la masa del tumor [334]. La hipoxia induce una respuesta adaptativa que altera de forma notable el perfil de expresión genético de la célula tumoral para adaptarla al déficit de oxígeno. Esta adaptación puede entre otras cosas aumentar la resistencia a determinados tipos de tratamientos. Por otra parte, la hipoxia puede aumentar la expresión de Pim quininas favoreciendo la proliferación del tumor y su quimio-resistencia [208, 209]. Todas estas razones nos llevaron a realizar el tratamiento combinado en un contexto hipóxico (1% O<sub>2</sub>).



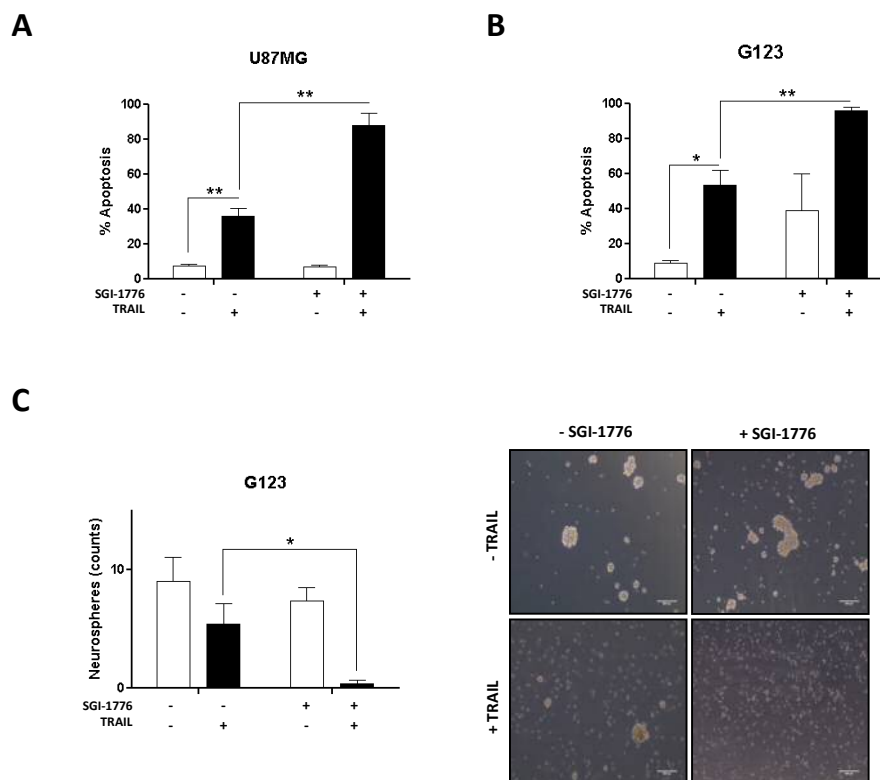
**Figura 24. La inhibición de Pim sensibiliza a las células de GBM a TRAIL en condiciones de hipoxia.** Células U87MG fueron cultivadas en cámara de hipoxia al 1% de oxígeno y tratadas con SGI-1776 (5μM) y TRAIL 500ng/mL durante 48 horas. La apoptosis fue medida por citometría de flujo (SubG1)

Como muestra la **Figura 24**, la combinación SGI-1776 con TRAIL también inducía apoptosis en condiciones de hipoxia. Es interesante reseñar que al 1% de oxígeno el inhibidor de Pim quininas también inducía muerte celular en monoterapia.

### El tratamiento combinado induce apoptosis en neuroesferas derivadas de líneas celulares y células primarias de GBM

Otra característica importante del GBM es la presencia de las denominadas *glioma stem cells* (GSCs), una subpoblación de células pluripotentes con alta plasticidad. Como se ha descrito en la introducción, estas células tienen capacidad de regenerar el tumor y presentan una alta resistencia a los tratamientos convencionales de radio- y quimioterapia [33, 51, 335]. Bajo condiciones de cultivo especiales (como se describe en materiales y métodos), las GSCs presentan la capacidad de formar neuroesferas [336]. Para cuantificar el efecto del tratamiento combinado sobre estas GSCs, enriquecimos la línea U87MG en células *stem* cultivándolas en medio “*stemness*” durante tres semanas. Posteriormente, tratamos con la combinación y medimos apoptosis. El tratamiento

combinado también indujo apoptosis bajo estas condiciones experimentales. Sorprendentemente, estos cultivos presentaban sensibilidad parcial a TRAIL (**Figura 25A**). Posteriormente, repetimos estos experimentos en la línea primaria de GBM G123. Estas células han sido cultivadas en medio “*stemness*” desde su obtención, por lo que no precisan de enriquecimiento previo. Al igual que en U87MG, estas células mostraron sensibilidad parcial a TRAIL. La combinación mostró valores de apoptosis cercanos al 100% (**Figura 25B**). Adicionalmente, cuantificamos la capacidad para formar neuroesferas de estas células primarias tras los tratamientos.



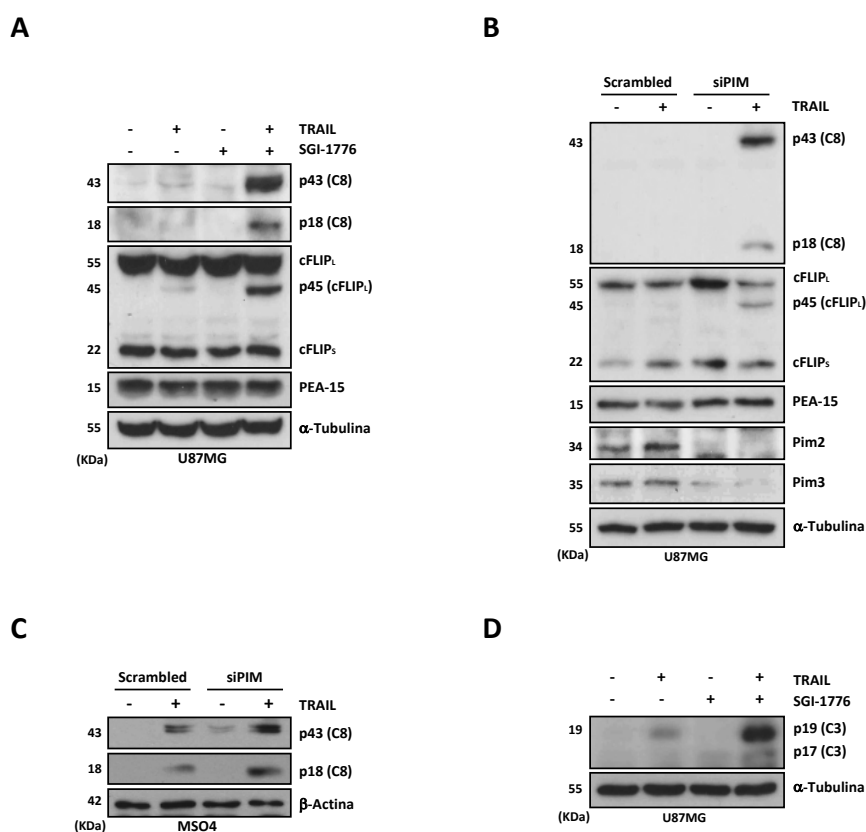
**Figura 25. La inhibición de Pim sensibiliza a GSCs a la muerte inducida por TRAIL.** Células U87MG (**A**) y G123 (**B**), cultivadas en condiciones “*stemness*” como se describe en materiales y métodos, fueron tratadas con SGI-1776 (5 $\mu$ M) y TRAIL (500ng/mL) durante 48 horas. La apoptosis fue determinada por medida de SubG1. (**C**) Recuento de neuroesferas paralelo al experimento **B**. Barra de escala = 500 $\mu$ m.

A pesar de la sensibilización parcial a TRAIL, las células seguían presentando capacidad de formar neuroesferas. Sin embargo, en las células tratadas con la combinación, la capacidad de agregación se inhibió totalmente (**Figura 25C**).

### El tratamiento combinado activa a caspasa-8 y 3 a través de TRAIL-R2/DR5

Confirmada la sensibilización a TRAIL por inhibición de Pim quinasas, focalizamos los esfuerzos en determinar la señalización responsable de inducir apoptosis tras el tratamiento combinado. En

primer lugar, medimos la activación de la caspasas iniciadoras y efectoras mediante western blot, utilizando anticuerpos que detectan las bandas procesadas de dichas proteínas. En primer lugar, medimos la activación de caspasas-8 (caspasa iniciadora de la ruta extrínseca). Como esperábamos, TRAIL activaba a caspasa-8 solo en las células pre-tratadas con el inhibidor de Pim. Estos resultados mostraron también procesamiento de cFLIP<sub>L</sub> (p45), previamente descrito como diana de caspasa-8 [337]. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor de Pim, no afectó no a los niveles totales de cFLIP, ni a los de PEA-15, descartando el posible efecto del SGI-1776 sobre la expresión de ambas proteínas inhibitoras como causa de la sensibilización a TRAIL (Figura 26A). La combinación de TRAIL con siPIM mostró resultados similares (Figura 26B). Estos resultados fueron además reproducidos en células primarias de GBM (Figura 26C).

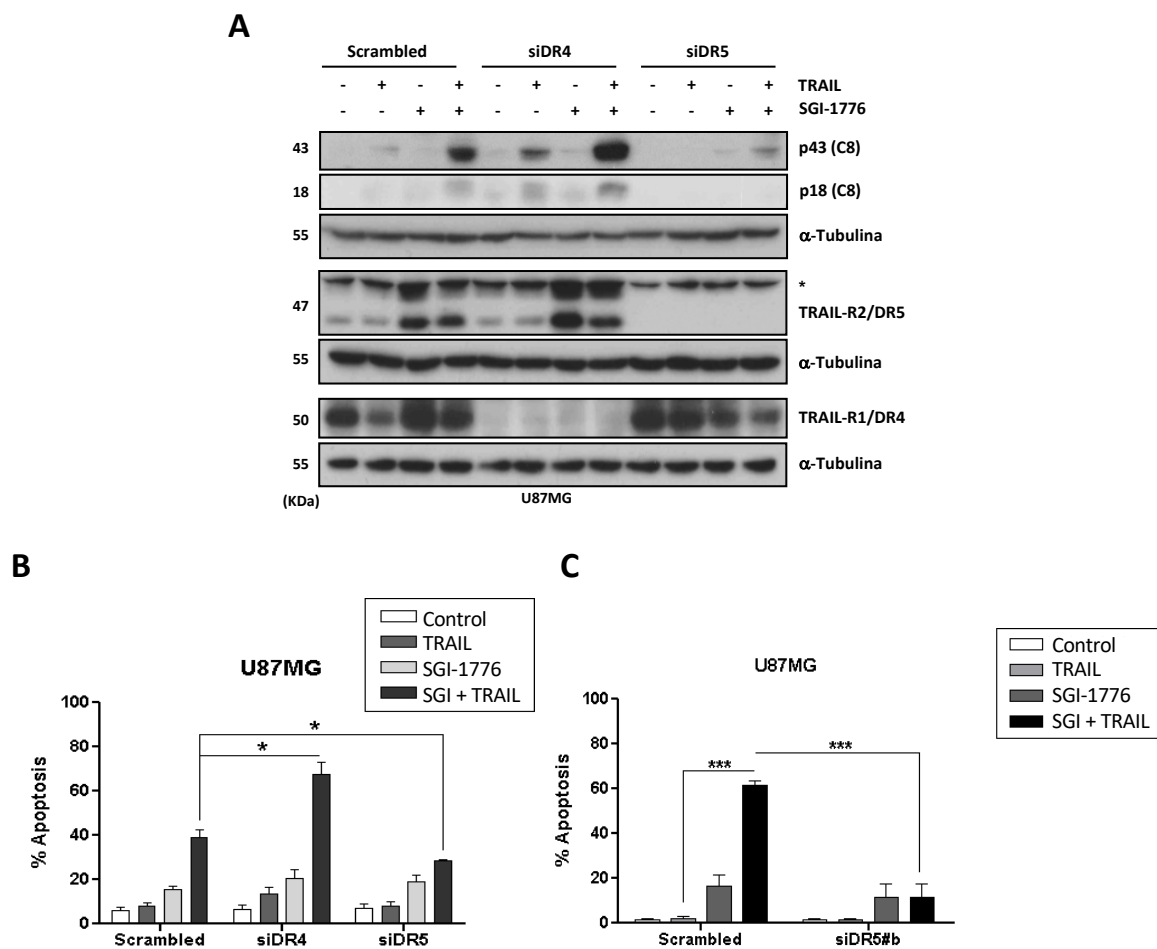


**Figura 26. La inhibición de Pim en combinación con TRAIL activa a caspasa-8 y 3 en GBM.** Western blot de activación de caspasa-8, cFLIP y PEA-15 en U87MG tras pre-tratamiento con (A) SGI-1776 (5μM) y (B) siPIM, seguido de 6 horas de TRAIL (500ng/mL). (C) Western blot de activación de caspasa-8 en MSO4 tratadas como en A. (D) Medida de activación de caspasa-3 por western blot tras 22 horas de tratamiento combinado.

Para confirmar que esta activación de caspasa-8 era suficiente para inducir apoptosis, medimos activación de la caspasa efectora 3 por western blot. La activación de caspasa-3 es considerada como un “punto de no retorno” durante la apoptosis. Como esperábamos, los resultados del

western blot indicaban activación de caspasa-3 sólo en las células tratadas con la combinación (Figura 26D).

El silenciamiento de los receptores de muerte bloquea la formación del DISC y por tanto la apoptosis por vía extrínseca. Para determinar el receptor pro-apoptótico implicado en la activación de apoptosis en las células de GBM, silenciamos la expresión de los dos receptores de TRAIL (TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5) con siRNA. Los resultados de la Figura 27 demuestran que el silenciamiento de TRAIL-R2/DR5, pero no de TRAIL-R1/DR4, prevenía la activación de caspasa-8 y la apoptosis, confirmando que la muerte inducida por la combinación estaba mediada por el receptor de muerte TRAIL-R2/DR5 (Figura 27A-B). Sorprendentemente, siDR4 incrementó tanto la activación de caspasa-8 como la apoptosis. Debido a la importancia de TRAIL-R2/DR5 en nuestra investigación, confirmamos este resultado con un siDR5 alternativo (Figura 27C).

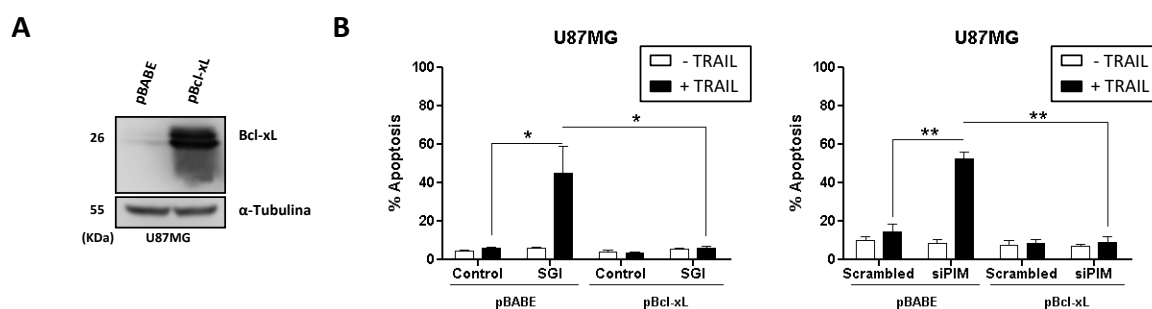


**Figura 27. TRAIL-R2/DR5 media la activación de caspasa-8 por TRAIL tras la inhibición de Pim.** (A) La activación de caspasa-8 fue medida por western blot en células U87MG siDR4 y siDR5 tras pre-tratamiento con SGI-1776 (5 $\mu$ M) seguido de 6 horas de TRAIL (500ng/mL). (B) La apoptosis fue determinada tras 48 horas de tratamiento con SGI-1776 (5 $\mu$ M) y TRAIL (500ng/mL). (C) El resultado obtenido en B para siDR5 fue confirmado con un siRNA alternativo (siDR5#b).

En conjunto, estos resultados demuestran que el tratamiento combinado activa a la ruta extrínseca a través de TRAIL-R2/DR5.

### Las células de GBM son de tipo II ya que dependen de la mitocondria para inducir apoptosis

Como explicamos en el capítulo 2 de la introducción, en referencia a la activación de apoptosis por vía extrínseca, las células se clasifican en dos tipos: las ‘tipo I’, en las cuales la activación de caspasa-8 en el DISC es suficiente para activar a las caspasas efectoras y por tanto inducir apoptosis; y ‘tipo II’, que requieren de la activación adicional de la vía mitocondrial a través de Bid para inducir apoptosis [338]. Para determinar el tipo de células en relación a esta clasificación, es necesario bloquear la vía mitocondrial. Una manera eficiente de bloquear la maquinaria mitocondrial es mediante la sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL [338]. Con este objetivo, desarrollamos células U87MG que sobre-expresaban de forma estable Bcl-xL por infección retroviral (**Figura 28A**). Como se puede observar en la **Figura 28B**, las células U87MG-Bcl-xL eran totalmente resistentes a la muerte inducida por la combinación. Estos resultados se llevaron a cabo inhibiendo Pim químicamente como genéticamente, obteniendo resultados similares.

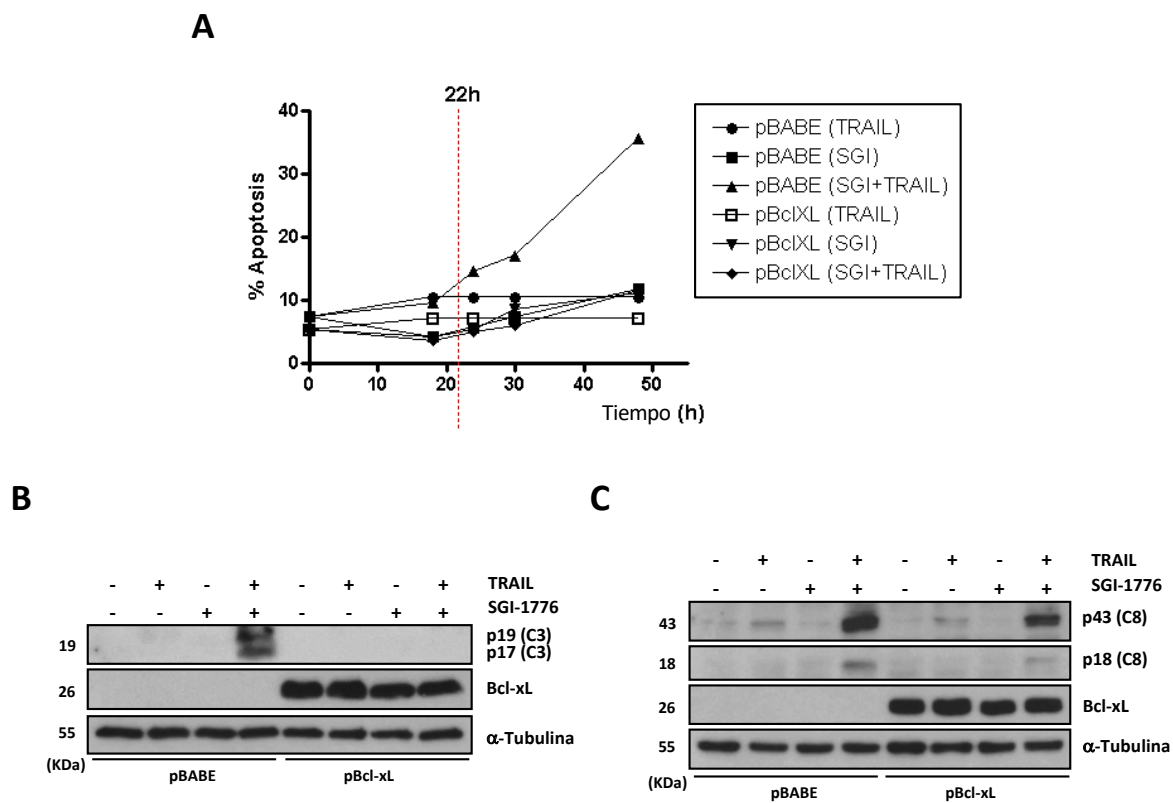


**Figura 28. Las células U87MG son ‘tipo II’.** (A) Western blot de sobre-expresión de Bcl-xL. (B) Medida de apoptosis en células U87MG-Bcl-xL tras inhibición química de Pim (izquierda) o genética (derecha). Las células fueron tratadas 48 horas con SGI-1776 (5  $\mu$ M) y/o TRAIL (500ng/mL). La apoptosis se midió por citometría de flujo (SubG1).

Los resultados confirmaron por tanto que U87MG son células ‘tipo II’, necesitando a la maquinaria mitocondrial para inducir apoptosis. Por otra parte, este modelo de sobre-expresión podía ayudarnos a acotar el lugar de la ruta donde la inhibición de Pim estaba interaccionando con la vía de TRAIL.

## La inhibición de Pim quinasas interacciona con la ruta de TRAIL aguas arriba de la mitocondria

Con el fin de identificar si la interacción entre la inhibición de Pim quinasas y la vía de señalización de TRAIL se daba aguas arriba o aguas debajo de la mitocondria, utilizamos las células U87MG-Bcl-xL, bloqueando la ruta a ese nivel. Primero, realizamos un estudio cinético de tratamiento para determinar el inicio del proceso apoptótico en la población de células de GBM. Como se muestra en la **Figura 29A**, determinamos como tal el tiempo de 22 horas de tratamiento. Posteriormente, utilizamos este tiempo de tratamiento y determinamos la activación de caspasa-3 por western blot. Tal y como esperábamos de unas células tipo II, la sobre-expresión de Bcl-xL inhibió totalmente la activación de caspasa-3 (**Figura 29B**). Por el contrario, al medir activación de la caspasa apical 8 observamos procesamiento tanto en las células control (pBABE), como en las pBcl-xL (**Figura 29C**).

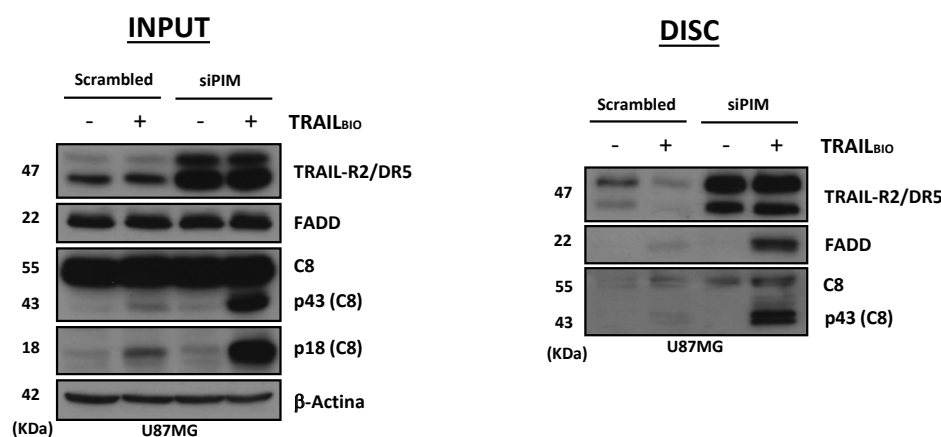


**Figura 29. La inhibición de Pim interfiere con la ruta de TRAIL aguas arriba de la mitocondria.** (A) Curso del tiempo de células pBABE/pBcl-xL tratadas de 18 a 48 horas con SGI-1776 (5  $\mu$ M) y/o TRAIL (500ng/mL). La apoptosis fue determinada por citometría de flujo (SubG1). (B) Medida de activación de caspasa-3 tras 22 horas de los tratamientos especificados en A. (C) Medida de caspasa-8 por western blot en células pre-tratadas con SGI-1776 (5 $\mu$ M) seguido de 6 horas de TRAIL (500ng/mL).

En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de caspasa-8 ocurre independientemente de la activación de la ruta mitocondrial de apoptosis y de la caspasa-3 efectora. Por tanto, la interacción entre la inhibición de Pim quinasas y la ruta de TRAIL está probablemente localizada aguas arriba de la mitocondria, siendo la formación del DISC una etapa candidata como posible diana de esta interacción.

### La inhibición de Pim quinasas interacciona con la ruta de TRAIL en el DISC

Para confirmar de forma experimental que la inhibición de Pim interacciona con la ruta de TRAIL en la formación del DISC, llevamos a cabo ensayos de aislamiento del complejo tratando con el ligando de muerte conjugado con biotina (TRAIL<sub>BIO</sub>), como se describe en materiales y métodos [321]. Como se observa en el panel de la derecha de la **Figura 30**, las células siPIM formaban más DISC, lo que se traducía en una mayor activación de caspasa-8. Observando el INPUT (panel de la izquierda), el silenciamiento de Pim produce un aumento de los niveles de TRAIL-R2/DR5, lo que nos sugirió que tal vez la causa de la sensibilización radicara en dicho incremento.



**Figura 30.** El silenciamiento de Pim incrementa los niveles de TRAIL-R2/DR5 y la formación de DISC. Western blot de la formación del DISC en células siPIM tras 90 minutos de tratamiento con TRAIL-bio (1000ng/mL), como se describe en materiales y métodos.

### La inhibición de Pim regula la expresión de TRAIL-R2/DR5 en membrana a nivel post-transcripcional.

Los resultados de los ensayos de formación de DISC nos motivaron a considerar el incremento de TRAIL-R2/DR5 como la causa de la sensibilización a TRAIL tras la inhibición de Pim



quinasas. Para discernir el mecanismo que explica dicha sensibilización determinamos mediante qPCR la expresión de los genes implicados en la señalización apoptótica por *pathway array*, tal y como se detalla en materiales y métodos.

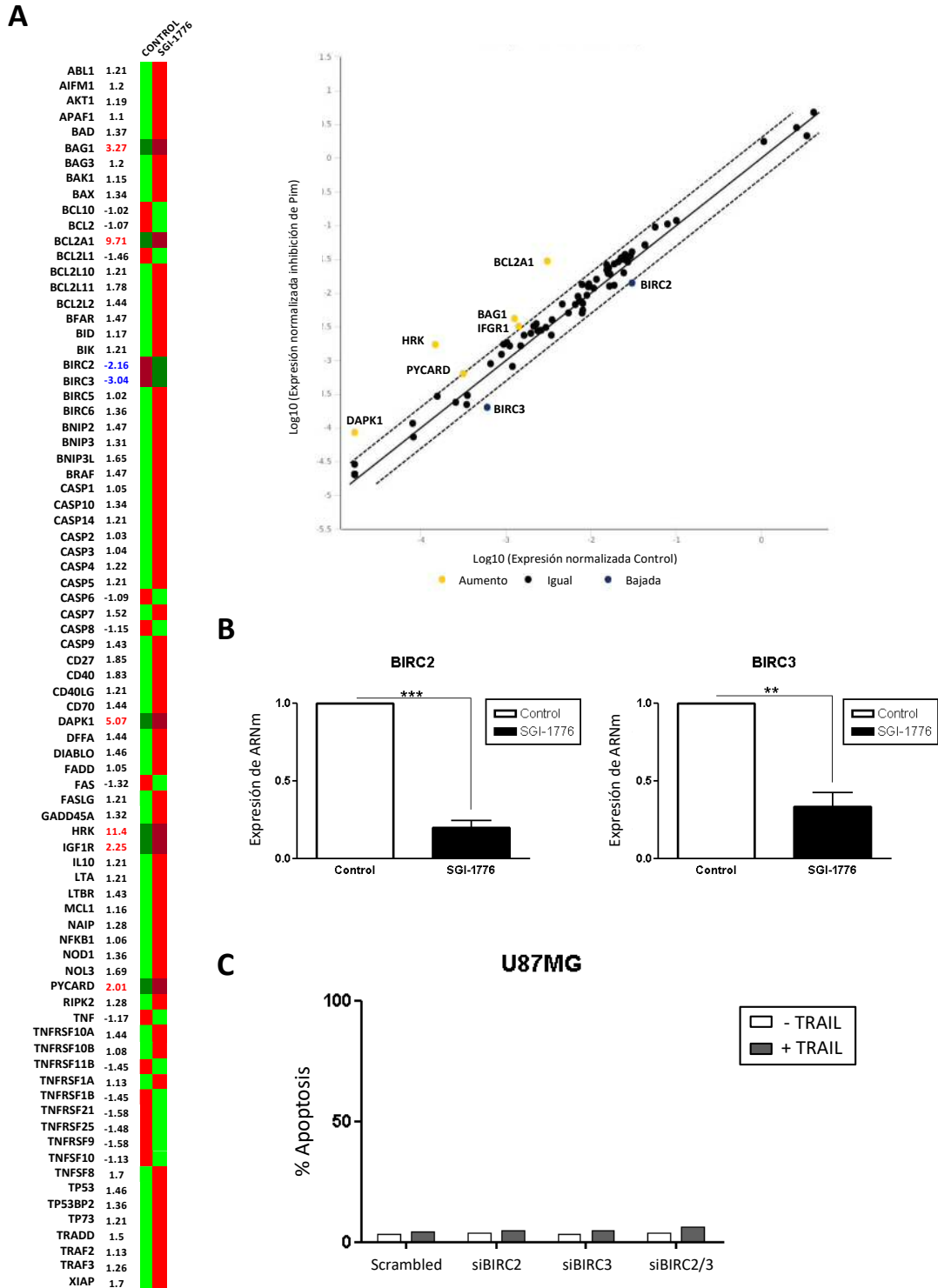
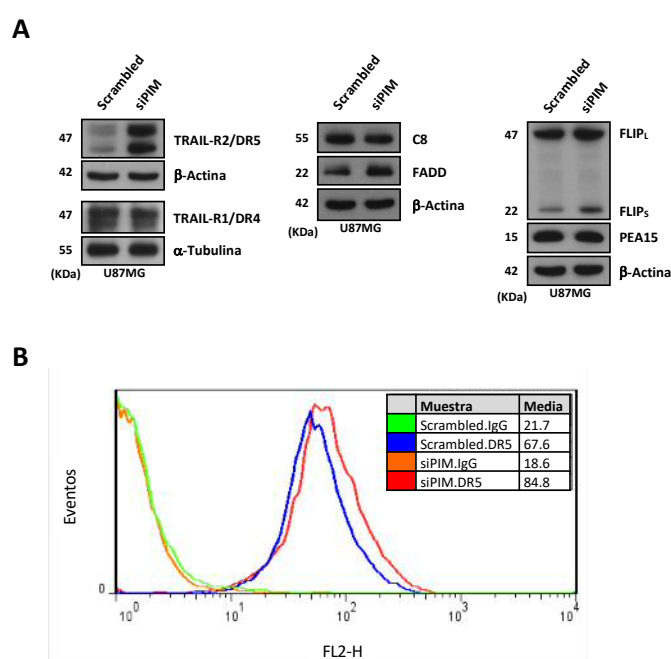


Figura 31. La expresión de BIRC2 y 3 disminuye dramáticamente al inhibir Pim. (A) Resultado de la expresión de genes medida por RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array (PHAS-012Z, Qiagen). Las células fueron tratadas O/N con SGI-1776 5µM. Valor umbral = 2. (B) qPCR de BIRC2 y 3 tras el tratamiento con SGI-1776 5µM. (C) Determinación de apoptosis por citometría de flujo en células U87MG siBIRC2 y/o 3 tras 48 horas de tratamiento con TRAIL 500ng/mL.

Como muestra la **Figura 31A** el silenciamiento de Pim alteró la expresión de algunos genes relacionados con la regulación de la apoptosis. Entre ellos, IAP1 y IAP2 (BIRC2 y BIRC3) redujeron sus niveles, mientras que aumentaron los niveles de BAG1, BCL2A1, HRK, IGF1R y PYCARD.

La notable reducción de la expresión de dos genes claramente anti-apoptóticos como BIRC2 y BIRC3 (IAP1 y IAP2) atrajo claramente nuestro interés. Las IAPs son E3 ubiquitin-ligasas que inhiben la activación de caspasas efectoras [339]. Sin embargo, aunque no interactúan directamente con caspasa-8, han sido indirectamente relacionadas con esta a través de la regulación de la formación del “riposoma” [112, 340]. Los datos obtenidos en el *array* fueron confirmados por qPCR (**Figura 31B**). Para determinar si las IAPs estaban relacionadas con la sensibilización a TRAIL en GBM silenciamos ambas proteínas, tanto de forma individual como en combinación. Sin embargo, en ningún caso obtuvimos sensibilización, por lo que esta hipótesis fue descartada (**Figura 31C**).



**Figura 32. La inhibición de Pim incrementa los niveles de TRAIL-R2/DR5.** (A) Medida de los componentes del DISC (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, FADD y caspasa-8), y los inhibidores (cFLIP y PEA-15) en células siPIM. (B) Medida de los niveles de TRAIL-R2/DR5 en membrana en células Scrambled (control) y siPIM.

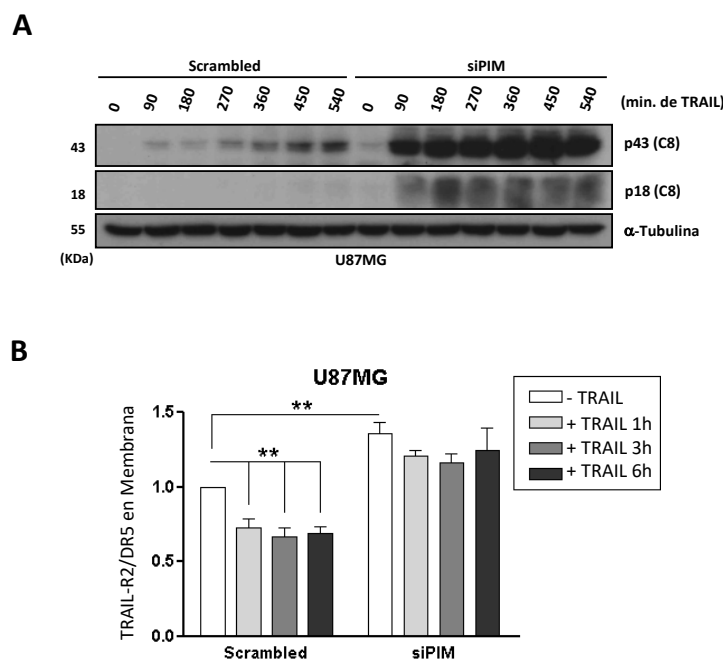
Por otra parte, los resultados del *array* no mostraron diferencias en los niveles de ARNm de ningún receptor de TRAIL, ni ninguna otra proteína relacionada con la formación del DISC (**Figura 31A**). Sin embargo, al medir los componentes del DISC por western blot, confirmamos el claro aumento de TRAIL-R2/DR5. Por el contrario, los niveles de TRAIL-R1/DR4 no se

vieron modificados, sugiriendo que el efecto de la inhibición de Pim es ejercido específicamente sobre la regulación de TRAIL-R2/DR5 (Figura 32A). Globalmente, los resultados confirman que hay un incremento de TRAIL-R2/DR5 mediado a nivel post-transcripcional, descartando un incremento de los niveles de ARNm.

Como hemos indicado en la introducción, para ser funcionales, los receptores de TRAIL tienen que estar presentes en la membrana celular. Para determinar si el incremento de TRAIL-R2/DR5 observado a nivel de proteína total mediante western blot también se traducía en un aumento en la superficie celular, analizamos su expresión con un anticuerpo PE-TRAIL-R2/DR5 mediante citometría de flujo, tal y como se detalla en materiales y métodos. Como muestra la Figura 32B, la expresión de receptores TRAIL-R2/DR5 aumentaba también en membrana plasmática tras el silenciamiento de las Pim quinasas.

### La inhibición de Pim quinasas reduce la internalización de TRAIL-R2/DR5, permitiendo la activación prolongada de caspasa-8 por TRAIL

Para entender la dinámica de activación de caspasa-8 llevamos a cabo un curso del tiempo de tratamiento con TRAIL entre 90 minutos y 9 horas. Las células siPIM mostraron mucha más activación de caspasa-8.



**Figura 33. La inhibición de Pim reduce la internalización de TRAIL-R2/DR5 tras el tratamiento con TRAIL.** (A) Medida de activación de caspasa-8 en células siPIM tras tratamiento con TRAIL 500ng/mL de 90 minutos a 9 horas. (B) Medida de los niveles de TRAIL-R2/DR5 en membrana en células siPIM tras tratamiento con TRAIL de 1 a 6 horas.

La activación de caspasas en el DISC es un evento muy inicial en la activación de la ruta extrínseca. Sin embargo, las células mostraban una activación de caspasas sostenida hasta el punto final del ensayo, siendo máxima a las 6 horas (**Figura 33A**). Estos resultados nos indujeron a estudiar la dinámica de internalización de TRAIL-R2/DR5 en un curso del tiempo de tratamiento con TRAIL entre 1 y 6 horas. En las células control (*Scrambled*) el tratamiento con TRAIL produjo una rápida internalización de gran parte de los receptores presentes en la membrana incluso tras 1 hora de tratamiento. Por el contrario, las células siPIM, además de mostrar unos niveles más elevados de TRAIL-R2/DR5, redujeron significativamente esa internalización. En un contexto global, las células U87MG siPIM expresan más receptores en membrana que las células control incluso tras 6 horas de tratamiento con TRAIL (**Figura 33B**). Estos resultados sugieren que la maquinaria de internalización está comprometida tras la inhibición de Pim, lo que favorece la activación sostenida de caspasa-8, la cual puede contribuir a interrumpir el proceso de internalización [78].

### **La inhibición de Pim quinasas modifica claramente la firma de fosforilación en células de GBM**

Para descifrar en profundidad el mecanismo que regula la sensibilidad a TRAIL tras la inhibición de Pim quinasas, nos centramos en buscar cambios en el patrón de fosforilación de proteínas entre las células control y siPIM. Para ello, llevamos a cabo experimentos de fosfo-proteómica por espectrometría de masas (MS-MS) para identificar cambios en la firma de fosforilación de las células de GBM. En estos estudios se detectaron 1.456 proteínas fosforiladas. Entre ellas, 1.078 mostraron cambios en su patrón de fosforilación, aumentando en 509 proteínas y disminuyendo en 569 (**Figura 34A**). El resultado global del experimento fue publicado en el material suplementario de Serrano-Saenz *et al.* [341]. Dada la complejidad de los resultados, estos fueron divididos en dos tablas. En la Tabla S1 se mostraban las proteínas detectadas, indicando el número de veces que se detectaba cada péptido (PSM, del inglés: *peptide spectrum matches*). Por convenio, se considera que existe variación en el patrón de fosforilación si el  $\Delta$ PSM entre condiciones es de al menos 1,6 veces. En la Tabla S2 se muestran los péptidos detectados para cada proteína y las modificaciones post-transduccionales que presentan.

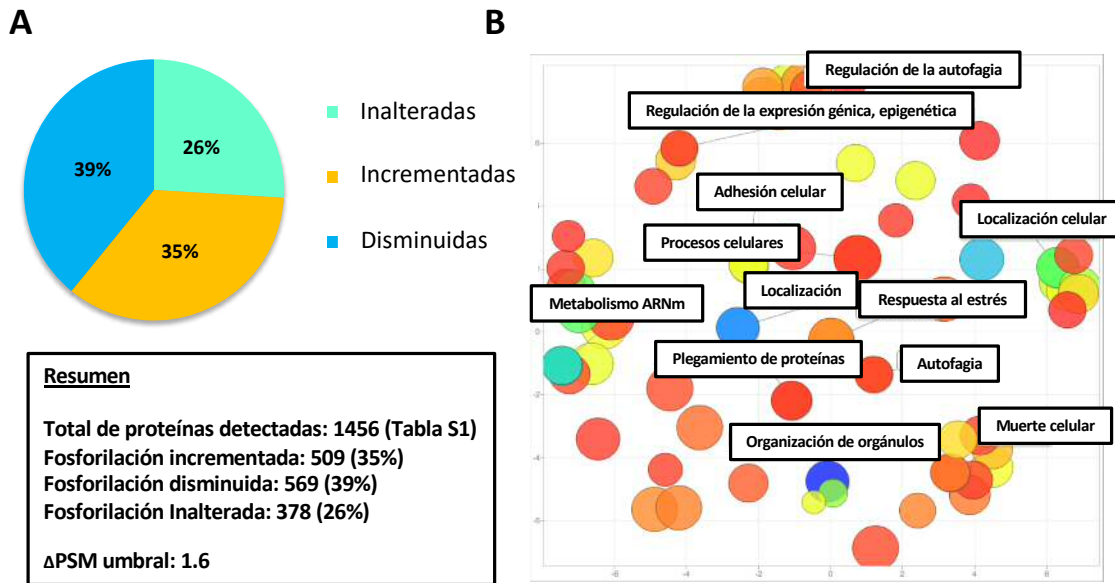


Figura 34. Efecto de la inhibición Pim sobre la firma de fosforilación de U87MG. (A) Resumen global de los resultados obtenidos en MS-MS.  $\Delta$ PSMDOWN-PHOSPHORYLATED = PSMScrambled / PSMsiPIM y  $\Delta$ PSMUP-PHOSPHORYLATED = PSMsiPIM / PSMScrambled (B) Representación general del análisis de enriquecimiento.

En un primer análisis evaluamos la función de las proteínas alteradas mediante un análisis de enriquecimiento de función en la herramienta online AmiGO de Gene Ontology (GO). En una primera representación gráfica, se observaban *clusters* en funciones como muerte celular, autofagia o localización celular (Figura 34B). Desglosando el análisis se determinó enriquecimiento funcional en 286 funciones moleculares, 1.427 procesos biológicos y 309 componentes celulares. Los análisis en GO son altamente redundantes. Para eliminar dicha redundancia filtramos los resultados en REVIGO, donde se redujeron las funciones a las 63 que se representan en la siguiente tabla:

Término (ID)	Descripción	Frecuencia	$\log_{10}$ p-valor	Singularidad	Dispensabilidad
<a href="#">GO:0006807</a>	Componentes del metabolismo del nitrógeno	38.74%	-5.3706	0.98	0
<a href="#">GO:0006996</a>	Organización de orgánulos	3.60%	-20.2865	0.72	0
<a href="#">GO:0007155</a>	Adhesión celular	0.54%	-9.8827	0.99	0
<a href="#">GO:0009987</a>	Procesos celulares	63.78%	-4.3335	1	0
<a href="#">GO:0022610</a>	Adhesión biológica	0.55%	-9.7773	0.99	0
<a href="#">GO:0051179</a>	Localización	18.50%	-6.7055	1	0
<a href="#">GO:0051641</a>	Localización celular	2.04%	-13.6635	0.92	0
<a href="#">GO:0051704</a>	Procesos multi-orgánicos	0.75%	-3.4658	0.99	0
<a href="#">GO:0065007</a>	Regulación biológica	20.50%	-3.8462	1	0
<a href="#">GO:0071840</a>	Biogénesis u organización de componentes celulares	8.57%	-16.857	0.99	0
<a href="#">GO:0045653</a>	Regulación negativa de diferenciación de megacariocito	0.00%	-15.0177	0.76	0.02
<a href="#">GO:0061077</a>	Plegamiento de proteínas mediado por chaperonas	0.04%	-3.987	0.96	0.03
<a href="#">GO:0006914</a>	Autofagia	0.23%	-4.5751	0.96	0.03
<a href="#">GO:0044764</a>	Procesos celulares de macro-organismos	0.33%	-9.6696	0.91	0.04
<a href="#">GO:0016071</a>	Procesos metabólicos de ARNm	0.80%	-15.9318	0.86	0.04
<a href="#">GO:0006457</a>	Plegamiento de proteínas	0.90%	-4.3063	0.95	0.04
<a href="#">GO:0033554</a>	Respuesta a estrés celular	2.97%	-18.0825	0.85	0.05
<a href="#">GO:1901360</a>	Procesos metabólicos de componentes orgánicos cíclicos	30.32%	-5.6925	0.95	0.07
<a href="#">GO:0046483</a>	Procesos metabólicos en hepatocitos	29.66%	-6.5969	0.91	0.1
<a href="#">GO:0007049</a>	Ciclo celular	1.89%	-9.341	0.88	0.12

<a href="#">GO:0006413</a>	Inicio de la traducción	0.52%	-8.5452	0.85	0.14
<a href="#">GO:0044265</a>	Catabolismo de macro-moléculas	1.27%	-4.5346	0.88	0.15
<a href="#">GO:0044710</a>	Procesos metabólicos de organismos unicelulares	31.68%	-4.4949	0.92	0.16
<a href="#">GO:0048519</a>	Regulación negativa de procesos biológicos	1.98%	-10.5735	0.81	0.17
<a href="#">GO:0007163</a>	Establecimiento o mantenimiento de la polaridad celular	0.10%	-6.3788	0.9	0.17
<a href="#">GO:0010467</a>	Expresión génica	19.67%	-9.4522	0.91	0.19
<a href="#">GO:0043603</a>	Procesos de metabolismo celular de amidas	6.88%	-4.0555	0.89	0.19
<a href="#">GO:0090559</a>	Regulación de la permeabilidad de la membrana	0.01%	-4.0825	0.86	0.2
<a href="#">GO:0030029</a>	Procesos basados en filamentos de actina	0.40%	-8.3655	0.89	0.2
<a href="#">GO:0008219</a>	Muerte celular	0.46%	-5.8962	0.89	0.2
<a href="#">GO:0007059</a>	Segregación cromosómica	0.48%	-4.1046	0.89	0.2
<a href="#">GO:0009179</a>	Procesos metabólicos de nucleósidos de purín-difosfato	0.60%	-5.1397	0.8	0.21
<a href="#">GO:0043170</a>	Procesos metabólicos de macro-moléculas	39.49%	-4.7077	0.95	0.21
<a href="#">GO:0006928</a>	Movimiento de células o componentes sub-celulares	0.97%	-4.1938	0.89	0.22
<a href="#">GO:0022402</a>	Procesos de ciclo celular	1.05%	-7.6904	0.87	0.22
<a href="#">GO:0051301</a>	División celular	1.23%	-6.0937	0.88	0.22
<a href="#">GO:0006369</a>	Terminación de la transcripción por RNA-polimerasa II	0.02%	-3.7513	0.88	0.23
<a href="#">GO:0010506</a>	Regulación de la autofagia	0.07%	-4.118	0.83	0.24
<a href="#">GO:0006725</a>	Procesos de metabolismo celular de compuestos aromáticos	29.63%	-6.3575	0.91	0.24
<a href="#">GO:0030334</a>	Regulación de la migración celular	0.14%	-3.5626	0.74	0.26
<a href="#">GO:0018107</a>	Fosforilación peptidil-treonina	0.03%	-4.0975	0.9	0.27
<a href="#">GO:0015931</a>	Transporte de compuestos con núcleo-bases	0.20%	-3.4852	0.92	0.27
<a href="#">GO:0006897</a>	Endocitosis	0.24%	-4.2628	0.93	0.28
<a href="#">GO:0043085</a>	Regulación positiva de la actividad catalítica	0.82%	-7.0381	0.81	0.29
<a href="#">GO:0010608</a>	Regulación post-transcripcional de la expresión génica	0.72%	-7.9872	0.76	0.3
<a href="#">GO:0006397</a>	Procesamiento del ARNm	0.56%	-13.4935	0.82	0.31
<a href="#">GO:0065009</a>	Regulación de funciones moleculares	1.73%	-6.0947	0.82	0.32
<a href="#">GO:0006352</a>	Transcripción de ADN molde, iniciación	0.77%	-4.7799	0.84	0.32
<a href="#">GO:0016192</a>	Transporte mediado por vesículas	1.09%	-8.3307	0.93	0.33
<a href="#">GO:0048522</a>	Regulación positiva de procesos celulares	1.59%	-4.9031	0.75	0.33
<a href="#">GO:0048518</a>	Regulación positiva de procesos biológicos	1.74%	-6.6757	0.81	0.33
<a href="#">GO:0019538</a>	Procesos del metabolismo proteico	18.49%	-4.0794	0.91	0.34
<a href="#">GO:0046907</a>	Transporte intracelular	1.56%	-12.2993	0.86	0.34
<a href="#">GO:0040029</a>	Regulación de la expresión génica, epigenética	0.13%	-4.7447	0.8	0.34
<a href="#">GO:0065008</a>	Regulación de cualidad biológica	3.40%	-4.8894	0.81	0.35
<a href="#">GO:0032784</a>	Regulación de la transcripción de ADN molde, elongación	0.15%	-4.3215	0.75	0.35
<a href="#">GO:0006335</a>	Ensamblaje de nucleosomas dependiente de la replicación	0.00%	-12.6055	0.76	0.36
<a href="#">GO:0006353</a>	Transcripción de ADN molde, terminación	0.19%	-3.9717	0.86	0.36
<a href="#">GO:1904837</a>	Ensamblado del complejo $\beta$ -catenina-TCF	0.00%	-10.0031	0.82	0.37
<a href="#">GO:0033036</a>	Localización de macro-moléculas	3.03%	-11.342	0.92	0.37
<a href="#">GO:0006396</a>	Procesamiento de ARN	3.21%	-13.8125	0.83	0.37
<a href="#">GO:0006259</a>	Procesos metabólicos del ADN	5.61%	-9.8794	0.84	0.38
<a href="#">GO:0008104</a>	Localización proteica	2.63%	-9.585	0.88	0.39

Tabla 12. Resultado del análisis de enriquecimiento funcional tras filtrar en REVIGO

Desplegando las funciones que se engloban en el *cluster* mostrado por REVIGO para muerte celular (GO:0008219), se detallan las siguientes funciones:

- Regulación de la ruta de señalización de apoptosis
- Regulación positiva de la ruta de señalización de apoptosis
- Regulación de la ruta intrínseca de señalización de apoptosis
- Regulación positiva de procesos de apoptosis
- Regulación de la muerte celular programada

- Regulación positiva de la muerte celular programada
- Muerte celular programada
- Regulación positiva de la muerte celular
- Regulación de la muerte celular
- Regulación de procesos apoptóticos
- Señalización de ruta intrínseca de apoptosis
- Señalización apoptótica
- Procesos apoptóticos

Los resultados sugieren que entre las proteínas que alteran su nivel de fosforilación hay proteínas implicadas en la regulación de la muerte celular. En un segundo análisis focalizamos nuestro interés en aquellas proteínas identificadas en nuestros resultados que hayan sido relacionadas previamente con los componentes del DISC. Para esto comparamos la lista de proteínas diferencialmente fosforiladas con las listas de interacción de proteínas que ofrece la base de datos BioGrid para TRAIL-R2/DR5, FADD y caspasa-8. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Proteína	PSM Scrambled	PSM siPIM
<b>TRAIL-R2/DR5</b>		
EGFR	1	0
ARHGDI1	1	0
VAMP3	1	0
SLC20A1	8	2
EZR	1	2
TRADD	0	1
MFF	0	2
<b>FADD</b>		
NOL3	1	0
IKBK1	1	0
ARHGDI1	1	0
DAXX	2	1
TRADD	0	1
MFF	0	2
EDH1	0	1
<b>Caspasa-8</b>		
NOL3	1	0
PRDX6	1	0
BCAP31	1	0
ARHGDI1	1	0
CASP9	7	0
KHDRBS1	5	0
SQSTM1	16	3
SORBS1	2	0
BIRC6	3	1
FIS1	1	0
CASC3	1	7
UBC	8	14
CASP2	0	3
YBX1	6	15
TRADD	0	1
OPTN	5	11
MFF	0	2

Tabla 13. Proteínas detectadas en MS-MS relacionadas con componentes del DISC.

Finalmente, determinamos la relación entre las proteínas detectadas mediante la base de datos STRING (**Figura 35**). Curiosamente, el análisis mostró cambios en el patrón de fosforilación de caspasa-2 y caspasa-9, pero como nuestros resultados previos mostraban un efecto de los inhibidores de Pim aguas arriba de la mitocondria decidimos no explorar esta posibilidad. Tras llevar a cabo una exhaustiva revisión bibliográfica, seleccionamos tres posibles candidatos: NOL3, BIRC6 y p62/SQSTM1, proteínas que se han propuesto anteriormente como reguladores de la activación de caspasa-8 en el contexto tumoral [164, 342, 343].

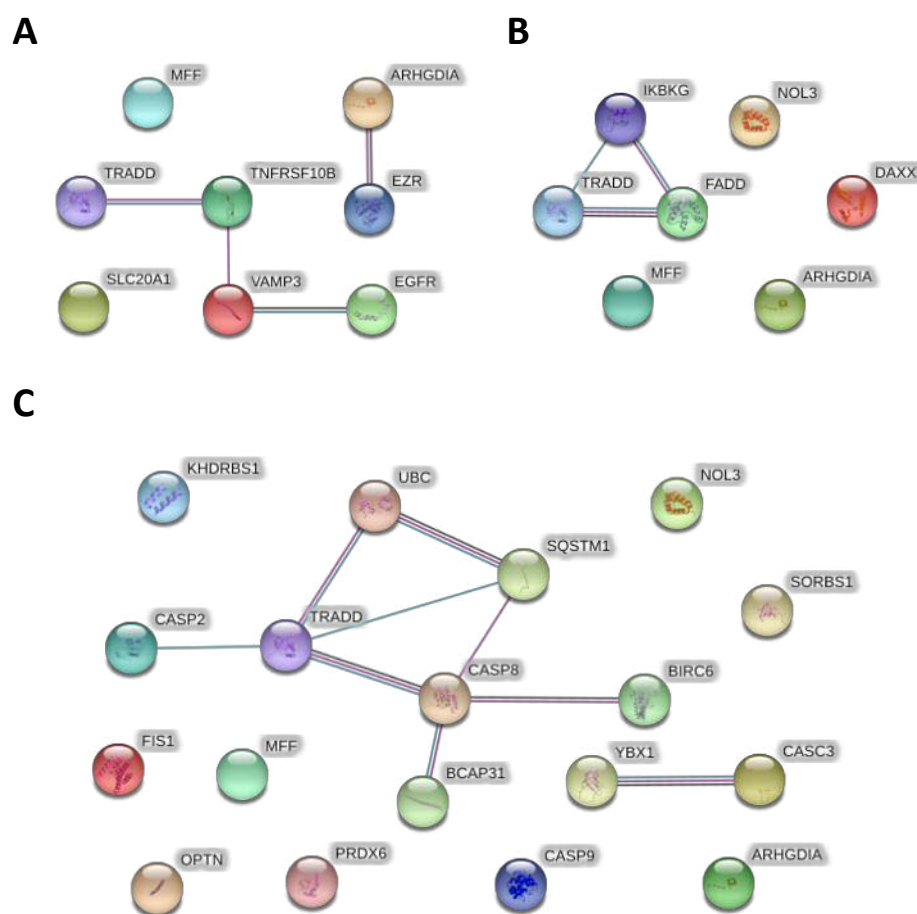


Figura 35. Análisis de interacción entre proteínas detectadas en MS-MS y proteínas del DISC. (A) TRAIL-R2/DR5, (B) FADD y (C) caspasa-8.

NOL3/ARC y BIRC6/APOLLON inhiben la activación de caspasa-8. Dado que inhiben la apoptosis, para demostrar si alguna de ellas estaba involucrada en la sensibilización a TRAIL en células de GBM, silenciamos la expresión de ambas con siRNA y tratamos con el ligando de muerte. Sin embargo, ni siNOL3 ni siBIRC6 sensibilizaron a las células U87MG a la apoptosis por TRAIL (**Figura 36**), lo que nos llevó a descartar la implicación de estas proteínas en la sensibilización a TRAIL mediada por la inhibición de Pim quinasas.



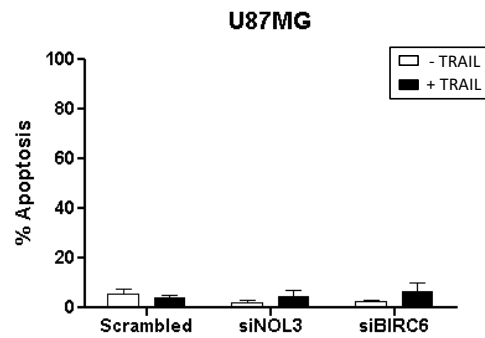


Figura 36. siNOL3 y siBIRC6 no sensibilizan a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL. Las células U87MG siNOL3 y siBIRC6 fueron tratadas con TRAIL 500ng/mL durante 48 horas y la apoptosis se determinó por citometría (SubG1).

Por el contrario, el estudio de la posible implicación de SQSTM1/p62 en nuestro modelo es más complejo, ya que como se ha definido en la introducción, esta se ha propuesto como un regulador positivo de la activación de caspasa-8 [164].

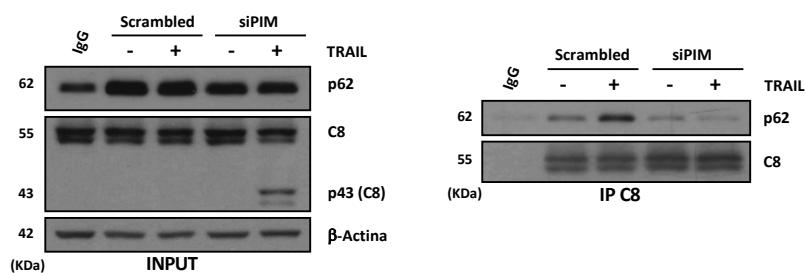
### La inhibición de Pim quinasas regula el estado de fosforilación de p62/SQSTM1 y su interacción con el DISC en células de GBM

Descartadas NOL3 y BIRC6, focalizamos nuestro esfuerzo en estudiar la posible implicación de p62 en la sensibilización a TRAIL mediada por la inhibición de las Pim quinasas. De acuerdo con nuestros resultados (Tabla S2 publicada *online*), las fosforilaciones en la Ser24, Thr269 y Ser332 que se detectaban en células control (Scramble), se reducían, o directamente no eran detectadas en células siPIM (Tabla 14).

Residuo	Scrambled	(PSM)	siPIM	(PSM)
p62-Ser24	RFsFccSPEPEAEAAAGPGpER	(x2)	No detectado	
p62-Thr269	SRLtPVSPESSTEEK	(x4)	SRLtPVSPESSTEEK	(x1)
p62-Ser332	IALESEGRPEEQMESDNcsGGDDDWTHLSSK	(x7)	IALESEGRPEEQMESDNcsGGDDDWTHLSSK	(x2)

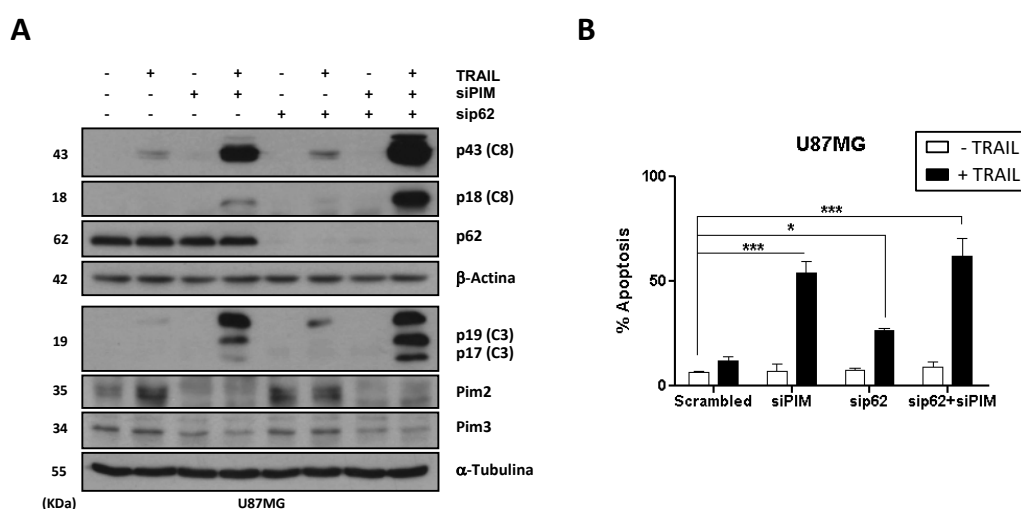
Tabla 14. Péptidos fosforilados correspondientes a p62 detectados en MS-MS.

Para confirmar la interacción entre caspasa-8 y p62, inmunoprecipitamos caspasa-8. El ensayo de co-inmunoprecipitación demostró que la interacción entre ambas proteínas aumentaba en las células control tras el tratamiento con TRAIL, como ha sido demostrado en otros modelos celulares [164]. Por el contrario, en células siPIM la interacción se revertía, sugiriendo que a diferencia de lo que se ha descrito previamente, en el modelo de GBM p62 ejercería un papel inhibitorio en la activación de caspasas-8 (Figura 37).



**Figura 37. siPIM revierte la interacción entre caspasa-8 y p62/SQSTM1.** Células siPIM fueron tratadas 6 horas con TRAIL 500ng/mL. Caspasa-8 fue precipitada con un anticuerpo anti-caspasa-8 y la interacción con p62 fue identificada por western blot.

Para confirmar el carácter inhibitorio de esta interacción, silenciamos de forma combinada p62 y Pim quinasas para medir la activación de caspasas y apoptosis. El silenciamiento combinado mostraba mayores niveles de activación de caspasas iniciadoras y efectoras (**Figura 38A**), lo que confirmaba la implicación de p62 en la activación de caspasa-8 en estas células. Sin embargo, es interesante comprobar que pese a observar más activación de caspasas en los silenciamientos combinados, este aumento no se tradujo en una mayor apoptosis (**Figura 28B**).



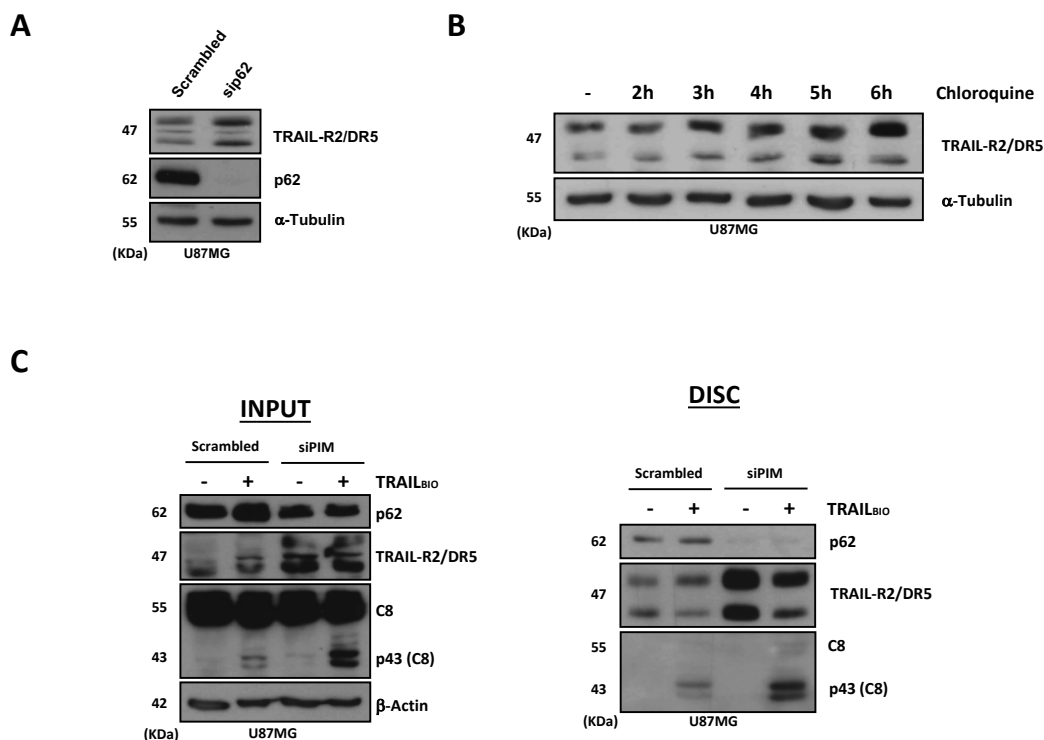
**Figura 38. El silenciamiento de p62 favorece la sensibilización a TRAIL.** Células siPIM y/o siP62 fueron tratadas con TRAIL 6 horas para medir caspasa-8 (A, arriba), 22 horas para medir caspasa-3 (A, abajo) y 48 horas para medir apoptosis (B).

Colectivamente, los resultados demuestran que existe una relación entre p62 y la sensibilización a TRAIL en el modelo de GBM.

### p62/SQSTM1 modula el incremento de TRAIL-R2/DR5

Los resultados mostrados en las **Figuras 27, 30, 32 y 33** demuestran que la inhibición de Pim produce un incremento a nivel post-transcripcional de TRAIL-R2/DR5. Este efecto es específico

de este receptor, ya que no se observa en TRAIL-R1/DR4 (**Figura 32A**). Estos resultados nos llevaron a pensar que dicho incremento es la causa de la sensibilización a TRAIL tras la inhibición de Pim quinasas. Por otra parte, los resultados de MS-MS mostraron que el silenciamiento de Pim alteraban el estatus de fosforilación de p62. A esto añadimos que la inhibición de Pim revertía la interacción entre p62 y caspasa-8, interacción que parece tener un sentido inhibitorio en la activación de esta caspasa. Estas conclusiones nos indujeron a medir los niveles de TRAIL-R2/DR5 tras el silenciamiento de p62. Como se muestra en la **Figura 39A**, sip62 incrementa los niveles de TRAIL-R2/DR5. Como hemos definido en la introducción, p62/SQSTM1 juega un papel importante en regulación de la degradación selectiva de proteínas, actuado como receptor de proteínas que serán eliminadas mediante autofagia [258]. En este sentido, la inhibición de la degradación vía lisosomal mostró una acumulación progresiva de los niveles del receptor de muerte por western blot (**Figura 39B**). Ambos resultados sugieren que el incremento de los niveles de TRAIL-R2/DR5 esta mediado por la inhibición de la degradación lisosomal dependiente de p62, proteína regulada por Pim quinasas. Experimentos de aislamiento del DISC demuestran que existe una interacción basal entre p62 y TRAIL-R2/DR5, previa al tratamiento con el ligando de muerte (**Figura 39C**). Por el contrario, al silenciar las Pim quinasas, esta asociación se revierte.

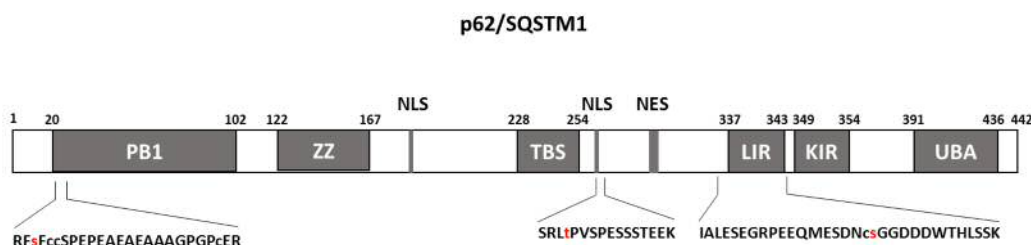


**Figura 39. P62 interacciona con TRAIL-R2/DR5 en el DISC.** (A) medida de DR5 por western blot en células sip62. (B) Medida de DR5 por western blot tras un curso en el tiempo de 1 a 6 horas de tratamiento con Cloroquina (100 $\mu$ M). (C) Western blot de precipitación del DISC en células siPIM tras 90 minutos de tratamiento con TRAIL<sub>Bio</sub> 1000ng/mL.

De este modo, en las células control, al tratar con TRAIL se forma un DISC al que está unido p62, lo que podría explicar el aumento de interacción entre caspasa-8 y p62 que se observa en la **Figura 37**. Todos estos resultados confirman nuestra hipótesis de que p62 regula negativamente la apoptosis mediada por TRAIL en células de GBM.

### La fosforilación de p62/SQSTM1 en el residuo Ser332 está involucrada en la regulación de los niveles de TRAIL-R2/DR5 mediada por Pim quinasas

Dada la implicación de p62/SQSTM1 en la regulación de los niveles de TRAIL-R2/DR5, decidimos indagar más en la importancia de los fosfopéptidos detectados en los experimentos de MS-MS: Ser24, Thr269 and Ser332 (**Figura 40**). La Ser24 está localizada en el dominio PB1 [277]. Thr269 está situada en una secuencia de localización nuclear (NLS) y la pérdida de esta fosforilación está relacionada con una desregulación del ciclo celular y por tanto está asociada a mal pronóstico [314]. Ser332 está dentro del dominio LIR. Como se ha descrito en la introducción, este dominio media la interacción entre p62 y LC3 [289].



**Figura 40.** Estructura de p62 y péptidos detectados por MS-MS. En rojo se indican los residuos fosforilados.

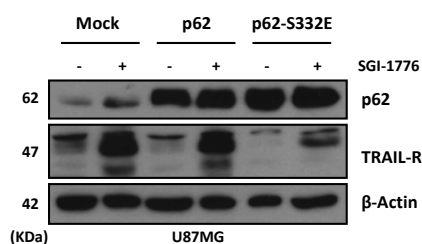
Basándonos en los resultados de la **Figura 39B**, donde la inhibición de la función del lisosoma incrementó los niveles de TRAIL-R2/DR5, decidimos centrar nuestra atención en la Ser332 (dominio LIR) y su posible papel en la regulación de la estabilidad de TRAIL-R2/DR5. Aunque no existe evidencia de que la fosforilación en el dominio LIR de p62 regule su interacción con LC3, esto sí ha sido comprobado en otros receptores de autofagia selectiva como optineurina (OPTN), donde se ha descrito que dicha fosforilación favorece su interacción con LC3 [344]. Este escenario nos guio a investigar la posible implicación de esta fosforilación en la regulación de la estabilidad del TRAIL-R2/DR5 tras la inhibición de Pim. De este modo, si esta fosforilación incrementa la autofagia selectiva mediada por Pim quinasas, un mutante constitutivamente

fosforilado en este residuo (S332E) debería impedir el efecto de los inhibidores de Pim sobre la sensibilización a TRAIL. Para ello, se generó un mutante p62-S332E por mutagénesis dirigida y se sobre-expresó en las células U87MG de forma transitoria (Figura 41A). Tal y como preveíamos, la expresión de este mutante redujo claramente los niveles de TRAIL-R2/DR5 comparados con los niveles mostrados por la inhibición de Pim (Figura 41B). Al determinar apoptosis, observamos también un fuerte bloqueo de la apoptosis inducida por la combinación, confirmando nuestra hipótesis (Figura 41C).

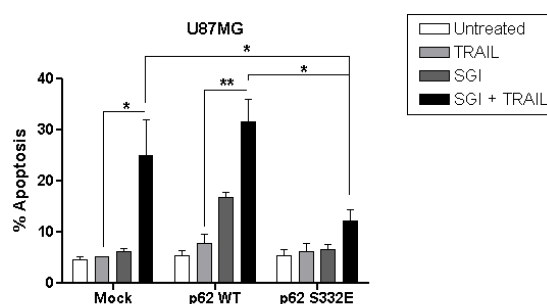
## A

p62-wt	MASLTVKAYLLGKEDAAREIRRFSCCSEPEAEAEAAAGPGPCERLLSRVAALFPALRP	60
p62-S332E	MASLTVKAYLLGKEDAAREIRRFSCCSEPEAEAEAAAGPGPCERLLSRVAALFPALRP	60
*****		
p62-wt	GGFQAHYRDEGDGLVAFSSDEELTMAMSYVKDDIFRIYIYEKKECRRDHRPPCAQEAPRN	120
p62-S332E	GGFQAHYRDEGDGLVAFSSDEELTMAMSYVKDDIFRIYIYEKKECRRDHRPPCAQEAPRN	120
*****		
p62-wt	MVHPNVICDGCNGPVVGTTRYKCSVCPDYDLCVCEGKGLHRGHTKLAFFSPFGHLESGFS	180
p62-S332E	MVHPNVICDGCNGPVVGTTRYKCSVCPDYDLCVCEGKGLHRGHTKLAFFSPFGHLESGFS	180
*****		
p62-wt	HSRWLRKVKHGHFGWPGWEMGPPGNWSPRPPRAGEARPGPTAESASGPSSEDPVSNFLKNV	240
p62-S332E	HSRWLRKVKHGHFGWPGWEMGPPGNWSPRPPRAGEARPGPTAESASGPSSEDPVSNFLKNV	240
*****		
p62-wt	GESVAAALSPLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSPESSTEKSSSQSSCCSDPSKPGGNV	300
p62-S332E	GESVAAALSPLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSPESSTEKSSSQSSCCSDPSKPGGNV	300
*****		
p62-wt	EGATQSLAEQMRKIALSEGRPEEQMESDNCGGDDDWTHLSSKEVDPSTGELQSLQMP	360
p62-S332E	EGATQSLAEQMRKIALSEGRPEEQMESDNCGGDDDWTHLSSKEVDPSTGELQSLQMP	360
*****		
p62-wt	SEGPSSLDPSQEGPTGLKEAALYPHLPPEADPRLIESLSQMLSMGFSDEGGWLRLLQTK	420
p62-S332E	SEGPSSLDPSQEGPTGLKEAALYPHLPPEADPRLIESLSQMLSMGFSDEGGWLRLLQTK	420
*****		
p62-wt	NYDIGAALDTIQYSKHPPPL	440
p62-S332E	NYDIGAALDTIQYSKHPPPL	440
*****		

## B



## C



**Figura 41. La fosforilación en S332E en p62 regula los niveles de TRAIL-R2/DR5. (A)** Alineamiento de secuencia entre p62 *wildtype* y el mutante p62-S332E. **(B)** Western blot de TRAIL-R2/DR5 en U87MG con sobre-expresión de p62 *wildtype* y mutantes, tratadas con SGI-1776 (5μM) O/N. **(C)** Medida de apoptosis tras sobre-expresión de p62 *wildtype* y mutante, tras el tratamiento con SGI-1776 y TRAIL durante 48 horas.

Globalmente, nuestros resultados demuestran que los niveles de TRAIL-R2/DR5 están regulados por la fosforilación de p62-Ser332, lo que puede justificar al menos en parte, el

incremento del TRAIL-R2/DR5 como mediador de la apoptosis inducida por TRAIL tras la inhibición de Pim quinasas.

### La inhibición de las Pim quinasas también sensibiliza a TRAIL en otros modelos tumorales

Dada la alta capacidad de sensibilizar a TRAIL que presenta la inhibición de Pim en GBM, quisimos testar su eficacia en otros modelos tumorales. Con este fin, probamos la terapia combinada en A549 (cáncer de pulmón), MCF7 (cáncer de mama), MUM2B (melanoma uveal), G361 (melanoma cutáneo), HEPG2 (hepatocarcinoma) and PANC1 (cáncer de páncreas).

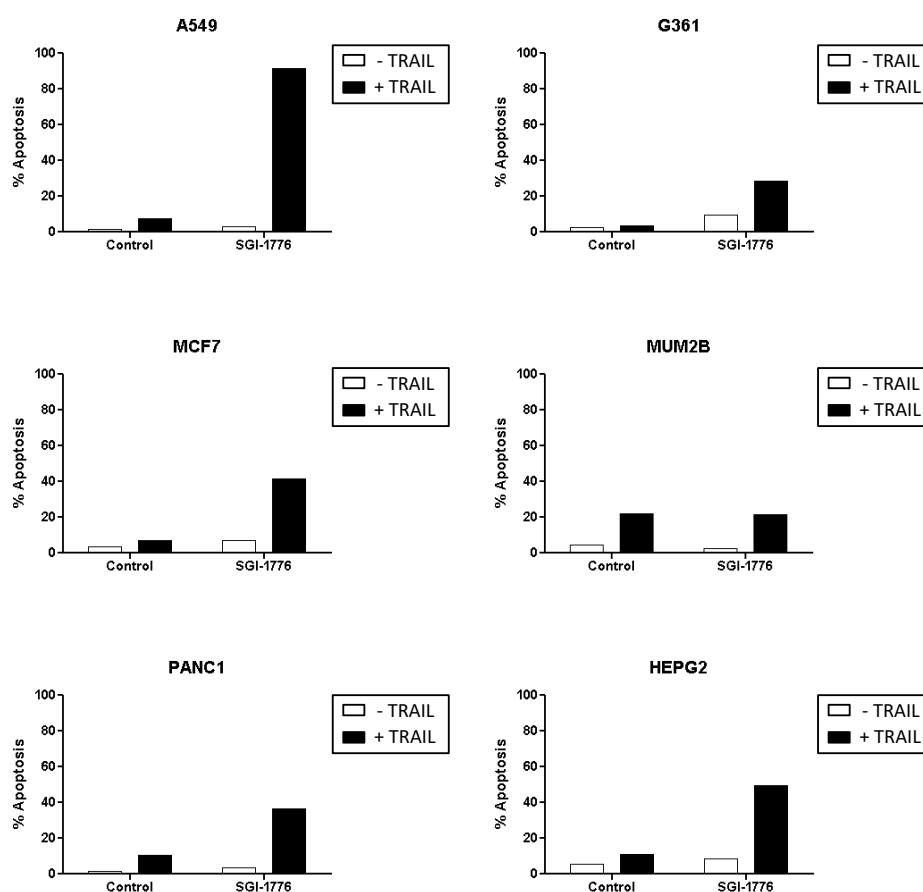
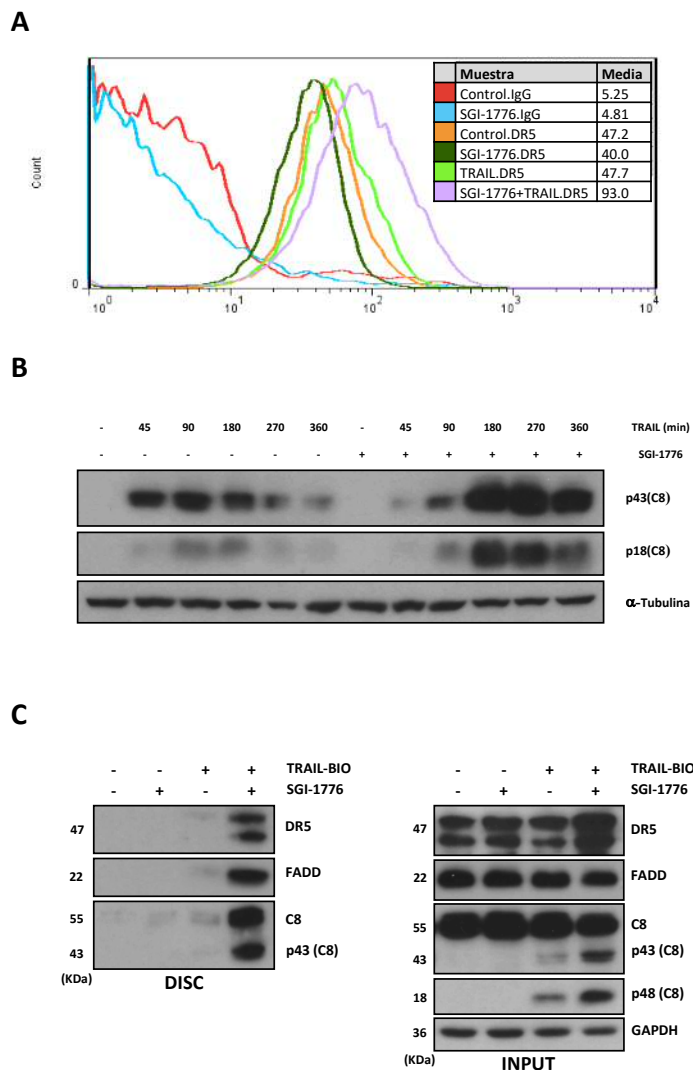


Figura 42. Efecto del tratamiento combinado en otros modelos tumorales. Medida de apoptosis (SubG1) tras 48 horas de tratamiento con SGI-1776 (5µM) y TRAIL 500ng/mL.

El *screening* mostró resultados dispares en las células testadas. A549, HEPG2, MCF7 y PANC1 mostraron sensibilización a TRAIL tras la inhibición de Pim. Por el contrario, las células de melanoma se mostraron más resistentes. G361 presentó una sensibilización muy ligera. MUM2B

eran parcialmente sensibles a TRAIL, pero no se potenció su efecto tras la inhibición de Pim (Figura 42).

Los prometedores resultados obtenidos en A549 nos llevaron a investigar más el efecto de la combinación en este modelo. Observamos un incremento de TRAIL-R2/DR5 en membrana tras 6 horas de tratamiento con la combinación SGI-1776 + TRAIL. En este caso, las células tratadas con el inhibidor mostraban el doble de receptores en membrana tras 6 horas de TRAIL (Figura 43A). De acuerdo a esto, un curso del tiempo del tratamiento con TRAIL mostraba más activación de caspasa-8 en las células pre-tratadas con SGI-1776 (Figura 43B). Al igual que en células de GBM, las células A549 presentaban mayores niveles de TRAIL-R2/DR5 y más formación de DISC tras la inhibición de Pim quinasas (Figura 43C).



**Figura 43. La inhibición de Pim incrementa la formación del DISC y la activación de caspasa-8 en A549.** (A) Medida de TRAIL-R2/DR5 en membrana por citometría de flujo. Las células fueron pre-tratadas con SGI-1776 (5 $\mu$ M) seguidas de 6 horas de TRAIL. (B) Medida de activación de caspasa-8 en un curso del tiempo de TRAIL de 45 minutos a 6 horas en células pre-tratadas con SGI-1776. (C) Ensayo de formación de DISC en células pre-tratadas con SGI-1776 seguido de 6 horas de TRAIL.

Aunque el objetivo del Proyecto era investigar el efecto de la inhibición de Pim sobre la sensibilización a TRAIL en células de GBM, los prometedores resultados nos llevaron a comprobar otros modelos. No obstante, pese a que los experimentos llevados a cabo en A549 parecen definir una tendencia similar a los observados en células de GBM, no podemos afirmar que el mecanismo de acción sea el mismo en la sensibilización observa en cada modelo y se requerirían de más experimentos confirmatorios. Sin embargo, nuestro trabajo presenta la primera evidencia de que la inhibición de Pim media la sensibilización a TRAIL en distintos modelos tumorales y propone un nuevo marco de investigación en el campo de la apoptosis mediada por TRAIL y los mecanismos que regulan su resistencia.





# DISCUSIÓN

---



## Discusión

A pesar de la intensa investigación que se está desarrollando en la actualidad, el GBM sigue sin tener una alternativa terapéutica eficaz que ofrezca una esperanza curativa a los pacientes. La rápida proliferación de estos tumores, acompañada de la consecuente aparición de zonas de hipoxia aguda, así como la alta tasa de difusión de células tumorales a través del tejido cerebral, hacen imposible la eliminación de estos tumores mediante cirugía. Además, la presencia de GSCs, sub-población de células tumorales con capacidad de regenerar el tumor y altamente resistente al tratamiento con radio- y quimioterapia, favorecen la reaparición de la enfermedad tras la eliminación de la masa primaria [10]. Este pésimo escenario, unido a la alta heterogeneidad intra- e inter-tumoral que se presenta, nos permite entender la complejidad que presentan estos tumores y nos ayuda a explicar el panorama poco esperanzador que se les plantea a los pacientes al ser diagnosticados con esta enfermedad. La mejora en los métodos de detección, así como avances en la metodología quirúrgica, o la incorporación de nuevas alternativas terapéuticas

(bevacizumab, NovoTTF-100, irinotecán o lomustina) han mejorado la calidad de vida del paciente e incluso han incrementado algo la progresión libre de enfermedad, pero no parece haber presentado un efecto claro sobre la supervivencia [50, 57, 59, 60]. De este modo, la esperanza de vida de los pacientes de GBM sigue estando en torno a los 14 meses [50], y la búsqueda de una alternativa terapéutica eficaz contra este tipo de tumores sigue suponiendo en la actualidad un gran reto para la investigación biomédica.

Considerando esta premisa de orfandad terapéutica en un tipo de cáncer que es el tumor cerebral primario más frecuente en adultos, con una incidencia de 3,19/100000 [6, 7], urge la necesidad de encontrar tratamientos alternativos que ofrezcan alguna esperanza de curación a estos pacientes. En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue diseñar una estrategia novedosa mediante terapias basadas en el ligando de muerte TRAIL. Lo más interesante de estas terapias es su gran selectividad para inducir apoptosis solo en células tumorales [115]. Sin embargo, pese al entusiasmo inicial que supuso el hallazgo de esta citoquina, la escasa eficiencia de estos tratamientos en ensayos clínicos [118], unida a la identificación de una amplia nómina de células resistentes a TRAIL en estudios pre-clínicos han hecho disminuir el optimismo inicial. Como demostraron Bellail *et al.* [21] y nosotros hemos corroborado con nuestros resultados, la mayoría de las células de GBM son resistentes a TRAIL. Esto guio nuestras investigaciones a la búsqueda de una nueva terapia combinada que mostrara eficacia para sensibilizar a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL.

Nuestro trabajo supone la primera evidencia de que la inhibición de Pim quinasas sensibiliza a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL, sugiriendo un nuevo modelo terapéutico en la lucha contra esta enfermedad. Pese a que hemos sido muy rigurosos en determinar una dosis del inhibidor de Pim que sea sub-letal mediante ensayos de dosis-respuesta en los que hemos incluido además células no tumorales, somos conscientes de que el fármaco SGI-1776 ha presentado toxicidad en pacientes, fallando en ensayos clínicos de fase I (NCT00848601, NCT01239108). El mensaje que pretende enviar este trabajo no es la utilización de este inhibidor como tratamiento contra el GBM, sino el de identificar a las Pim quinasas como diana terapéutica, definiendo un nuevo modelo en las terapias basadas en TRAIL. Sin embargo, SGI-1776 sigue siendo muy útil como prueba de concepto ya que se ha demostrado sobradamente su gran eficacia para inhibir a la familia Pim de manera altamente específica a nivel pre-clínico [252]. No obstante, a la hora de definir el mecanismo de sensibilización a TRAIL, hemos optado por silenciar a las Pim quinasas, acompañando a la inhibición química, y solo hemos rehusado de utilizar siRNA ante ciertas

limitaciones experimentales. La familia Pim está compuesta por tres miembros muy similares en estructura y función por lo que su inhibición genética requiere del silenciamiento simultáneo de las diferentes isoformas [197]. Nuestros resultados refuerzan esta idea ya que al eliminar individualmente los miembros de la familia Pim no se observaba prácticamente ningún efecto sobre la sensibilización a TRAIL. Esta alta redundancia se traslada también a modelos *in vivo*, donde es necesaria la realización de un triple *knockout* para observar el fenotipo característico de ratones deficientes en Pim quinasas [225]. Nuestros resultados mostraron además otro aspecto interesante. En U87MG, línea celular que expresa Pim2 y Pim3, la eliminación de una de ellas incrementaba los valores de la otra, lo que sugiere una regulación compensatoria entre los miembros de esta familia de quinasas. Finalmente, optamos por el silenciamiento conjunto de ambas Pim quinasas, lo que se ajustó más a los resultados obtenidos tras la inhibición química.

Otra cuestión importante a reseñar es el tipo de muerte celular que induce el tratamiento combinado. Chen *et al.* utilizaron SGI-1776 en monoterapia para tratar células de CLL, obteniendo niveles elevados de muerte celular. Sin embargo, al tratar con inhibidores de caspasas, no reducían dichos niveles [252]. Nuestros resultados muestran que el inhibidor de Pim a dosis de 10 $\mu$ M producía un profundo efecto en células de GBM, sin embargo, coincidiendo en parte con los resultados obtenidos por Chen *et al.*, los inhibidores de caspasas solo conseguían reducir la muerte celular parcialmente. Posteriormente, el silenciamiento de Pim quinasas no mostró en absoluto muerte celular, lo que confirma que esta muerte celular se debe a algún tipo de citotoxicidad independiente de la inhibición de Pim quinasas en el modelo de GBM. El tratamiento combinado de dosis sub-letales de SGI-1776 con TRAIL en cambio inducía muerte celular totalmente prevenible con inhibidores de caspasas. Esos experimentos confirman la importancia de inhibir Pim quinasas en aras de determinar nuevas dianas terapéuticas y abren un nuevo marco de investigación para la búsqueda de fármacos que puedan ser utilizados de forma segura en ensayos clínicos.

Es importante reflexionar sobre el modelo tumoral en el que estamos trabajando. A nivel terapéutico, los tumores cerebrales presentan el inconveniente adicional del paso de fármacos a través la barrera hematoencefálica. Pese a que en nuestro trabajo hemos testado con éxito el tratamiento combinado en diferentes tipos de células de GBM (células primarias, cultivos enriquecidos en GSCs o células sometidas a hipoxia), lo cierto es que no hemos realizado ensayos *in vivo*. Esto nos impide conocer variables como toxicidad, estabilidad, perfusión o eficacia del tratamiento en el contexto de un organismo vivo. Pese a todo, trabajos como el de Fulda *et al.*

han demostrado que las terapias combinadas con TRAIL pueden ser llevadas a cabo en modelos ortotópicos de GBM con resultados exitosos [188]. Además, la investigación biomédica ha mostrado notables avances en los últimos años. A día de hoy se han propuesto nuevas vías de tratamiento [345], o la generación de nano-anticuerpos, con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica [346], que podrían sustituir a los anticuerpos agonistas de TRAIL-R que se han utilizado en diversos ensayos clínicos.

Volviendo a la gran resistencia que muestran las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL, el trabajo de Bellail *et al.* demostró que el silenciamiento de determinadas proteínas inhibitoras como cFLIP, PEA-15 o RIP1 sensibilizaban a estas células a la muerte inducida por TRAIL [21]. Ese trabajo sienta un precedente interesante, ya que los autores demostraron que una activación eficaz de caspasa-8 en el DISC puede ser suficiente para sensibilizar a las células de glioma a este tipo de terapias. De manera similar, nuestros resultados muestran una fuerte activación de caspasa-8 tras el tratamiento combinado, pero no al tratar solo con el ligando de muerte. Sin embargo, no observamos ningún efecto de la inhibición o silenciamiento de las Pim quinasas en la expresión de los inhibidores de la activación de caspasa-8 cFLIP y PEA-15, lo que nos obligaba a la búsqueda de un mecanismo alternativo para determinar la sensibilización observada a TRAIL. Tanto cFLIP como PEA-15 inhiben la activación de caspasas iniciadoras, operando directamente en el sitio de entrada de éstas en el DISC: el dominio DED de FADD [347]. Descartada esta posibilidad, tuvimos que acotar el punto de la ruta donde se ejercía la relación entre la inhibición de Pim y la ruta de apoptosis extrínseca. Como demuestran nuestros resultados, las células de GBM son 'tipo II' en cuanto a la necesidad de activar la ruta mitocondrial para la inducción de apoptosis por el ligando TRAIL. Además, ejerciendo un bloqueo de la vía mitocondrial, demostramos que se impedía la activación de caspasas efectoras, pero no iniciadoras, lo que nos daba pie a pensar que el efecto de la inhibición de Pim sobre la ruta se producía aguas arriba de la mitocondria. Experimentos posteriores de aislamiento del DISC confirmaban que el inhibidor de Pim modulaba la activación de caspasa-8 directamente en el DISC.

Los experimentos de aislamiento del DISC ofrecieron información adicional, ya que el silenciamiento de Pim incrementaba los niveles de DRs. El aumento de la expresión de estos receptores ha sido propuesto por multitud de investigaciones como causa de la sensibilización a TRAIL. TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 son los dos únicos receptores de TRAIL con capacidad de transmitir señales apoptóticas al interior de la célula [22]. Nuestros resultados han demostrado que solo TRAIL-R2/DR5 media la apoptosis inducida por TRAIL en células de

GBM. Curiosamente, los resultados muestran un carácter inhibitorio de TRAIL-R1/DR4 en las células U87MG, hecho que no se ha descrito con anterioridad. Sin embargo, dado que el presente trabajo planteaba otros objetivos, no hemos indagado en este hecho, más allá de confirmar que DR5 es el receptor encargado de activar la apoptosis mediada por TRAIL en GBM.

La mayoría de los trabajos que versan sobre el aumento de la expresión de DRs en la sensibilización a TRAIL explican este incremento a través de un aumento a nivel transcripcional. Una de las vías más ampliamente descritas en la sensibilización a TRAIL es el aumento a nivel de mensajero de DR5 inducido por estrés reticular a través de CHOP [182, 183]. Si nos remitimos a los experimentos iniciales que sirvieron como germen de esta tesis, altas dosis de inhibidores de PARP sensibilizan a las células de GBM a la muerte celular inducida por TRAIL. Karper-Massler *et al.* demostraron con posterioridad que dosis de 10 $\mu$ M de Olaparib y 40 $\mu$ M de PJ34 favorecían la expresión de DR5 mediada por CHOP [348]. Nuestros resultados descartaron la implicación de PARP1 en la sensibilización a TRAIL, y basándonos en el trabajo de Antolin *et al.*, que afirmaba que altas dosis de PJ34 podían inhibir a la familia de las Pim quinasas, iniciamos este proyecto [331]. Sin embargo, experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, pero no mostrados en la tesis, han descartado la implicación de CHOP en el incremento de DR5 producido por la inhibición de Pim quinasas.

Adentrándonos en el mecanismo, nuestros resultados descartan un aumento transcripcional tanto de los receptores como de los ligandos de la familia de TNF- $\alpha$ , lo que sugiere que el aumento del receptor está mediado a nivel post-transcripcional. Adicionalmente, los resultados de medida de componentes del DISC demuestran que tiene lugar un incremento específico de DR5, quedando descartado para DR4. Finalmente, este incremento de los niveles de proteína se ve reflejado en una mayor presencia de receptores en membrana, lo que explica la mayor formación de DISC y consecuente activación de caspasa-8.

A diferencia de TNF-R1 y CD95, los receptores de TRAIL son internalizados a través de la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina [78, 175, 176]. Esta vía de señalización es diana de caspasas, siendo la cadena pesada de clatrina diana de caspasas-3 y el adaptador AP20 diana de caspasa-8 [78]. De este modo, la activación de caspasas interrumpe la internalización de los DRs, amplificando la activación de la ruta a nivel del DISC. Nuestros resultados demuestran que DR5 es rápidamente internalizado tras el tratamiento con TRAIL. Sin embargo, al silenciar las Pim quinasas, la internalización disminuye claramente, superando la acción anti-apoptótica



mediada por esta vía endocítica. La activación sostenida de caspasa-8 hasta las 9 horas de tratamientos confirma dicha premisa. Sin embargo, a partir de nuestros resultados no podemos determinar si la disrupción de la internalización es causa o consecuencia de la activación de caspasa-8 mediada por la inhibición de Pim.

En lo que se refiere al mecanismo, hemos demostrado que, tras el silenciamiento de Pim quinasas, el perfil de fosforilación de la proteína p62/SQSTM1 se ve alterado significativamente. Pese a que el trabajo de Jin *et al.* indicaba un papel pro-apoptótico de esta proteína, facilitando la activación completa de caspasa-8 tras su ubiquitinación por CUL-3 [164], es sabido que p62 funciona como receptor en la mediación de la autofagia selectiva, uniendo proteínas ubiquitinadas a LC3, lo que promueve la degradación vía lisosomal [258]. De hecho, Hou *et al.* demostraron que la degradación activa de caspasa-8 puede suponer una protección frente a la activación de apoptosis [349]. Considerando estos precedentes, parece que las modificaciones post-transduccionales en caspasa-8 son fundamentales para el destino de ésta. Nuestros datos confirman que, al menos en el modelo de GBM, p62 interacciona con el DISC ejerciendo una función anti-apoptótica. A pesar de que no tenemos una visión global del mecanismo de regulación que ejercen las Pim quinasas sobre la activación de caspasa-8, hemos confirmado que el silenciamiento de Pim impide la unión entre p62 y el DISC, lo que favorece la activación de caspasas.

P62 está relacionada con la internalización de algunos receptores de membrana [350], lo que sugiere que la fosforilación de esta proteína por las Pim quinasas podría estar reduciendo la presencia de TRAIL-R2/DR5 en la superficie de la célula. Esto podría explicar la mayor presencia de este receptor en membrana tras el silenciamiento de Pim, así como la interrupción en la internalización que observamos tras el tratamiento con TRAIL. Di *et al.* demostraron que la degradación de los receptores de TRAIL vía autofagia favorece la resistencia al tratamiento con ligandos de muerte [351]. Es importante recordar que la interacción entre TRAIL-R2/DR5 y p62 se observa en nuestro modelo de forma basal, lo que sugiere que los niveles de TRAIL-R2/DR5 podrían estar regulados por autofagia selectiva a través de p62. El GBM presenta altos niveles de autofagia cito-protectora en respuesta a agentes quimioterapéuticos [352] y la resistencia a TRAIL puede ser restaurada tras la inhibición de autofagia en diferentes modelos tumorales [352, 353]. Curiosamente, una de las fosforilaciones que disminuye en p62 tras la inhibición de Pim quinasas es la de Ser332 en el dominio LIR. La fosforilación del dominio LIR juega un papel importante en la regulación de la autofagia selectiva. Se ha descrito que la fosforilación de la Ser177 de OPTN

regula positivamente la interacción entre esta y LC3, favoreciendo la autofagia [344]. De forma similar, la fosforilación de las Ser17 y Ser24 que flanquean el dominio LIR de BNIP3 favorecen su actividad mitofágica [354]. Sin embargo, no existen evidencias experimentales de que la fosforilación del LIR en p62 regule su actividad. El silenciamiento de p62, así como la inhibición de la degradación vía lisosomal, aumentan los niveles totales de TRAIL-R2/DR5, sugiriendo que la autofagia selectiva podría estar regulando la estabilidad del receptor. Nuestro trabajo confirma que la fosforilación de la Ser332 p62 regula negativamente la expresión de TRAIL-R2/DR5.

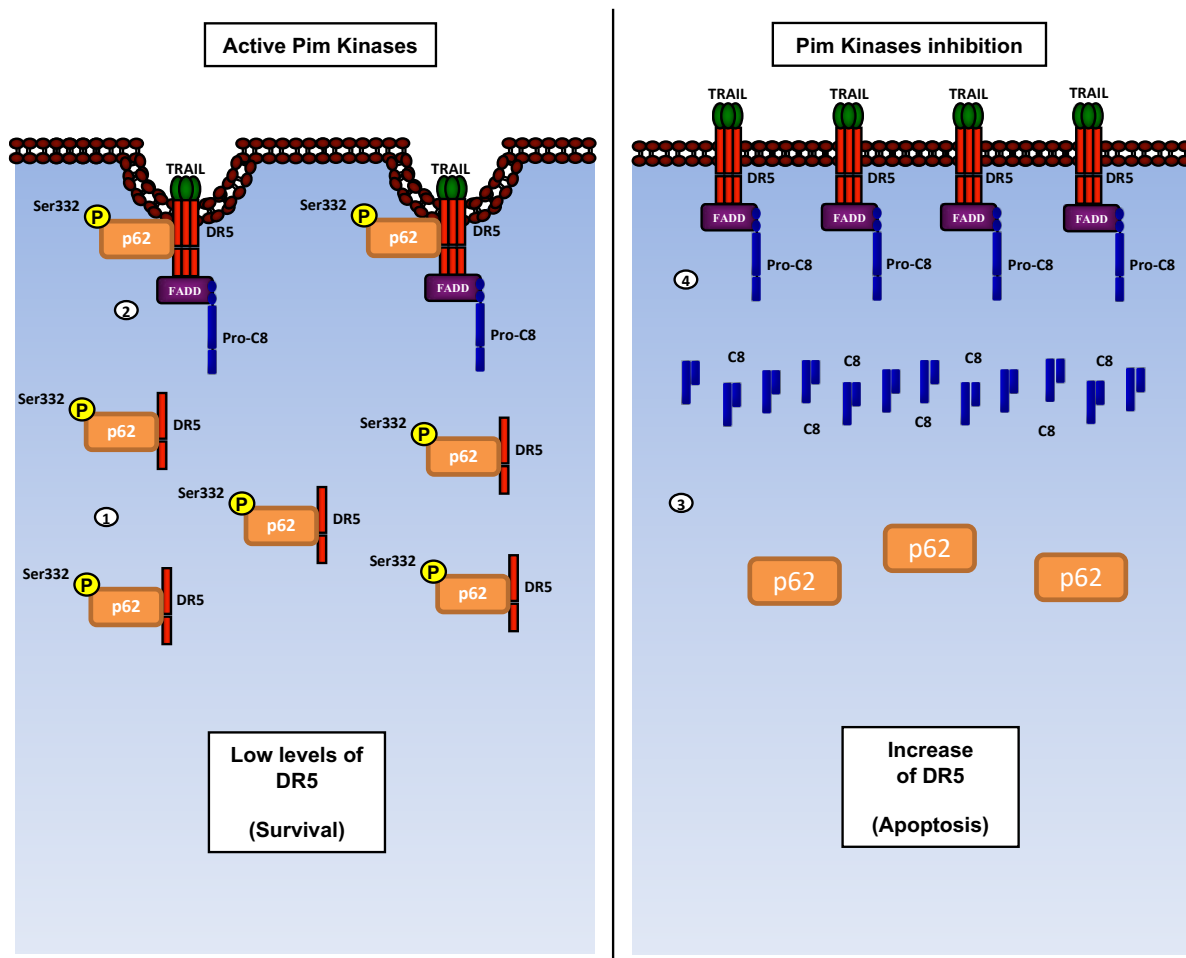
Ha sido demostrado que los receptores de muerte en GBM forman pre-complejos en ausencia de TRAIL. Estos pre-complejos están presentes solo en células resistentes a TRAIL, y se componen de TRAIL-R2, RIP1, TRAF2 y A20 [192]. Pese a que en este trabajo no se propuso a p62 como parte de estos pre-complejos, nuestros resultados demuestran que TRAIL-R2/DR5 está constitutivamente unido a p62 incluso antes de la formación del DISC, lo que podría estar regulando el destino de estos pre-complejos.

P62 es una proteína altamente compleja, que puede ser muy sutilmente regulada a nivel post-transduccional. Además, puede interactuar con otras proteínas como RIP1, o TRAF2, lo que favorece la activación de rutas de supervivencia [264]. Una de estas rutas es la vía de NFκB. A pesar de que no hemos indagado en la posibilidad de que p62 esté regulando la supervivencia celular por interacción con el DISC, nuestros resultados muestran que tras la inhibición de Pim, se produce una importante reducción en la expresión de genes diana de NFκB como BIRC2 y 3 (IAPs). Como hemos mencionado anteriormente, RIP1 favorece la resistencia a TRAIL en el modelo de GBM [21]. De este modo, la interacción de p62 con el DISC podría justificar la presencia de RIP1 en el complejo. Pese a que se requiere más trabajo experimental para confirmar estas ideas, lo cierto es que a juzgar por nuestros resultados, el papel de p62 en la activación de caspasas en el DISC es más complejo de lo descrito inicialmente por Jin *et al.* [164].

En resumen, nuestros resultados representan la primera evidencia de que Pim quinasas regulan la apoptosis inducida por TRAIL en células de GBM. Ante un contexto de inhibición de Pim (química o genética), TRAIL-R2/DR5 aumenta, favoreciendo la formación de DISC y por tanto la activación de caspasa-8. En esta investigación hemos encontrado que p62 juega un papel importante en el incremento de TRAIL-R2/DR5. De manera basal, p62 está fosforilado e interactúa con TRAIL-R2/DR5, lo que justifica su presencia en el DISC tras el tratamiento con TRAIL. En este escenario, los niveles de formación del complejo son muy bajos y se

internalizan rápidamente, lo que repercute en una escasa activación de caspasa-8, insuficiente para activar apoptosis. Por el contrario, tras la inhibición de Pim quinasas, la interacción entre p62 y TRAIL-R2/DR5 se revierte, lo que impide la presencia de p62 en el DISC. En estas circunstancias aumentan los niveles de TRAIL-R2/DR5, y se favorece una mayor formación de complejos, que además son más estables en membrana, permitiendo una mayor activación de caspasa-8 de forma sostenida en el tiempo. Descartado el aumento transcripcional, la defosforilación de p62 parece tener un papel en la estabilidad de TRAIL-R2/DR5, promoviendo el incremento de este receptor.

En conjunto, la inhibición de Pim quinasas puede representar una alternativa terapéutica en la potenciación de la muerte celular mediada por TRAIL en pacientes de GBM, quedando abierta la opción de extenderse a otros modelos tumorales.



**Figura 44. Resumen del mecanismo propuesto para la resistencia a TRAIL mediada por Pim quinasas en GBM.** (1) En un contexto de Pim quinasas activas, nuestros resultados muestran una interacción basal entre p62 y TRAIL-R2/DR5 (Figura 39C). (2) El tratamiento con TRAIL induce una baja formación de DISC (Figura 30), incrementando la interacción de p62 con caspasa-8 (Figura 37) y una rápida internalización de TRAIL-R2/DR5 (Figura 33B). (3) La inhibición de Pim revierte la interacción entre p62 y TRAIL-R2/DR5 (Figura 39C), incrementando los niveles del DR (Figuras 32A-B). (4) Ante este escenario, al tratar con TRAIL, la estabilización de receptores en membrana favorece la formación del DISC (Figuras 30), induciendo la activación de caspasa-8 (Figura 26A-B) y la apoptosis (Figuras 19, 20, 23, 24 y 25).

# CONCLUSIONES

---



## Conclusiones

1. La inhibición, tanto química (SGI-1776) como genética (siPIM2/3), de Pim quinasas sensibiliza a las células de GBM a la muerte inducida por TRAIL.
2. TRAIL-R2/DR5 es el receptor implicado en la activación de caspasa-8 y la apoptosis en células de GBM tras inhibición de Pim quinasas y tratamiento con TRAIL.
3. Aunque la sensibilización de células de GBM a TRAIL por inhibición de las Pim quinasas tiene lugar a nivel de la caspasa-8 iniciadora, se requiere la activación posterior de la ruta mitocondrial para que ocurra la apoptosis.

4. El silenciamiento de las Pim quinasas incrementa los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular, lo que favorece una mayor formación del DISC.
5. El silenciamiento de Pim quinasas retrasa la internalización de dicho receptor tras el tratamiento con TRAIL, favoreciendo de esta forma la activación sostenida de caspasa-8.
6. La inhibición de Pim quinasas altera ampliamente la firma de fosforilación de la célula, reduciendo notablemente las fosforilaciones de p62/SQSTM1 en Ser24, Thr269 y Ser332.
7. P62/SQSTM1 interacciona a nivel basal con TRAIL-R2/DR5 y el silenciamiento de Pim quinasas impide dicha unión.
8. El silenciamiento de p62/SQSTM1 incrementa los niveles de TRAIL-R2/DR5 y favorece la activación de caspasa-8 tras el tratamiento con TRAIL.
9. El mutante de p62/SQSTM1 constitutivamente fosforilado en Ser332 reduce notablemente el incremento de TRAIL-R2/DR5 producido por la inhibición de Pim quinasas y bloquea en gran medida la apoptosis mediada por el tratamiento combinado.

## REFERENCIAS

---





## Referencias

1. Sherr, C.J., *Principles of tumor suppression*. Cell, 2004. **116**(2): p. 235-46.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
5. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.
6. Krakstad, C. and M. Chekenya, *Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 135.
7. Gallego, O., *Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma*. Curr Oncol, 2015. **22**(4): p. e273-81.
8. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(4): p. 764-72.
9. Watanabe, K., et al., *Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas*. Brain Pathol, 1996. **6**(3): p. 217-23; discussion 23-4.
10. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
11. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(3): p. 153-66.

12. Dengler, V.L., M. Galbraith, and J.M. Espinosa, *Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014. **49**(1): p. 1-15.
13. Kaur, B., et al., *Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005. **7**(2): p. 134-53.
14. Karcher, S., et al., *Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2182-9.
15. Delgado-Bellido, D., et al., *Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 65.
16. Wang, R., et al., *Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium*. Nature, 2010. **468**(7325): p. 829-33.
17. van Lith, S.A., et al., *Glutamate as chemotactic fuel for diffuse glioma cells: are they glutamate suckers?* Biochim Biophys Acta, 2014. **1846**(1): p. 66-74.
18. Darmanis, S., et al., *Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma*. Cell Rep, 2017. **21**(5): p. 1399-1410.
19. Stegh, A.H., et al., *Glioma oncoprotein Bcl2L12 inhibits the p53 tumor suppressor*. Genes Dev, 2010. **24**(19): p. 2194-204.
20. Roth, W., et al., *Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2759-65.
21. Bellail, A.C., et al., *DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(6A): p. 1303-17.
22. Gonzalez, F. and A. Ashkenazi, *New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL*. Oncogene, 2010. **29**(34): p. 4752-65.
23. Karpel-Massler, G., et al., *Combined inhibition of Bcl-2/Bcl-xL and Usp9X/Bag3 overcomes apoptotic resistance in glioblastoma in vitro and in vivo*. Oncotarget, 2015. **6**(16): p. 14507-21.
24. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
25. Hambardzumyan, D., D.H. Gutmann, and H. Kettenmann, *The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression*. Nat Neurosci, 2016. **19**(1): p. 20-7.
26. Zhou, W., et al., *Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(2): p. 170-82.
27. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
28. Mizoguchi, M., et al., *Loss of heterozygosity analysis in malignant gliomas*. Brain Tumor Pathol, 2011. **28**(3): p. 191-6.
29. Alekseeva, E.A., et al., *Loss of heterozygosity and uniparental disomy of chromosome region 10q23.3-26.3 in glioblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2018. **57**(1): p. 42-47.
30. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
31. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
32. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
33. Bao, S., et al., *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 756-60.
34. Bleau, A.M., et al., *PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(3): p. 226-35.
35. Rama, A.R., et al., *ABC transporters as differentiation markers in glioblastoma cells*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(8): p. 4847-51.
36. Bradshaw, A., et al., *Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme*. Front Surg, 2016. **3**: p. 48.
37. Trepant, A.L., et al., *Identification of OLIG2 as the most specific glioblastoma stem cell marker starting from comparative analysis of data from similar DNA chip microarray platforms*. Tumour Biol, 2015. **36**(3): p. 1943-53.

38. Dahlrot, R.H., et al., *What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas?* Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(3): p. 334-48.
39. Bao, S., et al., *Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth.* Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6043-8.
40. Yanagisawa, M., *Stem cell glycolipids.* Neurochem Res, 2011. **36**(9): p. 1623-35.
41. Lagadec, C., et al., *The RNA-binding protein Musashi-1 regulates proteasome subunit expression in breast cancer- and glioma-initiating cells.* Stem Cells, 2014. **32**(1): p. 135-44.
42. Lathia, J.D., et al., *Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells.* Cell Stem Cell, 2010. **6**(5): p. 421-32.
43. Bradshaw, A., et al., *Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme.* Front Surg, 2016. **3**: p. 21.
44. Vermeulen, L., et al., *The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities.* Lancet Oncol, 2012. **13**(2): p. e83-9.
45. Wang, W., et al., *Dynamics between cancer cell subpopulations reveals a model coordinating with both hierarchical and stochastic concepts.* PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84654.
46. Landy, H.J., et al., *Early MRI findings in high grade glioma.* J Neurooncol, 2000. **47**(1): p. 65-72.
47. Shukla, G., et al., *Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review.* Chin Clin Oncol, 2017. **6**(4): p. 40.
48. Verger, A. and K.J. Langen, *PET Imaging in Glioblastoma: Use in Clinical Practice*, in *Glioblastoma*, S. De Vleeschouwer, Editor. 2017: Brisbane (AU).
49. Omuro, A. and L.M. DeAngelis, *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review.* JAMA, 2013. **310**(17): p. 1842-50.
50. Delgado-Lopez, P.D. and E.M. Corrales-Garcia, *Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities.* Clin Transl Oncol, 2016. **18**(11): p. 1062-1071.
51. Beier, D., J.B. Schulz, and C.P. Beier, *Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected.* Mol Cancer, 2011. **10**: p. 128.
52. Szczepanek, D., et al., *Efficacy of concomitant and adjuvant temozolomide in glioblastoma treatment. A multicentre randomized study.* Neurol Neurochir Pol, 2013. **47**(2): p. 101-8.
53. Xing, W.K., et al., *The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis.* Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 3341-8.
54. Ashby, L.S., K.A. Smith, and B. Stea, *Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review.* World J Surg Oncol, 2016. **14**(1): p. 225.
55. Diaz, R.J., et al., *The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma.* J Neurooncol, 2017. **133**(3): p. 455-467.
56. Gerstner, E.R., et al., *VEGF inhibitors in the treatment of cerebral edema in patients with brain cancer.* Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(4): p. 229-36.
57. Gilbert, M.R., et al., *A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma.* N Engl J Med, 2014. **370**(8): p. 699-708.
58. Burger, M.C., et al., *Bevacizumab for Patients with Recurrent Multifocal Glioblastomas.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(11).
59. Wick, W., et al., *Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma.* N Engl J Med, 2017. **377**(20): p. 1954-1963.
60. Friedman, H.S., et al., *Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma.* J Clin Oncol, 2009. **27**(28): p. 4733-40.
61. Prados, M.D., et al., *Toward precision medicine in glioblastoma: the promise and the challenges.* Neuro Oncol, 2015. **17**(8): p. 1051-63.
62. Piccirillo, S.G., et al., *Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells.* Nature, 2006. **444**(7120): p. 761-5.

63. Caren, H., S. Beck, and S.M. Pollard, *Differentiation therapy for glioblastoma - too many obstacles?* Mol Cell Oncol, 2016. **3**(2): p. e1124174.
64. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3-11.
65. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(7): p. 545-50.
66. Saunders, J.W., Jr., *Death in embryonic systems*. Science, 1966. **154**(3749): p. 604-12.
67. Clarke, P.G. and S. Clarke, *Nineteenth century research on cell death*. Exp Oncol, 2012. **34**(3): p. 139-45.
68. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
69. Ellis, H.M. and H.R. Horvitz, *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. Cell, 1986. **44**(6): p. 817-29.
70. Yuan, J. and H.R. Horvitz, *A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis*. Cell, 2004. **116**(2 Suppl): p. S53-6, 1 p following S59.
71. Hengartner, M.O., R.E. Ellis, and H.R. Horvitz, *Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death*. Nature, 1992. **356**(6369): p. 494-9.
72. Degtarev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
73. Salvesen, G.S. and A. Ashkenazi, *Snapshot: caspases*. Cell, 2011. **147**(2): p. 476-476 e1.
74. Pihan, P., A. Carreras-Sureda, and C. Hetz, *BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise*. Cell Death Differ, 2017. **24**(9): p. 1478-1487.
75. Saraste, A. and K. Pulkki, *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(3): p. 528-37.
76. Wen, L.P., et al., *Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 26056-61.
77. Dechat, T., et al., *Nuclear lamins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(11): p. a000547.
78. Austin, C.D., et al., *Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10283-10288.
79. Swanton, E., N. Bishop, and P. Woodman, *Human rabaptin-5 is selectively cleaved by caspase-3 during apoptosis*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37583-90.
80. Burke, B., *Lamins and apoptosis: a two-way street?* J Cell Biol, 2001. **153**(3): p. F5-7.
81. Broers, J.L. and F.C. Ramaekers, *The role of the nuclear lamina in cancer and apoptosis*. Adv Exp Med Biol, 2014. **773**: p. 27-48.
82. Rao, L., D. Perez, and E. White, *Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis*. J Cell Biol, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1441-55.
83. Casiano, C.A., et al., *Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/ APO-1)-mediated T cell apoptosis*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 765-70.
84. Larsen, B.D. and C.S. Sorensen, *The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond*. FEBS J, 2017. **284**(8): p. 1160-1170.
85. Sanchez-Osuna, M., et al., *An intrinsic DFF40/CAD endonuclease deficiency impairs oligonucleosomal DNA hydrolysis during caspase-dependent cell death: a common trait in human glioblastoma cells*. Neuro Oncol, 2016. **18**(7): p. 950-61.
86. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
87. Suzuki, J., et al., *Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells*. Science, 2013. **341**(6144): p. 403-6.
88. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 107-20.
89. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 99-163.

90. Garcia-Saez, A.J., *The secrets of the Bcl-2 family*. Cell Death Differ, 2012. **19**(11): p. 1733-40.
91. Riedl, S.J. and G.S. Salvesen, *The apoptosome: signalling platform of cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(5): p. 405-13.
92. Acehan, D., et al., *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 423-32.
93. Yuan, S., et al., *Structure of an apoptosome-procaspase-9 CARD complex*. Structure, 2010. **18**(5): p. 571-83.
94. Billen, L.P., A. Shamas-Din, and D.W. Andrews, *Bid: a Bax-like BH3 protein*. Oncogene, 2008. **27 Suppl 1**: p. S93-104.
95. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1463-7.
96. Poreba, M., et al., *Small Molecule Active Site Directed Tools for Studying Human Caspases*. Chem Rev, 2015. **115**(22): p. 12546-629.
97. Vandenberghe, P., T. Vandenberghe, and N. Festjens, *Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways*. Sci STKE, 2006. **2006**(358): p. pe44.
98. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death Differ, 2018. **25**(3): p. 486-541.
99. Keoni, C.L. and T.L. Brown, *Inhibition of Apoptosis and Efficacy of Pan Caspase Inhibitor, Q-VD-OPh, in Models of Human Disease*. J Cell Death, 2015. **8**: p. 1-7.
100. Galluzzi, L., et al., *Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015*. Cell Death Differ, 2015. **22**(1): p. 58-73.
101. Ekert, P.G., J. Silke, and D.L. Vaux, *Inhibition of apoptosis and clonogenic survival of cells expressing crmA variants: optimal caspase substrates are not necessarily optimal inhibitors*. EMBO J, 1999. **18**(2): p. 330-8.
102. Ray, C.A., et al., *Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme*. Cell, 1992. **69**(4): p. 597-604.
103. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. **151**(1): p. 10-27.
104. Han, Z., et al., *A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13432-6.
105. Bouchier-Hayes, L. and D.R. Green, *Caspase-2: the orphan caspase*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 51-7.
106. Vitale, I., et al., *Caspase 2 in mitotic catastrophe: The terminator of aneuploid and tetraploid cells*. Mol Cell Oncol, 2017. **4**(3): p. e1299274.
107. Dickens, L.S., et al., *A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death*. Mol Cell, 2012. **47**(2): p. 291-305.
108. Tinel, A., et al., *Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway*. EMBO J, 2007. **26**(1): p. 197-208.
109. Jimenez Fernandez, D. and M. Lamkanfi, *Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death*. Biol Chem, 2015. **396**(3): p. 193-203.
110. Roy, N., et al., *The c-LAP-1 and c-LAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 6914-25.
111. Silke, J. and P. Meier, *Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(2).
112. Tenev, T., et al., *The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs*. Mol Cell, 2011. **43**(3): p. 432-48.
113. Martinez-Garcia, D., et al., *Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer*. Med Res Rev, 2018.
114. Pennarun, B., et al., *Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1805**(2): p. 123-40.

115. Ashkenazi, A., et al., *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. J Clin Invest, 1999. **104**(2): p. 155-62.
116. Walczak, H., et al., *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 157-63.
117. Lemke, J., et al., *Getting TRAIL back on track for cancer therapy*. Cell Death Differ, 2014. **21**(9): p. 1350-64.
118. de Miguel, D., et al., *Onto better TRAILs for cancer treatment*. Cell Death Differ, 2016. **23**(5): p. 733-47.
119. Allen, J.E. and W.S. El-Deiry, *Regulation of the human TRAIL gene*. Cancer Biol Ther, 2012. **13**(12): p. 1143-51.
120. Jiang, W., et al., *Insight into the role of TRAIL in liver diseases*. Biomed Pharmacother, 2018. **110**: p. 641-645.
121. Kloss, V., et al., *Interaction and Mutual Activation of Different Innate Immune Cells Is Necessary to Kill and Clear Hepatitis C Virus-Infected Cells*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1238.
122. Cretney, E., et al., *Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1356-61.
123. Kawakubo, T., et al., *Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10869-78.
124. Yang, J., et al., *TRAIL mediates and sustains constitutive NF-kappaB activation in LGL leukemia*. Blood, 2018. **131**(25): p. 2803-2815.
125. van Roosmalen, I.A., W.J. Quax, and F.A. Kruyt, *Two death-inducing human TRAIL receptors to target in cancer: similar or distinct regulation and function?* Biochem Pharmacol, 2014. **91**(4): p. 447-56.
126. Valley, C.C., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces death receptor 5 networks that are highly organized*. J Biol Chem, 2012. **287**(25): p. 21265-78.
127. Scott, F.L., et al., *The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 1019-22.
128. Vanamee, E.S. and D.L. Faustman, *Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling*. Sci Signal, 2018. **11**(511).
129. Algeciras-Schimmich, A., et al., *Molecular ordering of the initial signaling events of CD95*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(1): p. 207-20.
130. Clancy, L., et al., *Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18099-104.
131. Chan, F.K., et al., *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2351-4.
132. Micheau, O., et al., *Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7987-92.
133. Simons, K. and W.L. Vaz, *Model systems, lipid rafts, and cell membranes*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2004. **33**: p. 269-95.
134. Ouyang, W., et al., *Absence of death receptor translocation into lipid rafts in acquired TRAIL-resistant NSCLC cells*. Int J Oncol, 2013. **42**(2): p. 699-711.
135. Vanoosten, R.L., et al., *Depsipeptide (FR901228) enhances the cytotoxic activity of TRAIL by redistributing TRAIL receptor to membrane lipid rafts*. Mol Ther, 2005. **11**(4): p. 542-52.
136. Song, J.H., et al., *Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells*. Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6946-55.
137. Rossin, A., et al., *Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling*. Biochem J, 2009. **419**(1): p. 185-92, 2 p following 192.

138. Gajate, C. and F. Mollinedo, *Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts*. *Blood*, 2007. **109**(2): p. 711-9.
139. Gajate, C., F. Gonzalez-Camacho, and F. Mollinedo, *Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells*. *PLoS One*, 2009. **4**(4): p. e5044.
140. Hughes, M.A., et al., *Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival*. *Mol Cell*, 2009. **35**(3): p. 265-79.
141. Schleich, K., et al., *Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model*. *Mol Cell*, 2012. **47**(2): p. 306-19.
142. Horn, S., et al., *Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8-Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF- $\kappa$ B Activation and Cell Survival*. *Cell Rep*, 2017. **19**(4): p. 785-797.
143. Budd, R.C., W.C. Yeh, and J. Tschopp, *cFLIP regulation of lymphocyte activation and development*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(3): p. 196-204.
144. Scaffidi, C., et al., *The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(3): p. 1541-8.
145. Boatright, K.M., et al., *Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L)*. *Biochem J*, 2004. **382**(Pt 2): p. 651-7.
146. Hughes, M.A., et al., *Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate*. *Mol Cell*, 2016. **61**(6): p. 834-49.
147. Condorelli, G., et al., *PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis*. *Oncogene*, 1999. **18**(31): p. 4409-15.
148. Xiao, C., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25020-5.
149. Varfolomeev, E., et al., *Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(49): p. 40599-608.
150. Brenner, D., H. Blaser, and T.W. Mak, *Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(6): p. 362-74.
151. Lavrik, I.N., et al., *CD95 stimulation results in the formation of a novel death effector domain protein-containing complex*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(39): p. 26401-8.
152. Milani, D., et al., *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sequentially activates pro-survival and pro-apoptotic pathways in SK-N-MC neuronal cells*. *J Neurochem*, 2003. **86**(1): p. 126-35.
153. Zhang, X.D., et al., *Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria*. *Oncogene*, 2003. **22**(19): p. 2869-81.
154. Wu, P., et al., *Inhibition of MEK sensitizes gastric cancer cells to TRAIL-induced apoptosis*. *Neoplasia*, 2014. **61**(2): p. 136-43.
155. Vilimanovich, U. and V. Bumbasirevic, *TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(5): p. 814-26.
156. Sun, B.K., et al., *TRAIL-induced caspase/p38 activation is responsible for the increased catalytic and invasive activities of Akt*. *Int J Oncol*, 2011. **38**(1): p. 249-56.
157. Xu, J., et al., *Activation of the Akt survival pathway contributes to TRAIL resistance in cancer cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10226.
158. Powley, I.R., et al., *Caspase-8 tyrosine-380 phosphorylation inhibits CD95 DISC function by preventing procaspase-8 maturation and cycling within the complex*. *Oncogene*, 2016. **35**(43): p. 5629-5640.
159. Matthess, Y., et al., *Sequential Cdk1 and Plk1 phosphorylation of caspase-8 triggers apoptotic cell death during mitosis*. *Mol Oncol*, 2014. **8**(3): p. 596-608.



160. Peng, C., et al., *Phosphorylation of caspase-8 (Thr-263) by ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) mediates caspase-8 ubiquitination and stability*. J Biol Chem, 2011. **286**(9): p. 6946-54.
161. Zamaraev, A.V., et al., *Post-translational Modification of Caspases: The Other Side of Apoptosis Regulation*. Trends Cell Biol, 2017. **27**(5): p. 322-339.
162. Renganathan, H., et al., *Phosphorylation of PE4-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD*. Biochem J, 2005. **390**(Pt 3): p. 729-35.
163. Alappat, E.C., et al., *Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKIalpha regulates its nonapoptotic activities*. Mol Cell, 2005. **19**(3): p. 321-32.
164. Jin, Z., et al., *Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling*. Cell, 2009. **137**(4): p. 721-35.
165. Bekes, M. and G.S. Salvesen, *The CULt of caspase-8 ubiquitination*. Cell, 2009. **137**(4): p. 604-6.
166. Gonzalez, F., et al., *TRAF2 Sets a threshold for extrinsic apoptosis by tagging caspase-8 with a ubiquitin shutoff timer*. Mol Cell, 2012. **48**(6): p. 888-99.
167. Li, Y., et al., *The HECTD3 E3 ubiquitin ligase facilitates cancer cell survival by promoting K63-linked polyubiquitination of caspase-8*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e935.
168. Lafont, E., et al., *The linear ubiquitin chain assembly complex regulates TRAIL-induced gene activation and cell death*. EMBO J, 2017. **36**(9): p. 1147-1166.
169. van de Kooij, B., et al., *Ubiquitination by the membrane-associated RING-CH-8 (MARCH-8) ligase controls steady-state cell surface expression of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor 1*. J Biol Chem, 2013. **288**(9): p. 6617-28.
170. Wagner, K.W., et al., *Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1070-7.
171. Dufour, F., et al., *N-glycosylation of mouse TRAIL-R and human TRAIL-R1 enhances TRAIL-induced death*. Cell Death Differ, 2017. **24**(3): p. 500-510.
172. Micheau, O., *Regulation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Signaling by Glycosylation*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(3).
173. McMahon, H.T. and E. Boucrot, *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(8): p. 517-33.
174. Sorkin, A. and M. von Zastrow, *Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 609-22.
175. Kohlhaas, S.L., et al., *Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12831-41.
176. Reis, C.R., et al., *TRAIL-death receptor endocytosis and apoptosis are selectively regulated by dynamin-1 activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(3): p. 504-509.
177. Zhang, Y. and B. Zhang, *TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(12): p. 1861-71.
178. Wu, Y.H., et al., *Removal of syndecan-1 promotes TRAIL-induced apoptosis in myeloma cells*. J Immunol, 2012. **188**(6): p. 2914-21.
179. Twomey, J.D., et al., *Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells*. Drug Resist Updat, 2015. **19**: p. 13-21.
180. Kim, S.Y., J.H. Kim, and J.J. Song, *c-Cbl shRNA-expressing adenovirus sensitizes TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer DU-145 through increases of DR4/5*. Cancer Gene Ther, 2013. **20**(2): p. 82-7.
181. Song, J.J., et al., *c-Cbl-mediated degradation of TRAIL receptors is responsible for the development of the early phase of TRAIL resistance*. Cell Signal, 2010. **22**(3): p. 553-63.
182. Lu, M., et al., *Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis*. Science, 2014. **345**(6192): p. 98-101.
183. Martin-Perez, R., et al., *Activated ERBB2/HER2 licenses sensitivity to apoptosis upon endoplasmic reticulum stress through a PERK-dependent pathway*. Cancer Res, 2014. **74**(6): p. 1766-77.

184. Bruning, A., et al., *Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis*. Invest New Drugs, 2009. **27**(6): p. 543-51.
185. Ryu, S., et al., *The regulation of combined treatment-induced cell death with recombinant TRAIL and bortezomib through TRAIL signaling in TRAIL-resistant cells*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 432.
186. Hao, Z. and T.W. Mak, *Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP*. J Mol Cell Biol, 2010. **2**(2): p. 63-4.
187. El-Mesery, M., M.E. Shaker, and A. Elgaml, *The SMAC mimetic BV6 induces cell death and sensitizes different cell lines to TNF-alpha and TRAIL-induced apoptosis*. Exp Biol Med (Maywood), 2016. **241**(18): p. 2015-2022.
188. Fulda, S., et al., *Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 808-15.
189. Flusberg, D.A. and P.K. Sorger, *Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(8): p. 446-58.
190. Lovric, M.M. and C.J. Hawkins, *TRAIL treatment provokes mutations in surviving cells*. Oncogene, 2010. **29**(36): p. 5048-60.
191. Ashkenazi, A., *Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions*. J Clin Invest, 2015. **125**(2): p. 487-9.
192. Bellail, A.C., et al., *A20 ubiquitin ligase-mediated polyubiquitination of RIP1 inhibits caspase-8 cleavage and TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma*. Cancer Discov, 2012. **2**(2): p. 140-55.
193. Cristofanon, S. and S. Fulda, *ABT-737 promotes tBid mitochondrial accumulation to enhance TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e432.
194. Bangert, A., et al., *Histone deacetylase inhibitors sensitize glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by c-myc-mediated downregulation of cFLIP*. Oncogene, 2012. **31**(44): p. 4677-88.
195. Meeker, T.C., et al., *Characterization of the human PIM-1 gene: a putative proto-oncogene coding for a tissue specific member of the protein kinase family*. Oncogene Res, 1987. **1**(1): p. 87-101.
196. Narlik-Grassow, M., C. Blanco-Aparicio, and A. Carnero, *The PIM family of serine/threonine kinases in cancer*. Med Res Rev, 2014. **34**(1): p. 136-59.
197. Nawijn, M.C., A. Alendar, and A. Berns, *For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 23-34.
198. Beharry, Z., et al., *The Pim protein kinases regulate energy metabolism and cell growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(2): p. 528-33.
199. Jinesh, G.G., et al., *Pim kinase isoforms: devils defending cancer cells from therapeutic and immune attacks*. Apoptosis, 2016. **21**(11): p. 1203-1213.
200. Jinesh, G.G., N.M. Laing, and A.M. Kamat, *Smac mimetic with TNF-alpha targets Pim-1 isoforms and reactive oxygen species production to abrogate transformation from blebbishields*. Biochem J, 2016. **473**(1): p. 99-107.
201. Borillo, G.A., et al., *Pim-1 kinase protects mitochondrial integrity in cardiomyocytes*. Circ Res, 2010. **106**(7): p. 1265-74.
202. Miura, O., et al., *Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4135-41.
203. Matikainen, S., et al., *Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells*. Blood, 1999. **93**(6): p. 1980-91.
204. Castro, A., et al., *IL-4 selectively inhibits IL-2-triggered Stat5 activation, but not proliferation, in human T cells*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1261-9.
205. Zhu, N., et al., *CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 744-54.
206. Bachmann, M. and T. Moroy, *The serine/threonine kinase Pim-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(4): p. 726-30.
207. Warfel, N.A. and A.S. Kraft, *PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors*. Pharmacol Ther, 2015. **151**: p. 41-9.

208. Chen, J., et al., *Hypoxia-mediated up-regulation of Pim-1 contributes to solid tumor formation*. Am J Pathol, 2009. **175**(1): p. 400-11.
209. Chen, J., et al., *Pim-1 plays a pivotal role in hypoxia-induced chemoresistance*. Oncogene, 2009. **28**(28): p. 2581-92.
210. Casillas, A.L., et al., *Hypoxia-Inducible PIM Kinase Expression Promotes Resistance to Antiangiogenic Agents*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(1): p. 169-180.
211. Palaty, C.K., et al., *Phosphorylation site substrate specificity determinants for the Pim-1 protooncogene-encoded protein kinase*. Biochem Cell Biol, 1997. **75**(2): p. 153-62.
212. Amaravadi, R. and C.B. Thompson, *The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2618-24.
213. Yuan, L.L., et al., *Pim kinases phosphorylate Chk1 and regulate its functions in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2014. **28**(2): p. 293-301.
214. Zhang, Y., et al., *Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation*. Oncogene, 2008. **27**(35): p. 4809-19.
215. Decker, S., et al., *PIM kinases are essential for chronic lymphocytic leukemia cell survival (PIM2/3) and CXCR4-mediated microenvironmental interactions (PIM1)*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(5): p. 1231-45.
216. Li, Z., et al., *PIM1 kinase phosphorylates the human transcription factor FOXP3 at serine 422 to negatively regulate its activity under inflammation*. J Biol Chem, 2014. **289**(39): p. 26872-81.
217. Zippo, A., et al., *PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(8): p. 932-44.
218. Zhou, B.P., et al., *HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(11): p. 973-82.
219. Hogan, C., et al., *Elevated levels of oncogenic protein kinase Pim-1 induce the p53 pathway in cultured cells and correlate with increased Mdm2 in mantle cell lymphoma*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 18012-23.
220. Santio, N.M., et al., *Phosphorylation of Notch1 by Pim kinases promotes oncogenic signaling in breast and prostate cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(28): p. 43220-43238.
221. Zhou, B.P., et al., *Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 245-52.
222. Wang, Z., et al., *Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1593**(1): p. 45-55.
223. Nihira, K., et al., *Pim-1 controls NF-kappaB signalling by stabilizing RelA/p65*. Cell Death Differ, 2010. **17**(4): p. 689-98.
224. Lu, J., et al., *Pim2 is required for maintaining multiple myeloma cell growth through modulating TSC2 phosphorylation*. Blood, 2013. **122**(9): p. 1610-20.
225. Mikkers, H., et al., *Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(13): p. 6104-15.
226. Morishita, D., et al., *Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels*. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5076-85.
227. Jessus, C. and R. Ozon, *Function and regulation of cdc25 protein phosphate through mitosis and meiosis*. Prog Cell Cycle Res, 1995. **1**: p. 215-28.
228. Bachmann, M., et al., *The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48319-28.
229. Bachmann, M., et al., *The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(3): p. 430-43.

230. Mochizuki, T., et al., *Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway.* J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18659-66.
231. Aho, T.L., et al., *Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site.* FEBS Lett, 2004. **571**(1-3): p. 43-9.
232. Chen, L.S., et al., *Mechanisms of cytotoxicity to Pim kinase inhibitor, SGI-1776, in acute myeloid leukemia.* Blood, 2011. **118**(3): p. 693-702.
233. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.* Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
234. Santio, N.M., et al., *The PIM1 kinase promotes prostate cancer cell migration and adhesion via multiple signalling pathways.* Exp Cell Res, 2016. **342**(2): p. 113-24.
235. Chatterjee, S., B. Behnam Azad, and S. Nimmagadda, *The intricate role of CXCR4 in cancer.* Adv Cancer Res, 2014. **124**: p. 31-82.
236. Bialopiotrowicz, E., et al., *Microenvironment-induced PIM kinases promote CXCR4-triggered mTOR pathway required for chronic lymphocytic leukaemia cell migration.* J Cell Mol Med, 2018. **22**(7): p. 3548-3559.
237. Kim, J., M. Roh, and S.A. Abdulkadir, *Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-MYC transcriptional activity.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 248.
238. Aho, T.L., et al., *Pim-1 kinase phosphorylates RUNX family transcription factors and enhances their activity.* BMC Cell Biol, 2006. **7**: p. 21.
239. Gingras, A.C., et al., *Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1.* Genes Dev, 2001. **15**(21): p. 2852-64.
240. Yanagiya, A., et al., *Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E.* Mol Cell, 2012. **46**(6): p. 847-58.
241. Hammerman, P.S., et al., *Pim and Akt oncogenes are independent regulators of hematopoietic cell growth and survival.* Blood, 2005. **105**(11): p. 4477-83.
242. Duncan, R., S.C. Milburn, and J.W. Hershey, *Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F.* J Biol Chem, 1987. **262**(1): p. 380-8.
243. Rosenwald, I.B., et al., *Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6175-8.
244. Zhang, F., et al., *PIM1 protein kinase regulates PRAS40 phosphorylation and mTOR activity in FDCP1 cells.* Cancer Biol Ther, 2009. **8**(9): p. 846-53.
245. Jones, P.M. and A.M. George, *The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research.* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(6): p. 682-99.
246. Xie, Y., et al., *Pim-1 kinase protects P-glycoprotein from degradation and enables its glycosylation and cell surface expression.* Mol Pharmacol, 2010. **78**(2): p. 310-8.
247. Yang, Q., et al., *Combination of Pim kinase inhibitor SGI-1776 and bendamustine in B-cell lymphoma.* Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2013. **13 Suppl 2**: p. S355-62.
248. Natarajan, K., et al., *The Pim kinase inhibitor SGI-1776 decreases cell surface expression of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and drug transport by Pim-1-dependent and -independent mechanisms.* Biochem Pharmacol, 2013. **85**(4): p. 514-24.
249. Zhang, M., et al., *Pim1 supports human colorectal cancer growth during glucose deprivation by enhancing the Warburg effect.* Cancer Sci, 2018. **109**(5): p. 1468-1479.
250. Blanco-Aparicio, C. and A. Carnero, *Pim kinases in cancer: diagnostic, prognostic and treatment opportunities.* Biochem Pharmacol, 2013. **85**(5): p. 629-43.
251. Zhang, X., et al., *PIM Kinase as an Executional Target in Cancer.* J Cancer Prev, 2018. **23**(3): p. 109-116.
252. Chen, L.S., et al., *Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells.* Blood, 2009. **114**(19): p. 4150-7.

253. Siu, A., C. Virtanen, and J. Jongstra, *PIM kinase isoform specific regulation of MIG6 expression and EGFR signaling in prostate cancer cells*. *Oncotarget*, 2011. **2**(12): p. 1134-44.
254. Kim, W., et al., *PIM1 kinase inhibitors induce radiosensitization in non-small cell lung cancer cells*. *Pharmacol Res*, 2013. **70**(1): p. 90-101.
255. Cortes, J., et al., *Phase I studies of AZD1208, a proviral integration Moloney virus kinase inhibitor in solid and haematological cancers*. *Br J Cancer*, 2018. **118**(11): p. 1425-1433.
256. Park, I., et al., *Phosphotyrosine-independent binding of a 62-kDa protein to the src homology 2 (SH2) domain of p56lck and its regulation by phosphorylation of Ser-59 in the lck unique N-terminal region*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(26): p. 12338-42.
257. Vadlamudi, R.K., et al., *p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(34): p. 20235-7.
258. Katsuragi, Y., Y. Ichimura, and M. Komatsu, *p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor*. *FEBS J*, 2015. **282**(24): p. 4672-8.
259. Xu, L.Z., et al., *p62/SQSTM1 enhances breast cancer stem-like properties by stabilizing MYC mRNA*. *Oncogene*, 2017. **36**(3): p. 304-317.
260. Kitamura, H., et al., *Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue*. *Histopathology*, 2006. **48**(2): p. 157-61.
261. Inoue, D., et al., *Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma*. *Cancer Sci*, 2012. **103**(4): p. 760-6.
262. Galavotti, S., et al., *The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells*. *Oncogene*, 2013. **32**(6): p. 699-712.
263. Li, L., et al., *SQSTM1 is a pathogenic target of 5q copy number gains in kidney cancer*. *Cancer Cell*, 2013. **24**(6): p. 738-50.
264. Taniguchi, K., et al., *p62/SQSTM1-Dr. Jekyll and Mr. Hyde that prevents oxidative stress but promotes liver cancer*. *FEBS Lett*, 2016. **590**(15): p. 2375-97.
265. Jain, A., et al., *p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(29): p. 22576-91.
266. Ling, J., et al., *KrasG12D-induced IKK2/beta/NF-kappaB activation by IL-1alpha and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(1): p. 105-20.
267. Zhong, Z., et al., *NF-kappaB Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria*. *Cell*, 2016. **164**(5): p. 896-910.
268. Liu, X.D., et al., *Transient aggregation of ubiquitinated proteins is a cytosolic unfolded protein response to inflammation and endoplasmic reticulum stress*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(23): p. 19687-98.
269. Puissant, A., et al., *Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation*. *Cancer Res*, 2010. **70**(3): p. 1042-52.
270. Vegliante, R., et al., *Dehydroepiandrosterone triggers autophagic cell death in human hepatoma cell line HepG2 via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression*. *Carcinogenesis*, 2016. **37**(3): p. 233-44.
271. Yeh, L.Y., et al., *miR-372 inhibits p62 in head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo*. *Oncotarget*, 2015. **6**(8): p. 6062-75.
272. Bjorkoy, G., et al., *Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1*. *Methods Enzymol*, 2009. **452**: p. 181-97.
273. Pursiheimo, J.P., et al., *Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62*. *Oncogene*, 2009. **28**(3): p. 334-44.
274. Duran, A., et al., *The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis*. *Dev Cell*, 2004. **6**(2): p. 303-9.
275. Rodriguez, A., et al., *Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62*. *Cell Metab*, 2006. **3**(3): p. 211-22.

276. Ramesh Babu, J., et al., *Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration*. J Neurochem, 2008. **106**(1): p. 107-20.
277. Cabe, M., et al., *PB1 and UBA domains of p62 are essential for aggresome-like induced structure formation*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **503**(4): p. 2306-2311.
278. Lamark, T., et al., *Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34568-81.
279. Christian, F., et al., *PKA phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates PB1 domain interaction partner binding*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): p. 2765-74.
280. Ren, J., et al., *Structural and biochemical insights into the homotypic PB1-PB1 complex between PKC $\zeta$  and p62*. Sci China Life Sci, 2014. **57**(1): p. 69-80.
281. Sanz, L., et al., *The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF- $\kappa$ B activation*. EMBO J, 1999. **18**(11): p. 3044-53.
282. Kim, G.Y., et al., *p62 binding to protein kinase C  $\zeta$  regulates tumor necrosis factor alpha-induced apoptotic pathway in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(12): p. 2974-80.
283. Linares, J.F., et al., *Amino Acid Activation of mTORC1 by a PB1-Domain-Driven Kinase Complex Cascade*. Cell Rep, 2015. **12**(8): p. 1339-52.
284. Nakamura, K., et al., *PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF- $\kappa$ B activation*. J Biol Chem, 2010. **285**(3): p. 2077-89.
285. Lin, Q., et al., *The HECT E3 ubiquitin ligase NEDD4 interacts with and ubiquitylates SQSTM1 for inclusion body autophagy*. J Cell Sci, 2017. **130**(22): p. 3839-3850.
286. Kirkin, V., et al., *NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets*. Autophagy, 2009. **5**(5): p. 732-3.
287. Pankiv, S., et al., *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24131-45.
288. Islam, M.A., M.A. Sooro, and P. Zhang, *Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(5).
289. Birgisdottir, A.B., T. Lamark, and T. Johansen, *The LIR motif - crucial for selective autophagy*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 15): p. 3237-47.
290. Ichimura, Y., et al., *Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy*. J Biol Chem, 2008. **283**(33): p. 22847-57.
291. Noda, N.N., et al., *Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy*. Genes Cells, 2008. **13**(12): p. 1211-8.
292. Kirkin, V., et al., *A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates*. Mol Cell, 2009. **33**(4): p. 505-16.
293. Deosaran, E., et al., *NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 4): p. 939-52.
294. Nguyen, T., P. Nioi, and C.B. Pickett, *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13291-5.
295. Lau, A., et al., *A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(13): p. 3275-85.
296. Paine, M.G., et al., *Evidence for p62 aggregate formation: role in cell survival*. FEBS Lett, 2005. **579**(22): p. 5029-34.
297. Seibenhener, M.L., et al., *Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(18): p. 8055-68.
298. Cohen-Kaplan, V., et al., *p62- and ubiquitin-dependent stress-induced autophagy of the mammalian 26S proteasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(47): p. E7490-E7499.
299. Lee, Y., et al., *Keap1/Cullin3 Modulates p62/SQSTM1 Activity via UBA Domain Ubiquitination*. Cell Rep, 2017. **19**(1): p. 188-202.
300. Matsumoto, G., et al., *Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins*. Mol Cell, 2011. **44**(2): p. 279-89.

301. Long, J., et al., *Dimerisation of the UBA domain of p62 inhibits ubiquitin binding and regulates NF- $\kappa$ B signalling*. J Mol Biol, 2010. **396**(1): p. 178-94.
302. Cundy, T., *Paget's disease of bone*. Metabolism, 2018. **80**: p. 5-14.
303. Muller, T.D., et al., *p62 links beta-adrenergic input to mitochondrial function and thermogenesis*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 469-78.
304. Rea, S.L., et al., *SQSTM1 mutations--bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD*. Exp Cell Res, 2014. **325**(1): p. 27-37.
305. Goode, A., et al., *Defective recognition of LC3B by mutant SQSTM1/p62 implicates impairment of autophagy as a pathogenic mechanism in ALS-FTLD*. Autophagy, 2016. **12**(7): p. 1094-104.
306. Freischmidt, A., et al., *Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia*. Nat Neurosci, 2015. **18**(5): p. 631-6.
307. Oakes, J.A., M.C. Davies, and M.O. Collins, *TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation*. Mol Brain, 2017. **10**(1): p. 5.
308. Rui, Y.N., et al., *Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(3): p. 262-75.
309. Martin, D.D., et al., *Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy*. Trends Neurosci, 2015. **38**(1): p. 26-35.
310. Song, P., et al., *Parkin promotes proteasomal degradation of p62: implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Protein Cell, 2016. **7**(2): p. 114-29.
311. Takamura, A., et al., *Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors*. Genes Dev, 2011. **25**(8): p. 795-800.
312. Wang, X., et al., *Beclin 1 and p62 expression in non-small cell lung cancer: relation with malignant behaviors and clinical outcome*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(9): p. 10644-52.
313. Valencia, T., et al., *Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-mTORC1 signaling promotes inflammation and tumorigenesis*. Cancer Cell, 2014. **26**(1): p. 121-135.
314. Linares, J.F., et al., *Phosphorylation of p62 by cdk1 controls the timely transit of cells through mitosis and tumor cell proliferation*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(1): p. 105-17.
315. Yu, H., et al., *p62/SQSTM1 involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by clearing ubiquitinated proteins*. Eur J Cancer, 2011. **47**(10): p. 1585-94.
316. Yan, X.Y., et al., *p62/SQSTM1 as an oncotarget mediates cisplatin resistance through activating RIP1-NF- $\kappa$ B pathway in human ovarian cancer cells*. Cancer Sci, 2017. **108**(7): p. 1405-1413.
317. Shi, C., et al., *Sequestosome 1 protects esophageal squamous carcinoma cells from apoptosis via stabilizing SKP2 under serum starvation condition*. Oncogene, 2018. **37**(24): p. 3260-3274.
318. Gstaiger, M., et al., *Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5043-8.
319. Lu, Z., et al., *Skp2 suppresses apoptosis in Rb1-deficient tumours by limiting E2F1 activity*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3463.
320. Kitagawa, M., S.H. Lee, and F. McCormick, *Skp2 suppresses p53-dependent apoptosis by inhibiting p300*. Mol Cell, 2008. **29**(2): p. 217-31.
321. Harper, N., et al., *Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF- $\kappa$ B activation by inhibition of apical caspases*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34743-52.
322. Compton, M.M., *A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome*. Cancer Metastasis Rev, 1992. **11**(2): p. 105-19.
323. Kall, L., et al., *Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets*. Nat Methods, 2007. **4**(11): p. 923-5.
324. Harper, N. and M. MacFarlane, *Recombinant TRAIL and TRAIL receptor analysis*. Methods Enzymol, 2008. **446**: p. 293-313.
325. Rodriguez-Vargas, J.M., et al., *Autophagy requires poly(adp-ribosylation)-dependent AMPK nuclear export*. Cell Death Differ, 2016. **23**(12): p. 2007-2018.

326. Majuelos-Melguizo, J., et al., *PARP targeting counteracts gliomagenesis through induction of mitotic catastrophe and aggravation of deficiency in homologous recombination in PTEN-mutant glioma*. *Oncotarget*, 2015. **6**(7): p. 4790-803.
327. Rodriguez, M.I., et al., *PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(6): p. e1003531.
328. O'Cearbhaill, R.E., *Using PARP Inhibitors in Advanced Ovarian Cancer*. *Oncology (Williston Park)*, 2018. **32**(7): p. 339-43.
329. *First PARP Inhibitor Ok'd for Breast Cancer*. *Cancer Discov*, 2018. **8**(3): p. 256-257.
330. Henning, R.J., M. Bourgeois, and R.D. Harbison, *Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and PARP Inhibitors: Mechanisms of Action and Role in Cardiovascular Disorders*. *Cardiovasc Toxicol*, 2018. **18**(6): p. 493-506.
331. Antolin, A.A., et al., *Identification of pim kinases as novel targets for PJ34 with confounding effects in PARP biology*. *ACS Chem Biol*, 2012. **7**(12): p. 1962-7.
332. Fan, R.F., et al., *PIM-1 kinase inhibitor SMI-4a exerts antitumor effects in chronic myeloid leukemia cells by enhancing the activity of glycogen synthase kinase 3beta*. *Mol Med Rep*, 2017. **16**(4): p. 4603-4612.
333. Song, J.H., et al., *Insulin receptor substrate 1 is a substrate of the Pim protein kinases*. *Oncotarget*, 2016. **7**(15): p. 20152-65.
334. Colwell, N., et al., *Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells*. *Neuro Oncol*, 2017. **19**(7): p. 887-896.
335. Tamura, K., et al., *Expansion of CD133-positive glioma cells in recurrent de novo glioblastomas after radiotherapy and chemotherapy*. *J Neurosurg*, 2013. **119**(5): p. 1145-55.
336. Yuan, X., et al., *Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme*. *Oncogene*, 2004. **23**(58): p. 9392-400.
337. Srinivasula, S.M., et al., *FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 18542-5.
338. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. *EMBO J*, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
339. Deveraux, Q.L., et al., *LAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. *EMBO J*, 1998. **17**(8): p. 2215-23.
340. McCann, C., et al., *Cytoplasmic FLIP(S) and nuclear FLIP(L) mediate resistance of castrate-resistant prostate cancer to apoptosis induced by LAP antagonists*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(11): p. 1081.
341. Serrano-Saenz, S., et al., *PIM kinases mediate resistance of glioblastoma cells to TRAIL by a p62/SQSTM1-dependent mechanism*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(2): p. 51.
342. Toth, C., et al., *The role of apoptosis repressor with a CARD domain (ARC) in the therapeutic resistance of renal cell carcinoma (RCC): the crucial role of ARC in the inhibition of extrinsic and intrinsic apoptotic signalling*. *Cell Commun Signal*, 2017. **15**(1): p. 16.
343. Tassi, E., et al., *Role of Apollon in human melanoma resistance to antitumor agents that activate the intrinsic or the extrinsic apoptosis pathways*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(12): p. 3316-27.
344. Wild, P., et al., *Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth*. *Science*, 2011. **333**(6039): p. 228-33.
345. Paldor, I., et al., *Targeted Local Therapy for Management of Intracranial High-Grade Gliomas*. *Prog Neurol Surg*, 2018. **32**: p. 159-171.
346. Rissiek, B., F. Koch-Nolte, and T. Magnus, *Nanobodies as modulators of inflammation: potential applications for acute brain injury*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 344.
347. Barnhart, B.C., et al., *The death effector domain protein family*. *Oncogene*, 2003. **22**(53): p. 8634-44.
348. Karpel-Massler, G., et al., *PARP inhibition restores extrinsic apoptotic sensitivity in glioblastoma*. *PLoS One*, 2014. **9**(12): p. e114583.



349. Hou, W., et al., *Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis*. *Autophagy*, 2010. **6**(7): p. 891-900.
350. Geetha, T. and M.W. Wooten, *Association of the atypical protein kinase C-interacting protein p62/ZIP with nerve growth factor receptor TrkA regulates receptor trafficking and Erk5 signaling*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(7): p. 4730-9.
351. Di, X., et al., *Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through downregulation of surface expression of death receptors 4 and 5*. *Oncotarget*, 2013. **4**(9): p. 1349-64.
352. Shen, J., et al., *Autophagy inhibition induces enhanced proapoptotic effects of ZD6474 in glioblastoma*. *Br J Cancer*, 2013. **109**(1): p. 164-71.
353. Liu, H., Z. He, and H.U. Simon, *Targeting autophagy as a potential therapeutic approach for melanoma therapy*. *Semin Cancer Biol*, 2013. **23**(5): p. 352-60.
354. Zhu, Y., et al., *Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(2): p. 1099-113.

**ANEXO**

---



# Anexo 1. Glosario de Abreviaturas

14-3-3	14-3-3 Protein
36B4	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
4EBP1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein 1
5-ALA	Ácido 5-amino-leivutírico
A20	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
ABCB1/G2	ATP-binding cassette transporter B1/G2
ADN	Acido desoxiribonucleico
AIF	apoptosis-inducing factor
AIM2	interferon-inducible protein 2
Akt	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
AML	Acute Myeloid Leukemia
AMP	Adenosín Monofosfato
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase
ANGPT1/2	Angiopoietina 1/2
AP20	Adaptator Protein 20
Apaf-1	Apoptosis Protease-Activating Factor-1
API5	Apoptosis Inhibitor 5
ApoL2/TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
ARHGDI1	Rho GDP-Dissociation Inhibitor 1
ARK5	AMPK-Related Protein Kinase 5
RNA	Ribonucleic Acid
ASC	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein
ATCC	American Type Culture Collection
Atg	Autophagy Related Protein
ATP	Adenosine Triphosphate
ATP1A2	ATPase NA/K Transporting Subunit Alpha 2
BAD	Bcl-2 Associated Death Promoter
BAK	Bcl-2 Antagonist/Killer 1
BAX	Bcl-2 Associated X Protein
BCAP31	B-cell Receptor-Associated Protein 31
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell Lymphoma 2-extra large
Bcl2L12	Bcl-2-Like Protein 12
BCR	Breakpoint Cluster Region Protein
BID	BH3 Interacting-Domain Death Agonist
BIK	Bcl-2 Interacting Killer
BIM	Bcl-2-Like Protein 11
BIR	Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat
BIRC	Baculoviral IAP Repeat Containing Gene
BMF	Bcl-2 Modifying Factor
Bmi1	Polycomb Complex Protein
BNIP3	Bcl-2 Interacting Protein 3

BOK	Bcl-2 Related Ovarian Killer
BRUCE	Baculovirus IAP Repeat (BIR)-Containing Ubiquitin-Conjugating Enzyme
BSA	Bovine Serum Albumin
c-Cbl	Casitas B-Lineage Lymphoma
c-MET	Tyrosine-Protein Kinase MET
c-MYB	MYB Proto-Oncogene Transcription Factor
c-Myc	MYC Proto-Oncogene Transcription Factor
CA9	Carbonic Anhydrase 9
CAD	Caspase-Activated Dnase
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CamKII	Ca/Calmodulin-Dependent Protein Kinase 2
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CASC3	Protein CASC3
Caspasa	Cysteine-Dependent Aspartic-Directed Proteases
Cdc	Cell-Division Cycle Protein
CDI	Coefficient of Drug Interaction
CDKs	Cyclin-Dependent Kinases
Ced	Cell Death Abnormality Gene
cFLIP	Cellular FLICE-Like Inhibitory Protein
Chk	Checkpoint Kinase Protein
CHOP	DNA Damage-Inducible Transcript 3 Protein
CK2	Casein Kinase 2
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia
CRD	Cysteine-Rich Domain
CrmA	Cowpox virus CrmA protein
CSC	Cancer Stem Cell
CT	Computed Tomography
ctDNA	Circulating Tumor DNA
Cull3	Cullin-3
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor Type 4
DAXX	Death Domain-Associated Protein 6
DcR1/2	TRAIL decoy receptor 1/2
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DR4/5	Death Receptor 4/5
DRAM1	DNA Damage-Regulated Autophagy Modulator 1
Dyn-1	Dynamamin-1
EDH1	EH Domain-Containing Protein 1
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Endothelial Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGL-1	Programmed Cell Death Activator egl-1
eIF-4B	Eukariotic Translation Initiation Factor 4B

eIF-4E	Eukariotic Translation Initiation Factor 4E
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EndoG	Endonuclease G
EPO	Erythropoietin
ERK1/2	Extracelular Signal-Regulated Kinases 1/2
ETK	Cytoplasmic Tyrosine-Protein Kinase BMX
EZR	Ezrin
FADD	Fas-Associated Protein with Death Domain
FAK	Focal Adhesion Kinase
FasL	Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 6
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FIS1	Mitochondrial Fission 1 Protein
fMRI	Fuctional Magnetic Resonance Imaging
Fox	Forkhead Box
FUNDC1	FUN14 Domain Containing 1
FXYD1	Phospholemman Protein
GALNT	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
Gas2	Growth Arrest-Specific Protein 2
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GO	Gene Ontology
gpP	Glicoprotein-P
GSC	Glioma Sten Cell
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
GSTA2	Glutathione S-Transferase A2
Gy	Gray
HD	Huntington Disease
HDAC	Histone Deacetylase
HECTD3	E3 Ubiquitin-Protein Ligase
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HK2	Hexokinase 2
HOIL-1	RanBP-Type and C3HC4-Type Zinc Finger-Containing Protein 1
HOIP	HOIL-1 Interacting Protein
HP1	Heterochromatin Protein 1
HRE	HIF-Responsive Element
HRK	Activator of Apoptosis Harakiri
HRP	Horseradish Peroxidase
HSA	Human Serum Albumin
HSP70/90	Heat Shock Protein 70/90 KDa
HTRA2	Serine Protease HTRA2, mitochondria
HTT	Huntingtin Protein
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein

IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
IF-4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
IKBKG	NF-kappa-B Essential Modulator
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-Tiogalactopiranósido
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRS2	Insulin receptor substrate 2
JNK	c-Jun N-Terminal Kinases
Keap1	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
KHDRBS1	KH Domain-Containing, RNA-Binding, Signal Transduction-Associated Protein 1
KIR	Keap1 Interacting Region
Klf	Kruppel-Like Factor
KO	Knockout
KPS	Karnofsky Performance Status Scale
L1CAM	L1 Cell Adhesion Molecule
LB	Luria-Bertani Medium
LC3	Microtubule-Associated Proteins 1A/1B Light Chain 3B
LDHA	Lactate Dehydrogenase A
Let-7a/b	Let-7 microRNA Precursor
LIR	LC3 Interacting Region
LKB1	Liver Kinase B1
LMO3	LIM Domain Only 3
LOH	Loss Of Heterozigosity
LPS	Lipopolysaccharide
LUBAC	Lineal Ubiquitination Assembly Complex
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MARCH-8	Membrane Associated Ring-CH-Type Finger 8
MCA	3-Methylcholanthrene
Mcl-1	Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein 1
MDM	Mouse Double Minute Homolog
MDR	Multi-Drug Resistant Proteín
MFF	Mitochondrial Fission Factor
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
miARN	microRNA
MIG6	Mitogen-Inducibile Gene 6 Protein
MKI67	Marker of Prolifeeration Ki-67
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MS-MS	Tandem Mass Spectrometry
mTOR	Mamalian Target of Rapamycin
NANOG	Homeobox Protein NANOG
NBR1	Neighbor of BRCA Gene 1 Protein
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
ND	Not Determined
NDP52	Calcium-Binding and Coiled-Coil Domain-Containing Protein 2
NEDD4	E3 Ubiquitin-Protein Ligase NEDD4
NEMO	NF-Kappa-B Essential Modulator
NF1	Neurofibromin 1
NFATc1	Nuclear Factor of Activated T-Cell Cytoplasmic 1
NFkB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells
NIAP	Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein
NIX	Bcl-2/Adenovirus E1B 19KDa Protein-Interacting Protein 3-Like
NK	Natural Killer
Nlrc4	NLR Family CARD Domain-Containing Protein 4
Nlrp	NLR Family Purin Domain Containing
NLS	Nuclear Localization Signal
NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors
NOL3	Nucleolar Protein 3
NOS	Nitric Oxide Synthase
Notch1	Notch Transmembrane Proteins Type 1
Noxa	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
NRF2	Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2
NuMa	Nuclear Mitotic Apparatus Protein 1
Oct4	POU Domain, Class 5, Transcription Factor 1
O/N	Overnight
Olig2	Oligodendrocyte Transcription Factor
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPG	Osteoprotegerin
OPTN	Optineurin
OS	Overall Survival
p14ARF	Tumor Suppressor ARF
p16Ink4a	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
p21CIP1/WAF1	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1
p27kip	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B
p38d	Mitogen-Activated Protein Kinase 13
p40phox	Neutrophil Cytosol Factor 4
p53	Cellular Tumor Antigen p53
p56lck	Lymphocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase
p62/SQSTM1	Sequestrome-1
p67phox	Neutrophil Cytosol Factor 2
PAK2	Serine/Threonine-Protein Kinase PAK 2
Par6	Partitioning Defective 6 Homolog Alpha
PARK2	Parkin
PARP-1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PB1	Phox and Bem1 Domain
PBS	Phosphate Buffered Saline



PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Parkinson Disease
PDB	Paget's Disease of Bone
PDE4A4	cAMP-Specific 3',5'-Cyclic Phosphodiesterase 4A
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PEA-15	Phosphoprotein Enriched in Astrocytes 15
PEG	Polyethylene Glycol
PET	Positron Emission Tomography
PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1
PHD	Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase
PI	Propidium Iodide
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIDD	p53-Induced Death Domain-Containing Protein
Pim	Proviral Insertion Site in Moloney Murine Leukemia Virus
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PKC $\iota$	Protein Kinase C $\iota$
PLAD	Pre-Ligand Assembly Domain
Plk1	Polo-Like Kinase 1
POSTN	Periostin
PP2A	Protein Phosphatase 2
PRAS40	Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa
PRDX6	Peroxiredoxin-6
PRODH	Proline Dehydrogenase 1, Mitochondrial
PSM	Peptide Spectrum Matches
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
PTPRD	Receptor-Type Tyrosine-Protein Phosphatase Delta
PTPRO	Receptor-Type Tyrosine-Protein Phosphatase O
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
PYD	Pyrin Domain
RAIDD	Death Domain-Containing Protein CRADD
Rb	Retinoblastoma-Associated Protein
RBX1	E3 Ubiquitin-Protein Ligase RBX1
RelA	Nuclear Factor NF-Kappa-B p65 Subunit
RING	Really Interesting New Gene Finger Domain
RIP1	Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RSK2	Ribosomal Protein S6 Kinase Alpha-3
RuNX1/3	Runt-Related Transcription Factor 1/3
RyR	Ryanodin Receptor
S5a	Subunit S5a of the 26S Proteasome
SALL4	Sal-Like Protein 4
SHARPIN	SHANK Associated RH Domain Interactor

siRNA	Small Interfering RNA
SKP2	S-Phase Kinase-Associated Protein 2
Smac/DIABLO	Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein
SN	Substantia Nigra
SNC	Sistema Nervioso Central
SNX6	Sorting Nexin 6
SOCS-1	Suppressor of Cytokine Signaling 1
SORBS1	Sorbin and SH3 Domain-Containing Protein 1
SOX2	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1
Src	Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Src
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
Stbd1	Starch-Binding Domain-Containing Protein 1
STR	Striatum
T1CE	Contrast-Enhanced MRI
T2-FLAIR	T2-Weighted-Fluid-Attenuated Inversion Recovery MRI
T2w	Native T2-Weighted MRI
TAK1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7
TAMs	Tumor-Associated Macrophages
TAX1BP1	Tax1 Binding Protein 1
TB	TRAF6 Binding Domain
TBK1	TANK Binding Kinase 1
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TFG	TFG Protein
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TMZ	Temozolomide
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNFSF10	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 APO2L/TRAIL
TP53	Tumor Protein p53
TRADD	Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-Associated DEATH Domain Protein
TRAF2/6	TNF Receptor-Associated Factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TSC	Tuberin
Ub	Ubiquitin
UBA	Ubiquitin-Associated Domain
UBC	Polyubiquitin-C
ULK1	Serine/Threonine-Protein Kinase
UPR	Unfolded Protein Response
VAMP3	Vesicle-Associated Membrane Protein 3
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor
WD40	WD-40 Repeat Region of Apaf-1
WT	Wildtype
XIAP	E3 Ubiquitin-Protein Ligase XIAP
Xkr8	XK-Related Protein 8

YBX1	Nuclease-Sensitive Element-Binding Protein 1
ZZ	RIP1 Binding Domain

## Anexo 2. Tabla de Aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)	Codones
Ác. Aspártico	Asp	D	GAC CAU
Ác. Glutámico	Glu	E	GAA GAG
Arginina	Arg	R	CGA CGC CGG CGU AGA AGG
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Histidina	His	H	CAC CAU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Serina	Ser	S	UCA UCC UCG UCU AGC AGU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Leucina	Leu	L	CUA CUC CUG CUU UUA UUG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Tirosina	Thr	Y	UAC UAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Metionina	Met	M	AUG
Triptófano	Trp	W	UGG
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Terminación			UAA UAG UGA



