

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biomedicina (B11.56.1)

PAPEL DE TNKS1 Y TNKS2 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL: HIPOXIA Y MIMETISMO VASCULOGÉNICO

Esteban Zamudio Martínez

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

2023



Directores: Dr. Francisco Javier Oliver Pozo

Dr. José Manuel Rodríguez Vargas

ipbln



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Esteban Zamudio Martínez
ISBN: 978-84-1195-047-3
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84747>



PAPEL DE TNKS1 Y TNKS2 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL: HIPOXIA Y MIMETISMO VASCULOGÉNICO

Memoria presentada por el Graduado

Esteban Zamudio Martínez

para optar al título de

Doctor por la Universidad de Granada

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Francisco Javier Oliver Pozo, Investigador Científico Titular, CSIC

Dr. José Manuel Rodríguez Vargas, Doctor, CSIC

Granada, Julio de 2023

Esteban Zamudio Martínez

ÍNDICE

0. ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. El cáncer: una visión general desde sus inicios hasta hoy	9
1.1.1. El proceso de metástasis	12
1.1.2. El microambiente tumoral	15
1.2. El fenómeno de hipoxia	19
1.2.1. La familia de factores inducibles por hipoxia (HIF)	19
1.2.2. Mecanismos de regulación de la familia HIF	22
1.2.3. Definiendo normoxia, fisoxia e hipoxia	26
1.2.4. La relevancia de la hipoxia y el factor HIF-1 en la progresión tumoral.....	28
1.3. El proceso de vascularización en cáncer.....	34
1.3.1. Mimetismo vasculogénico	36
1.3.2. La importancia de VE-cadherina en el mimetismo vasculogénico	38
1.3.3. Otros factores que contribuyen a la formación de mimetismo vasculogénico	42
1.3.4. Microambiente tumoral y mimetismo vasculogénico	43
1.4. La familia de proteínas PARP	44
1.4.1. Tankirasa 1 y tankirasa 2: similitudes y estructura	48
1.4.2. Funciones y sustratos de TNKS1/2	52
1.4.3. El papel de las tankirasas en el desarrollo tumoral	57
1.4.4. El uso de los inhibidores de tankirasa como tratamiento frente al cáncer.....	59
2. OBJETIVOS.....	65
3. MATERIALES Y MÉTODOS	69
3.1. Cultivo de células.....	69
3.1.1. Líneas celulares humanas.....	69
3.1.2. Bacterias	71
3.2. Congelación y descongelación de células.....	71
3.3. Inducción de Hipoxia.....	71
3.4. Inhibidores químicos	72
3.5. Transformación de bacterias y aislamiento de plásmidos	72
3.6. Transfección transitoria de líneas celulares	73
3.6.1. Silenciamiento génico transitorio mediante <i>siRNA</i>	74

3.6.2.	Transfección transitoria de ADN plasmídico.....	75
3.7.	Western blot	75
3.8.	Niveles de expresión génica mediante RT-qPCR.....	77
3.9.	Array de la ruta de señalización de respuesta a hipoxia	78
3.10.	Ensayo de inmunoprecipitación.....	79
3.11.	Subfraccionamiento celular	80
3.12.	Ensayo de lactato extracelular.....	81
3.13.	Ensayo de ligación por proximidad	82
3.14.	Generación de líneas <i>knockout</i> y <i>knockdown</i>	83
3.15.	Estudio proteómico	85
3.16.	Fraccionamiento de polisomas.....	86
3.17.	Angiogénesis <i>in vitro</i>	87
3.18.	Análisis de datos con <i>CBioportal</i>	88
3.19.	Análisis estadísticos	88
3.20.	Otros buffers	89
4.	RESULTADOS	93
CAPÍTULO 1: Papel de las tankirasas en la adaptación tumoral a la hipoxia		
		93
4.1.	Análisis de la frecuencia de alteración de los genes de <i>TNKS</i> y <i>TNKS2</i> en cáncer.....	93
4.2.	Correlación significativa entre la expresión de los genes de tankirasas y genes de los miembros de la familia HIF	95
4.3.	El silenciamiento de <i>TNKS1/2</i> , pero no su inhibición, disminuye los niveles de proteína de HIF-1 α durante hipoxia.....	98
4.4.	El silenciamiento de <i>TNKS1/2</i> compromete la actividad de HIF-1 α como factor de transcripción.....	102
4.5.	Tankirasas y HIF-1 α interaccionan en condiciones de normoxia e hipoxia	107
4.6.	Ambas tankirasas contribuyen a mantener la estabilidad y actividad de HIF-1 α	113
4.7.	Tankirasas regulan la transcripción del factor HIF-1 α	119
4.8.	Papel de la inhibición no catalítica de tankirasa	126
4.9.	La pérdida de <i>TNKS1/2</i> disminuye la expresión de proteínas relacionadas con la glicólisis a través del factor HIF-1 α durante hipoxia	132

Capítulo 2: Papel de las tankirasas en la formación de mimetismo	
vasculogénico	137
4.10. Análisis de la relación entre tankirasas y VE-cadherina	137
4.11. La inhibición de tankirasas disminuye la formación de mimetismo vasculogénico	
a través de la ruta Wnt	142
5. DISCUSIÓN	149
A) Papel de las tankirasas en la adaptación tumoral a la hipoxia.....	150
B) Papel de las tankirasas en la formación de mimetismo vasculogénico.	164
6. CONCLUSIONS	171
7. ABREVIATURAS.....	175
8. BIBLIOGRAFÍA.....	183
9. ANEXO.....	211

0. ABSTRACT

Hypoxia is a common event and a major driving-force during tumor development. The adaptation to the hypoxic situation (mostly regulated through Hypoxia inducible factors, HIFs) involves the expression of hundreds of genes implicated in the maintenance of cellular survival. Tumor adaptation to hypoxia including new vessels formation and glycolysis activation. All these changes facilitate cell survival, tumor growth, migration, and metastasis and hypoxia constitute a major driving-force of tumor development. There is an undeniable need to identify novel regulatory mechanisms of HIF to prevent the adaptation of tumor cells to hypoxia. The PARP or poly-ADP-ribose polymerase family consists of 17 members involved in a multitude of signaling pathways, mainly through the addition of ADP ribose units as a monomer or polymer to a large number of substrates. The main member, PARP1, is responsible for 90% of the PARylation required to maintain cellular homeostasis. Its expression and function are altered in various types of tumors, which has led to the existence of four FDA-approved inhibitors for the treatment of breast, ovarian and prostate cancer. For more than 10 years, our laboratory has focused on the study of PARP1 in numerous cancer-related processes, discovering that its inhibition plays a key role in the adaptation of tumor cells to hypoxia, as well as in the process of vasculogenic mimicry and vascular normalization. In view of the role of the tankyrase-mediated PARylation process in the selective degradation of PARylated proteins, we decided to study the possible effect of TNKS1/2 on the stability and transcriptional activity of HIF-1 α during hypoxia, as well as its possible contribution to the formation of vasculogenic mimicry, which refers to the ability of tumor cells to partially acquire an endothelial phenotype allowing them to form a network of pseudoendothelial tubes to nourish the tumor under hypoxic conditions.

In fact, recent results from our group have shown that both PARP1 inhibition and its deletion resulted in a loss of HIF-1 α transcription factor stability. The results of the first part of this doctoral thesis indicate that there are two possible mechanisms linking tankyrases with the transcription

ABSTRACT

factor HIF-1 α . On the one hand, we have shown that HIF-1 α interacts with both tankyrases in both normoxia and hypoxia, although the functional meaning of this interaction still remains to be elucidated. On the other hand, we have observed that the loss of both tankyrases, but not their catalytic inhibition, causes a decrease in HIF-1 α transcription in several tumor models. As a consequence of this effect, HIF-1 α protein levels are reduced, compromising its activity as a transcription factor. Thus, in our model, the absence of tankyrase also leads to a decrease in the expression of genes whose induction has been described to mainly depend on HIF-1 α , such as the genes for proteins involved in glycolysis (CA9, HK2, PDK1, PFKFB3 and PFKFB4) and mitophagy (BNIP3). Therefore, these results provide a new mechanism that would allow tankyrase-mediated inhibition of metabolic adaptation to hypoxia.

In the context of vasculogenic mimicry, the previous results from our laboratory revealed the importance of the VE-cadherin protein and the phosphorylation of the Y658 residue in the formation of vasculogenic mimicry in uveal and cutaneous melanoma cells. In the second chapter of the thesis we have shown that there is a complex formed by VE-cadherin, β -catenin and the transcription factor TCF4 that occurs at the nuclear level. This complex induces the formation of VM through the regulation of genes of the Wnt/ β -catenin pathway such as TWIST1. In this case, tankyrases have not been shown to have a direct role in the mechanism discovered, but act through axin-1-mediated degradation of β -catenin. In consequence, we have discovered a new application of tankyrase inhibitors to prevent vasculogenic mimicry formation in uveal melanoma.

Taken together, the results of this work corroborate the growing interest that tankyrases have been acquiring in recent years in the context of cancer. This group of proteins may play an important role in several relevant aspects of the tumor microenvironment such as adaptation to hypoxia or the formation of vasculogenic mimicry. Therefore, we believe that further research is needed to elucidate the implications of tankyrases as modulators of tumor microenvironment and to discover new pathways in which TNKS1/2 are involved.

RESUMEN

La hipoxia es un acontecimiento común y una de las principales fuerzas motrices durante el desarrollo tumoral. La adaptación a la situación de hipoxia (regulada principalmente a través de los factores inducibles por hipoxia, HIFs) implica la expresión de cientos de genes implicados en el mantenimiento de la supervivencia celular. La adaptación tumoral a la hipoxia incluye la formación de nuevos vasos y la activación de la glicólisis. Todos estos cambios facilitan la supervivencia celular, el crecimiento tumoral, la migración y la metástasis, por lo que la hipoxia constituye una de las principales fuerzas motrices del desarrollo tumoral. Es innegable la necesidad de identificar nuevos mecanismos reguladores de HIF para evitar la adaptación de las células tumorales a la hipoxia. La familia PARP o poli-ADP-ribosa polimerasa consta de 17 miembros que intervienen en multitud de vías de señalización, principalmente mediante la adición de unidades de ADP ribosa como monómero o polímero a un gran número de sustratos. El principal miembro, PARP1, es responsable del 90% de la PARilación necesaria para mantener la homeostasis celular. Su expresión y función están alteradas en varios tipos de tumores, lo que ha llevado a la existencia de cuatro inhibidores aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama, ovario y próstata. Durante más de 10 años, nuestro laboratorio se ha centrado en el estudio de PARP1 en numerosos procesos relacionados con el cáncer, descubriendo que su inhibición juega un papel clave en la adaptación de las células tumorales a la hipoxia, así como en el proceso de mimetismo vasculogénico y normalización vascular. Teniendo en cuenta el papel del proceso de PARilación mediado por tankirasas en la degradación selectiva de proteínas PARiladas, decidimos estudiar el posible efecto de TNKS1/2 sobre la estabilidad y actividad transcripcional de HIF-1 α durante la hipoxia, así como su posible contribución a la formación de mimetismo vasculogénico, que hace referencia a la capacidad de las células tumorales de adquirir parcialmente un fenotipo endotelial que les permite formar una red de tubos pseudoendoteliales para nutrir el tumor en condiciones de hipoxia.

RESUMEN

De hecho, resultados recientes de nuestro grupo han demostrado que tanto la inhibición de PARP1 como su pérdida producen una pérdida de estabilidad del factor de transcripción HIF-1 α . Los resultados de la primera parte de esta tesis doctoral indican que existen dos posibles mecanismos que relacionan las tankirasas con el factor de transcripción HIF-1 α . Por un lado, hemos demostrado que HIF-1 α interacciona con ambas tankirasas tanto en normoxia como en hipoxia, aunque el significado funcional de esta interacción está aún por dilucidar. Por otro lado, hemos observado que la pérdida de ambas tankirasas, pero no su inhibición catalítica, provoca una disminución de la transcripción de HIF-1 α en varios modelos tumorales. Como consecuencia de este efecto, los niveles de proteína HIF-1 α se reducen, comprometiendo su actividad como factor de transcripción. Así, en nuestro modelo, la ausencia de tankirasa conduce también a una disminución en la expresión de genes cuya inducción se ha descrito que depende principalmente de HIF-1 α , como los genes de proteínas implicadas en la glicólisis (CA9, HK2, PDK1, PFKFB3 y PFKFB4) y en la mitofagia (BNIP3). Por lo tanto, estos resultados proporcionan un nuevo mecanismo que permitiría la inhibición de la adaptación metabólica a la hipoxia mediada por tankirasa.

En el contexto del mimetismo vasculogénico, los resultados previos de nuestro laboratorio revelaron la importancia de la proteína VE-cadherina y la fosforilación del residuo Y658 en la formación del mimetismo vasculogénico en células de melanoma uveal y cutáneo. En el segundo capítulo de la tesis hemos demostrado que existe un complejo formado por VE-cadherina, β -catenina y el factor de transcripción TCF4 que se produce a nivel nuclear. Este complejo induce la formación de MV a través de la regulación de genes de la vía Wnt/ β -catenina como TWIST1. En este caso, no se ha demostrado que las tankirasas tengan un papel directo en el mecanismo descubierto, sino que actúan a través de la degradación de β -catenina mediada por axina 1. En consecuencia, hemos descubierto una nueva aplicación de los inhibidores de tankirasa para prevenir la formación de mimetismo vasculogénico en melanoma uveal.

En conjunto, los resultados de este trabajo corroboran el creciente interés que las tankirasas han ido adquiriendo en los últimos años en el contexto del cáncer. Este grupo de proteínas puede desempeñar un papel importante en varios aspectos relevantes del microambiente tumoral, como la adaptación a la hipoxia o la formación de mimetismo vasculogénico. Por lo tanto, creemos que es necesario seguir investigando para dilucidar las implicaciones de las tankirasas como moduladoras del microambiente tumoral y descubrir nuevas vías en las que TNKS1/2 estén implicadas.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer: una visión general desde sus inicios hasta hoy

El cáncer es una “enfermedad” compleja, multifactorial y dinámica que comprende alteraciones tanto genéticas como epigenéticas, las cuales desajustan el balance entre la supervivencia y la muerte celular [1]. Aunque no se sepa en qué momento apareció por primera vez, existen documentos y pruebas gráficas que hacen referencia a que esta enfermedad ha estado presente desde hace millones de años. En humanos, el primer registro de la enfermedad hace referencia a un osteosarcoma presente en un homínido de hace 1,7 millones de años en Sudáfrica, mientras que, en animales el registro más antiguo se corresponde con un tumor óseo encontrado en un antecesor de las tortugas de hace 240 millones de años, incluso antes de que los dinosaurios habitaran la Tierra [2,3] (**Figura 1**).

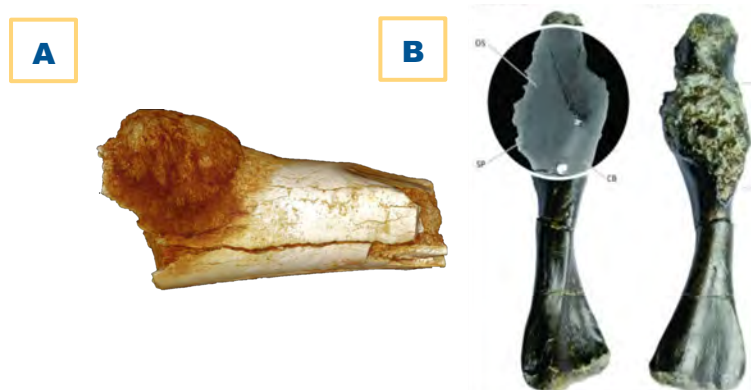


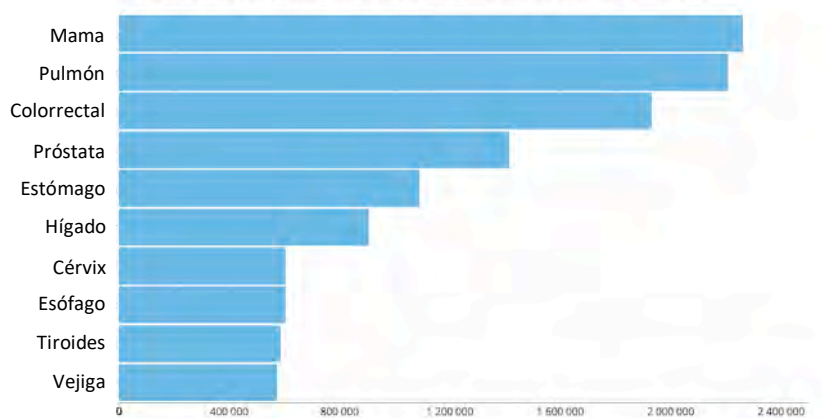
Figura 1. Los inicios del cáncer. A. Imagen de un osteosarcoma de 5º metatarso hallado en los restos de un homínido de hace 1,7 millones de años en Sudáfrica [2]. B. Imagen del tumor más antiguo detectado hasta la fecha, perteneciente a un *Pappochelys rosinae* de hace 240 millones de años [3].

No obstante, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) hoy en día el cáncer se ha convertido en la principal causa de muerte en todo el mundo, llegándosele a atribuir casi 10 millones de defunciones en 2020. La OMS reveló los tumores con mayor incidencia y mortalidad

INTRODUCCIÓN

de 2020 para ambos sexos. En cuanto a la incidencia, el cáncer de mama (2,26 millones de casos) y el de pulmón (2,21 millones de casos) fueron los más frecuentes en la población, seguidos del cáncer colorrectal (1,93 millones), próstata (1,41 millones) y estómago (1,09 millones). En cuanto a mortalidad, el tipo de cáncer que causó mayor número de defunciones en 2020 fue el de pulmón (1,8 millones de defunciones), seguido del colorrectal (935.000 defunciones), hígado (830.000 defunciones), estómago (769.000 defunciones) y mama (685.000 defunciones) (**Figura 2**) [4].

Cifra estimada de casos de incidencia en el mundo en 2020 (ambos sexos)



Cifra estimada de casos de mortalidad en el mundo en 2020 (ambos sexos)

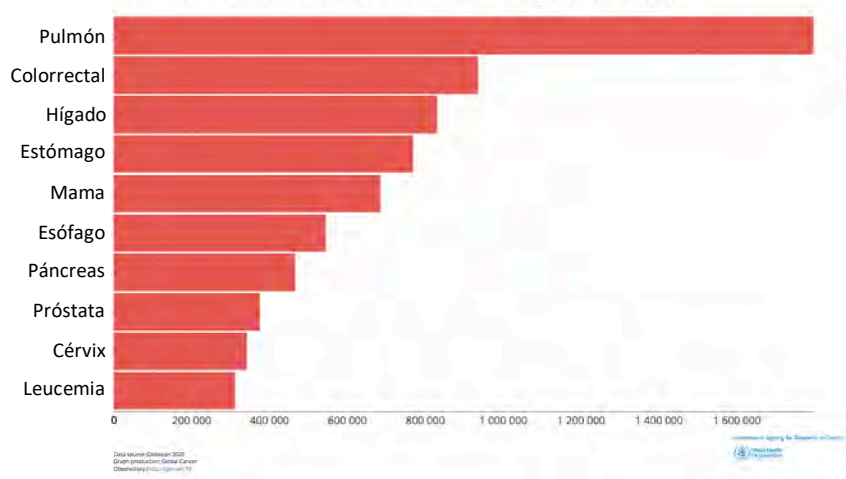


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en 2020 a nivel mundial. Gráfica que muestra el número de casos que desarrollaron cáncer (arriba) y el número de defunciones a causa de los distintos tipos de cáncer (abajo). Imagen adaptada de la web oficial de la Organización Mundial de la Salud [4].

El incremento en la prevalencia y la mortalidad en los últimos años se debe no sólo a los factores ya conocidos como la exposición a carcinógenos físicos (radiación), químicos (amianto, sustancias contenidas en el humo) y biológicos (virus, bacterias y parásitos), sino que se ha demostrado que existen factores que a largo plazo pueden jugar un importante papel en la aparición de ciertos tipos de tumores. Hablamos de factores de riesgo como la inactividad física, el consumo de alcohol y tabaco, una mala alimentación, la obesidad, la contaminación del aire e incluso algunas infecciones crónicas como las causadas por los virus de la hepatitis B y C y los papilomavirus humanos o la bacteria *Helicobacter pylori* [4–6].

Por ello es imperativo conocer en profundidad el mecanismo de carcinogénesis por el cual una célula normal acaba convirtiéndose en tumoral. Hanahan y Weinberg trataron de recoger los pasos comunes que cualquier célula seguía en el proceso de patogénesis tumoral. En el año 2000 describieron 6 *hallmarks* o capacidades funcionales que las células normales iban adquiriendo durante el proceso de carcinogénesis [7]. No obstante, en 2011 el concepto de microambiente tumoral les hizo replantear la lista de *hallmarks* y añadieron 2 nuevos, así como 2 características consideradas cruciales para la adquisición de dichos *hallmarks* [8]. Finalmente, a principios de 2022 Hannahan volvió a actualizar la lista, de tal manera que actualmente la lista se compone de 10 *hallmarks* y 4 características. Dichos *hallmarks* son una señalización proliferativa mantenida, la inmortalidad replicativa, la evasión de las señales supresoras del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inducción de procesos de vascularización, la capacidad de invasión y metástasis, la modulación del metabolismo celular, la evasión del sistema inmunitario, el desbloqueo de la plasticidad fenotípica y la modulación de la senescencia celular. Por otro lado, las características que permiten adquirir los distintos *hallmarks* serían la presencia de una mayor inestabilidad genómica, la inflamación mediada por el tumor, la reprogramación epigenética y la presencia de un microbioma polimórfico [9] (**Figura 3**).

INTRODUCCIÓN

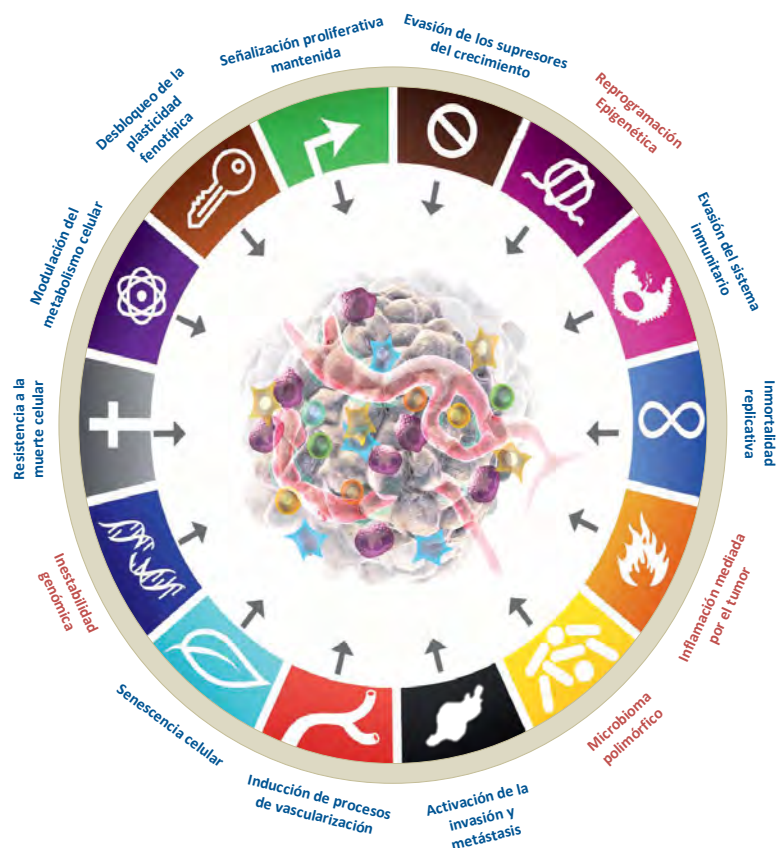


Figura 3. Hallmarks y características del cáncer. Imagen que muestra los 10 hallmarks del cáncer (azul) junto con las 4 características (rojo) que permiten la adquisición de dichos hallmarks durante el proceso de carcinogénesis tumoral. Imagen adaptada de Hanahan D; 2022 [9].

1.1.1. El proceso de metástasis

En el caso de los tumores sólidos, las células cancerosas pueden permanecer en el lugar donde se produce el proceso de carcinogénesis original (tumor localizado o *in situ*), extenderse por el tejido circundante (tumor localmente avanzado) o incluso a otras zonas distantes (tumor metastásico). Los tumores localmente avanzados pueden ser de bajo o alto riesgo, mientras que todos los tumores metastásicos son de alto riesgo. La metástasis es la diseminación o propagación de células malignas de un tumor primario a lugares distantes. A nivel morfológico es la capacidad de las células tumorales de penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos (“intravasación”), viajar a través de la circulación sanguínea; salir de los vasos circulatorios (extravasación) y crecer en un nuevo foco (metástasis) en tejidos normales de otra parte del cuerpo. Se estima que la presencia de metástasis es la causante del

90% de las muertes relacionadas con cáncer y además es el principal factor que diferencia que un tumor sea de bajo riesgo y por lo tanto tratable mediante vigilancia activa, cirugía o terapias adyuvantes, o que un tumor sea de alto riesgo y requiera de un tratamiento más agresivo [10]. La motilidad de las células cancerígenas juega un papel importante en los tumores de alto riesgo, aunque un cáncer localizado también puede ser de alto riesgo si el lugar donde se produce la lesión original es un órgano esencial como el cerebro o si el volumen tumoral es grande [11]. Además, se ha visto que los procesos biológicos relacionados con el crecimiento de un tumor primario y con la motilidad de un tumor metastásico difieren de manera sustancial, sugiriendo que los biomarcadores, así como las dianas terapéuticas usadas para identificar, visualizar, diagnosticar y tratar ambos tipos de tumores también difieren [12,13].

La metástasis es un proceso dinámico que comprende una compleja interacción entre el tumor primario y los factores intrínsecos del organismo en el que se desarrolla. Numerosos estudios han determinado que, para realizar dicho proceso las células tumorales necesitan remodelar la matriz extracelular de la zona en la que se origina el tumor primario con el fin de reestructurar las fibras de colágeno, desprenderse de las células tumorales vecinas y así poder invadir primero el tejido circundante y posteriormente realizar la intravasación en el sistema circulatorio o linfático (**Figura 4**). Una vez hayan llegado al torrente sanguíneo, esas células viajarán como células tumorales circulantes (CTC) formando agregados junto a las plaquetas, lo cual permitirá su adhesión a la pared endotelial en una zona distante al tumor primario y dará lugar a la extravasación de la pared vascular y finalmente a la colonización de un nuevo tejido donde proliferará generando un tumor secundario (**Figura 4**). Durante la metástasis, es muy importante que las células tumorales no sólo modifiquen el ambiente que les rodea, sino que también generen ciertos cambios en su perfil morfogénico. Uno de los pasos iniciales en la metástasis incluye un proceso de desdiferenciación que se conoce como Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) a través del cual la célula pierde el fenotipo epitelial y adquiere uno mesenquimal, más agresivo. Sin embargo, para poder finalizar el proceso de metástasis, la célula tumoral debe recuperar su fenotipo epitelial a través del fenómeno conocido como Transición Mesénquima-Epitelio (MET) [14–17] (**Figura 4**). El proceso de metástasis en sí es un proceso ineficiente

INTRODUCCIÓN

y existen algunos pasos específicos que podrían ser considerados limitantes debido a su baja eficiencia. Por ejemplo, el porcentaje de CTCs que sobreviven en el sistema circulatorio o que logran realizar la extravasación en nuevas zonas para generar un tumor secundario es muy bajo. No obstante, parece que es un proceso que podría ocurrir constantemente durante la progresión de la enfermedad y se ha visto que el marco de tiempo entre el crecimiento del tumor primario y la progresión metastásica parece depender del tipo de tumor primario que se origine [18].

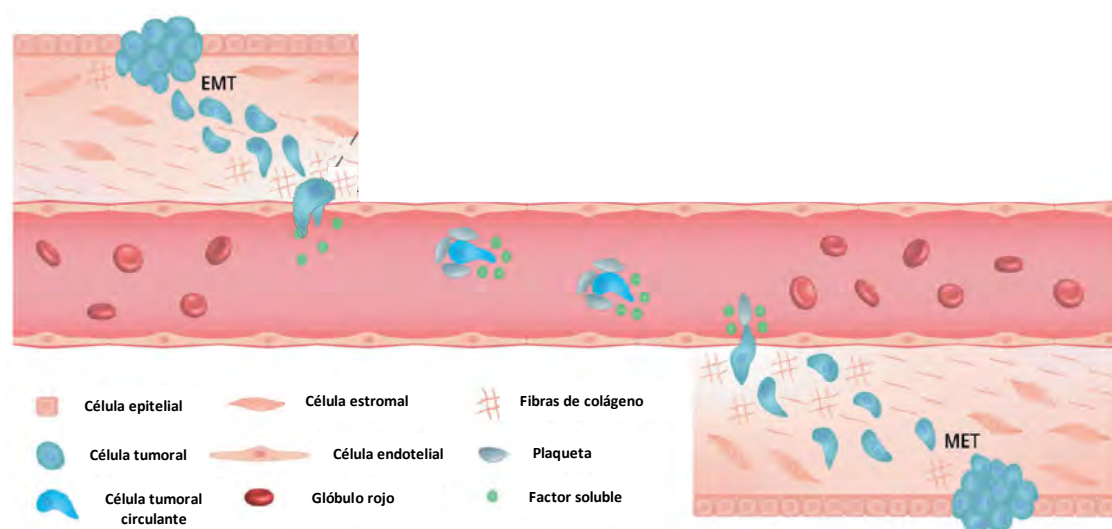


Figura 4. Representación del proceso de metástasis. Para realizar el proceso de metástasis las células tumorales modifican el tejido que les rodea, así como su perfil morfogénico realizando la EMT para pasar de un fenotipo epitelial a uno más mesenquimal y así poder entrar en el sistema circulatorio y llegar a una zona distante. Una vez que lleguen, volverán a adquirir un fenotipo epitelial gracias a la MET y modificarán nuevamente el tejido circundante, dando lugar a un tumor secundario. Imagen adaptada de Stoletov K; 2020 [17]. EMT: Transición Epitelio-Mesénquima; MET: Transición Mesénquima-Epitelio.

La población de células cancerígenas es heterogénea y el proceso de metástasis es altamente selectivo. En 1889 se describió por primera vez la teoría de la semilla y la tierra (*"Seed and Soil"*), la cual establecía que las células tumorales sólo realizarían metástasis en aquellas zonas idóneas para ello [19]. Con el paso del tiempo, se ha visto que el lugar donde se origine el tumor primario es un factor determinante del sitio donde es más probable que se produzca la metástasis. Por ejemplo, un estudio reveló que los tumores de próstata y mama suelen metastatizar en hueso, mientras que los tumores de cerebro, pulmón y colon lo suelen hacer en hígado y pulmón [20]. Por lo tanto, en su día se llegó a la conclusión

de que la motilidad de las células tumorales y la gravedad de la metástasis no son procesos aleatorios, sino que están determinados por factores intrínsecos a la célula cancerosa como el origen celular, factores genéticos y epigenéticos, la afinidad por según qué tipo de tejidos y los patrones de circulación [20–23].

1.1.2. El microambiente tumoral

La idea de que un tumor no dependía única y exclusivamente de las células tumorales comenzó a surgir cuando Virchow estudió la relación entre la inflamación y el cáncer en 1863 y posteriormente cuando Paget publicó su teoría de la semilla y la tierra en 1889 [19,24]. Así se fue fraguando el concepto de microambiente tumoral (TME), que hace referencia al entorno en el cual las células tumorales y las células progenitoras tumorales se encuentran. El TME se compone de una parte celular que incluye células del sistema inmunitario, células de los vasos sanguíneos, fibroblastos y progenitores estromales y una parte no celular compuesta por matriz extracelular y factores solubles tales como interleuquinas, quimioquinas y factores de crecimiento [8,25,26] (**Figura 5**). Las células endoteliales destacan por su papel en el desarrollo tumoral mediante el aporte de nutrientes y en la protección del tumor frente al sistema inmunitario, a través de su contribución en la formación de vasos sanguíneos [8]. Las células del sistema inmunológico, tales como granulocitos, linfocitos y macrófagos, son responsables mediante distintos mecanismos de las reacciones inflamatorias orquestadas por el tumor para promover su supervivencia, evadiendo así una respuesta inmunológica selectiva. Dentro de las células del sistema inmunitario destacan los macrófagos asociados al tumor (TAM), debido a las diversas funciones que llevan a cabo relacionadas con el desarrollo y progresión del tumor, la intravasación o extravasación de las células tumorales en el sistema circulatorio y la supresión de los mecanismos de respuesta antitumoral mediada por la irradiación, los agentes citotóxicos y los inhibidores de los puntos de control o “*checkpoints*” [25,27–29]. Los denominados fibroblastos asociados al cáncer (CAF) pueden contribuir en el proceso de migración de las células tumorales al sistema circulatorio para realizar metástasis y también pueden liberar factores que promuevan la angiogénesis [30,31]. La matriz extracelular (ECM) se compone de una red de macromoléculas como glicoproteínas, colágeno,

INTRODUCCIÓN

fibronectina y enzimas que intervienen en la adhesión, la proliferación y la comunicación de las células. En el contexto de un tumor establecido en un tejido, varios componentes de la matriz extracelular juegan un papel crucial en la cohesión, proliferación y adaptación de la nueva masa tumoral. En concreto está descrito que, en tumores sólidos, el colágeno y la fibronectina proporcionan fuerza mecánica mientras que los proteoglicanos contribuyen a la unión de los factores solubles con sus receptores de membrana. Además, la ECM favorece la migración de las células tumorales mediante la modificación de sus propiedades físicas y su composición. De hecho, se ha descrito que el grado de adhesión y la concentración de diversos componentes de la ECM determina la velocidad a la cual las células cancerosas pueden migrar de una región a otra [32,33].

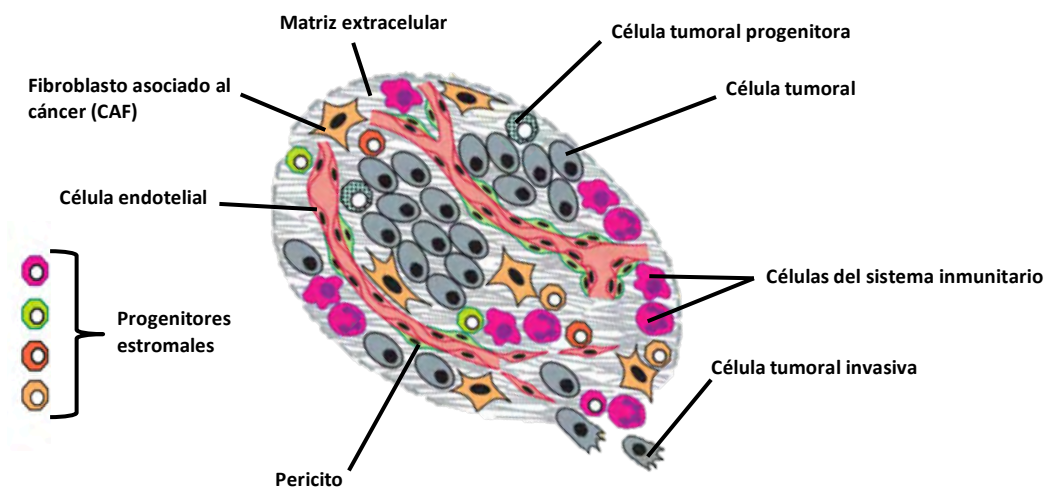


Figura 5. Microambiente tumoral. Imagen representativa del microambiente tumoral, en el que además de las células tumorales y las células tumorales progenitoras se encuentran células endoteliales, pericitos, células del sistema inmunitario, CAFs y progenitores estromales, todos ellos inmersos en una matriz extracelular rica en glicoproteínas, colágeno, etc. Imagen adaptada de Hanahan D; 2011 [8].

La consolidación del tumor en su nicho de origen modifica bioquímicamente múltiples componentes de la matriz extracelular, influyendo de forma clave sobre las células no malignas. A este nivel de malignización podemos hablar de que el nuevo microambiente tumoral favorece no solo el proceso de carcinogénesis, sino también las rutas de adaptación y evasión del nuevo clon tumoral hacia el sistema inmunológico, y como hemos dicho anteriormente la inducción de dediferenciación, motilidad e

invasión a nuevos nichos. Por lo tanto, el TME generará una fase clave de “homeostasis tumoral” que, entre otros muchos factores, determinará el diseño y efectividad de futuras terapias antitumorales. La bidireccionalidad TME – célula tumoral se va a llevar a cabo a través de señales paracrinas que inducen el reclutamiento de múltiples tipos celulares con el fin de promover la supresión y la tolerancia inmunológica e inducir la angiogénesis tumoral. Recientes estudios han demostrado que el reclutamiento, la activación y la reprogramación de las células estromales e inmunitarias son el resultado de la interacción recíproca entre las células cancerígenas y el TME [31,34]. Las células mesenquimales también juegan un papel crucial en la interacción tumor-TME dada su habilidad para diferenciarse en pericitos y CAFs [35].

En los tumores sólidos se ha visto que el TME es un componente heterogéneo, dinámico y dominante y cada vez está más claro que dicha composición y su estructura varían entre los distintos tipos de tumores e incluso entre pacientes [36]. Por lo tanto, conocer el microambiente tumoral, así como entender el proceso de interacción que ocurre en él podría ser crucial para el desarrollo de una terapia antitumoral efectiva. Hoy en día los tratamientos como la quimioterapia o la radioterapia siguen siendo una de las principales opciones como tratamiento frente al cáncer, en aquellos casos donde no se ha desarrollado una tratamiento dirigido, a pesar de sus múltiples efectos adversos. Sin embargo, la mayoría de los tumores acaban desarrollando resistencia al tratamiento y los mecanismos por los que ocurre esto no se conocen con exactitud. Existen numerosas evidencias que sugieren que tanto la quimioterapia como la radioterapia remodelan el TME, lo cual favorece la aparición de la resistencia al tratamiento por diversos mecanismos como el aumento del reclutamiento de TAMs o la activación de rutas de señalización como *Wnt* y *Notch* [37–42]. Es por ello por lo que se ha considerado la eliminación de los elementos protumorales del TME como una opción para tratarlo directamente. Numerosos estudios preclínicos y clínicos han abordado esta aproximación, aunque los resultados apuntan a que la eliminación de ciertas poblaciones celulares no tumorales induce toxicidad durante el tratamiento y otros efectos no deseados a largo plazo [43–46]. Por ejemplo, la eliminación de los TAMs también podría acabar con otros macrófagos que sí presentan actividad antitumoral [47]. Como alternativa a esta terapia se propuso una que, en lugar de eliminar los factores protumorales, apostase

INTRODUCCIÓN

por bloquear o incluso reprogramar el fenotipo protumoral de los elementos del TME hacia un fenotipo antitumoral. Este concepto definido como “normalización” tiene la finalidad de transformar el TME en un ambiente tisular normal y para poder llevar a cabo dicha normalización es necesario conocer los mediadores y las rutas de señalización implicadas en el fenotipo protumoral [48]. Comparado con la eliminación, la estrategia de normalización ha obtenido mejores resultados reduciendo la toxicidad y los efectos adversos [49–51]. No obstante, la normalización de una sola ruta de señalización protumoral podría no ser suficiente para remodelar el TME dada su complejidad y heterogeneidad y se requeriría la normalización de varias rutas y/o subpoblaciones. De hecho, la única aproximación dirigida frente al TME que ha tenido éxito hasta el momento es la inmunoterapia, incluyendo las terapias de bloqueo de los *checkpoints* inmunitarios, tales como PD-1/PD-L1. Asimismo, otros autores aluden a que recurrir únicamente a una terapia frente al TME sería ineficaz a largo plazo sin una terapia dirigida a las células tumorales, por lo que una combinación de ambos tipos de terapia podría ser una aproximación más acertada [52].

Un dato curioso es que a pesar de la importancia que ha cobrado el TME en las últimas décadas, existe una falta de consenso a la hora de definir este microambiente como tal. En 2019 *Laplane et al* decidieron clasificar el ambiente tumoral (TE) dada su heterogeneidad en 6 subtipos: célula tumoral-célula tumoral (TCTCE), nicho, TE confinado, TE proximal, TE periférico y TE a nivel del organismo (TOE). El concepto convencional de TME excluiría los dos últimos niveles: TE periférico y TOE, haciendo referencia este último a aquellos microambientes que están lejos del tumor pero que pueden afectar en su desarrollo (microbiota o algunos exosomas) [53,54].

Otro aspecto importante del TME es la acidosis, pues se ha comprobado que su presencia es crítica para la progresión y evolución del tumor, además de ser determinante para el proceso de invasión y metástasis. La acidosis tumoral ha sido reconocida como el mayor *hallmark* en el desarrollo de cáncer que puede influir en la respuesta al tratamiento y la severidad de los síntomas. Asimismo, ha dejado de percibirse como un efecto colateral pasivo del crecimiento tumoral y ahora se considera un factor importante en la progresión tumoral. Numerosas evidencias muestran que la acidosis tumoral puede

relacionarse con la acumulación de lactato extracelular y la hipoxia. La alta demanda metabólica de las células cancerígenas a menudo lleva a una acumulación significativa de H^+ en el TME. La falta de organización de la vasculatura tumoral suele evitar la correcta eliminación de los iones H^+ del medio extracelular, dando lugar al desarrollo de regiones hipóxicas en el TME junto con un cambio en el metabolismo glicolítico [55,56]. No obstante, dada la importancia del fenómeno de hipoxia en este trabajo, este tema se tratará con mayor profundidad en el siguiente apartado.

1.2. El fenómeno de hipoxia

La regulación y preservación de los niveles de oxígeno es determinante para el mantenimiento de la homeostasis celular. El término hipoxia hace referencia a aquellas situaciones en las que hay una privación de los niveles de oxígeno en un tejido o cuando los niveles de este son insuficientes (0,5-2% O_2). Dicho término está asociado tanto a condiciones fisiológicas (desarrollo embrionario) como patológicas (isquemia, ictus, cáncer...). Las células pueden estar sometidas a condiciones de hipoxia debido a un flujo sanguíneo insuficiente en órganos específicos, bajos niveles de hemoglobina o una exposición a compuestos químicos. Dentro del concepto hipoxia podemos hablar de una hipoxia aguda cuando se produce un desajuste entre el suministro de oxígeno y la demanda metabólica celular o de una hipoxia más crónica cuando esta es debida a una insuficiencia vascular permanente. Como respuesta, las células ponen en marcha distintos mecanismos de adaptación a través de la modulación de la actividad de ciertas proteínas actuando tanto a nivel transcripcional como postraducciona. Dicha respuesta a la hipoxia consiste en la activación de múltiples genes que regulan diferentes procesos biológicos tales como la angiogénesis, el metabolismo de la glucosa y la supervivencia y la proliferación celular [55,57,58].

1.2.1. La familia de factores inducibles por hipoxia (HIF)

La adaptación a la hipoxia está mediada principalmente por una familia de factores de transcripción llamada factores inducibles por hipoxia o HIFs. Esta familia actúa como un heterodímero, el cual está compuesto por una subunidad alfa ($HIF-\alpha$) que es sensible a la presencia de oxígeno y una subunidad

INTRODUCCIÓN

beta (HIF-1 β) estable de manera constitutiva. Por lo tanto, el factor limitante de la actividad del heterodímero es la subunidad alfa [59,60]. En humanos se han identificado 3 subunidades alfa: HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α , siendo HIF-1 α la isoforma más estudiada y mejor caracterizada de las tres. De hecho, la mayoría de la información que se dispone actualmente en cuanto a estructura y función de esta familia de proteínas se basa en estudios realizados sobre HIF-1 α y en menor medida sobre HIF-2 α [61,62] (**Figura 6**).

En cuanto a su estructura, todos los miembros de la familia son clasificados como miembros de la familia de proteínas hélice-bucle-hélice/Per-Arnt-Sim (b-HLH/PAS) debido a que presentan un dominio bHLH y dos dominios PAS (PAS-A y PAS-B) responsables de mediar la unión del factor de transcripción al ADN y la heterodimerización entre la subunidad alfa y beta, respectivamente [63]. En el caso de HIF-1 α también existen dos dominios de transactivación (TAD) denominados N-TAD y C-TAD, separados entre sí por un dominio inhibidor (ID) que regula negativamente los dominios TAD durante normoxia [64]. El dominio C-TAD regula la transactivación de los genes diana de HIF a través del reclutamiento de coactivadores como CBP y p300, mientras que el dominio N-TAD está inmerso en una región que se conoce como dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), el cual participa en la degradación de la subunidad en el proteasoma [65,66]. La estructura de HIF-1 β , a diferencia de HIF-1 α , no cuenta con el dominio ODD ni los dominios N-TAD ni ID [67]. Asimismo, como HIF-2 α y HIF-3 α son homólogos de HIF-1 α presentan una estructura similar a la de este. La secuencia de aminoácidos de HIF-2 α contiene un 48% de homología respecto a HIF-1 α y en su estructura se pueden encontrar los mismos dominios que la subunidad 1 alfa [68–70]. El último miembro descrito, HIF-3 α , presenta un 57% y un 53% de homología respecto a HIF-1 α y HIF-2 α , además de algunas variaciones en su estructura, pues no contiene el dominio transactivador C-TAD ni el dominio ID y en su lugar puede contener un dominio LZIP, responsable de la unión al ADN y de la interacción proteína-proteína [71–73] (**Figura 6**).

Asimismo, existen diferencias en cuanto al patrón de expresión y los genes que regulan las distintas isoformas. HIF-1 α tiene una expresión ubicua, mientras que HIF-2 α se expresa mayoritariamente

durante el desarrollo embrionario y en endotelio, pulmón, placenta y corazón [62,74]. En lo que a regulación se refiere, se ha observado que HIF-1 α estimula de manera efectiva la expresión de enzimas glicolíticas (*LDHA*, *CA IX*), mientras que HIF-2 α actúa sobre genes como el de la eritropoyetina (*EPO*) y otros que participan en el metabolismo del hierro. No obstante, también existen otro grupo de genes como *VEGF* y *GLUT-1* cuya expresión está regulada por ambas subunidades [75–78]. En cuanto a HIF-3 α , se ha visto que se expresa en timo, pulmón, cerebro, corazón y riñón y que al igual que las otras isoformas, es capaz de dimerizar junto a HIF-1 β . Sin embargo, HIF-3 α es la única isoforma cuyo gen está sujeto a múltiples procesos de *splicing* alternativo, llegándose a detectar más de 6 variantes, cuya expresión y actividad se ha visto que aumenta como respuesta a la hipoxia a través de HIF-1 α y no HIF-2 α [71,79–81]. De entre sus variantes, se ha descrito una variante corta que funciona como un regulador negativo de la expresión de los genes inducidos por HIF, denominada como proteína inhibidora del dominio PAS (IPAS). Esta versión, cuya expresión se ve reducida a las células de Purkinje del cerebelo y el epitelio de la córnea, carece de los dominios N-TAD y C-TAD y actúa mediante la interacción con la región bHLH/PAS de HIF-1 α generando un complejo disfuncional [82,83].

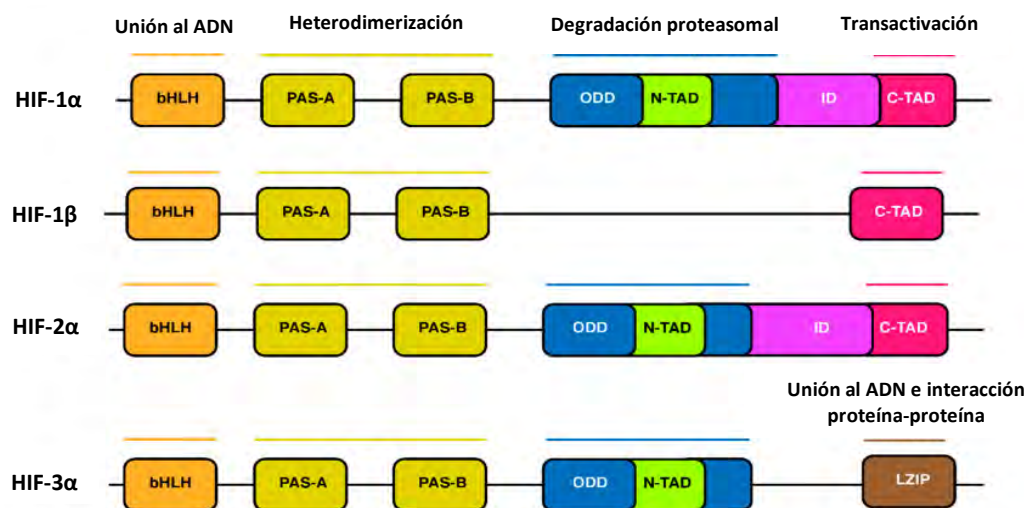


Figura 6. Familia de factores inducibles por hipoxia (HIFs). Imagen representativa de los miembros de la familia HIF. Se muestra la estructura de las tres subunidades alfa (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α) así como de la subunidad beta (HIF-1 β), indicando la función de cada uno de sus dominios. Imagen adaptada de Infantino V; 2021 [84].

INTRODUCCIÓN

1.2.2. Mecanismos de regulación de la familia HIF

La regulación de la familia HIF está mediada principalmente a través de la estabilidad de las subunidades alfa. Desde su descubrimiento se han ido conociendo múltiples mecanismos que regulan dicha estabilidad, siendo el principal aquel que median las enzimas prolil-hidroxilasas (PHDs) junto con la ubiquitina ligasa Von Hippel Lindau (VHL) y el factor inhibidor de HIF (FIH). Este mecanismo es dependiente de oxígeno, de manera que en condiciones de normoxia las enzimas PHD1-3 (principalmente la PHD2) se encargan de hidroxilar ciertos residuos de prolina presentes en el dominio ODD (P402 y P564 en el caso de HIF-1 α ; P405 y P531 en el caso de HIF-2 α y P490 en el caso de HIF-3 α). Para poder llevar a cabo la hidroxilación las PHDs utilizan como sustratos O₂, α -cetoglutarato, ascorbato y hierro, produciendo CO₂ y succinato. Una vez que las subunidades alfa han sido hidroxiladas, son reconocidas por un complejo formado por los factores Elongina B, Elongina C, RBX1, CUL2 y liderado por la ubiquitina E3 ligasa VHL. Este complejo se encarga de ubiquitinar las subunidades alfa para desencadenar su degradación en el proteasoma 26S [85–87]. Por otro lado, FIH se encarga de hidroxilar un residuo de asparagina presente en el dominio C-TAD (N803 en el caso de HIF-1 α y N847 en el caso de HIF-2 α), bloqueando así la interacción de la subunidad alfa con los coactivadores p300/CBP [88]. Para esta reacción también se requiere de oxígeno, hierro y α -cetoglutarato. Por lo tanto, en presencia de oxígeno, las subunidades alfa se van a estar sintetizando constantemente, aunque la acción de los mecanismos mencionados va a provocar su degradación en el proteasoma, impidiendo así que no se pueda formar el heterodímero junto con la subunidad beta ni que pueda unirse a sus coactivadores para poder llevar a cabo su función como factores de transcripción (**Figura 7**). Sin embargo, en condiciones de hipoxia, la ausencia de oxígeno va a impedir que estas enzimas puedan llevar a cabo su actividad, de manera que las subunidades alfa van a poder ser estables. Esto va a permitir que puedan translocarse al núcleo, donde podrán formar el heterodímero con la subunidad beta y además interaccionar con los coactivadores p300/CBP. Dicho complejo promueve la transcripción de cientos de genes gracias a que son capaces de reconocer y unirse a una secuencia de nucleótidos (5'-RCGTG-3') llamada

elementos de respuesta a hipoxia (HRE) presente en el promotor de los genes diana (Figura 7) [62,89].

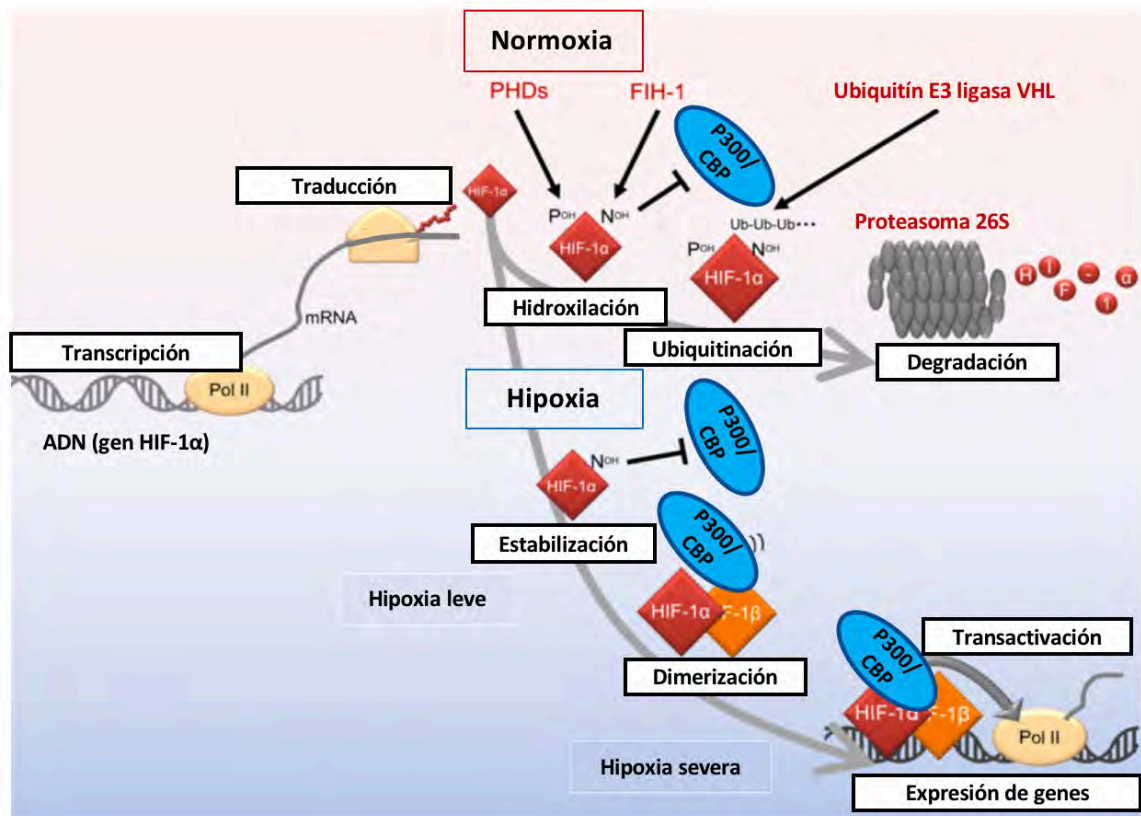


Figura 7. Mecanismo de regulación dependiente de O_2 del factor HIF-1. Imagen representativa de la regulación de la estabilidad de HIF-1 α por parte de las enzimas PHDs, VHL y FIH en presencia de oxígeno y otros sustratos. Ante la carencia de oxígeno estas enzimas son inactivas, por lo que HIF-1 α se estabiliza y lleva a cabo su función como factor de transcripción junto a la subunidad HIF-1 β y los coactivadores p300/CBP, regulando la expresión de gran cantidad de genes que permiten la adaptación y la supervivencia a la hipoxia. Imagen adaptada de Koyasu S; 2019 [89].

HIF puede modular la expresión de genes implicados en múltiples rutas de señalización, tales como supervivencia y proliferación (*EPO*, *TP53*), metabolismo de lípidos y glucosa (*HK2*, *LDHA*, *PFKFB3*) metabolismo del hierro (*TF*), angiogénesis (*VEGF*, *ANGPT4*), apoptosis (*BNIP3*, *BNIP3L*), regulación de la transcripción (*BHLHB3*), remodelación de la matriz extracelular (*P4H1*) y del citoesqueleto (*VIM*) o incluso quimioquinas (*CXCR4*). Todo ello con el fin de permitir la adaptación de las células al ambiente hipóxico (Figura 8) [90–92].

INTRODUCCIÓN

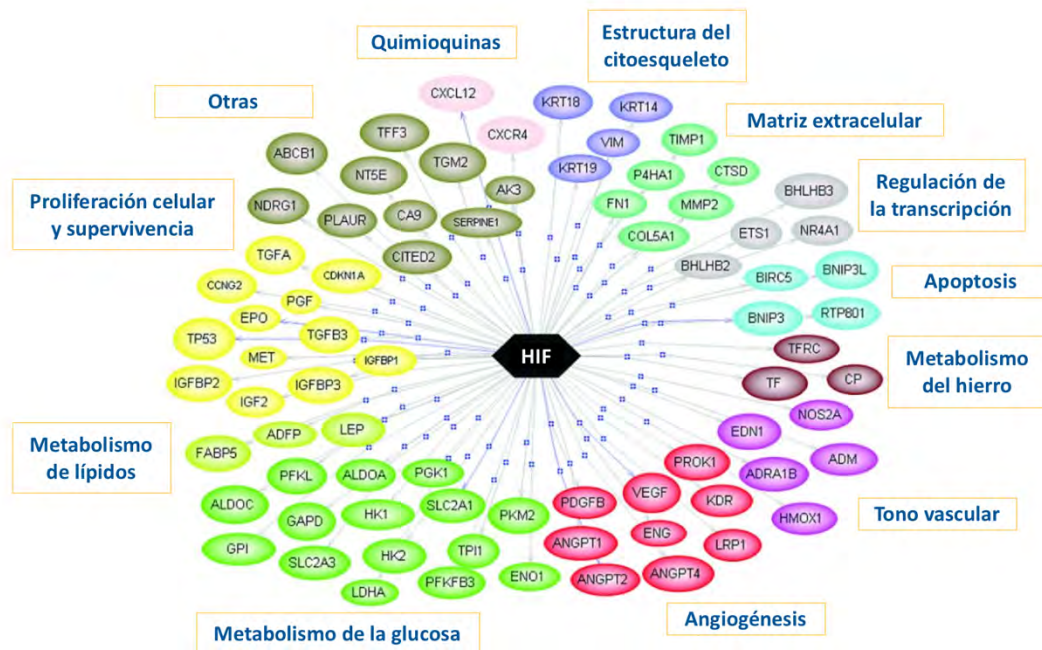


Figura 8. Genes regulados por la familia HIF en condiciones de hipoxia. Imagen representativa de los genes que son regulados a nivel transcripcional por la familia HIF durante hipoxia. Ante la falta de oxígeno el factor de transcripción se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) e induce la expresión de multitud de genes relacionados con la proliferación celular y la supervivencia, angiogénesis, apoptosis, transcripción, metabolismo...

No obstante, tal y como se ha mencionado previamente, este no es el único mecanismo de regulación postranscripcional del heterodímero, pues existen otros mecanismos basados en diferentes modificaciones de las diferentes subunidades y que han sido descritos posteriormente. Estos mecanismos no canónicos o no convencionales también juegan un papel clave en la estabilidad y/o actividad de HIF, aunque algunos de ellos sólo se han estudiado en modelos celulares muy concretos. Algunas de estas modificaciones postraduccionales son las siguientes:

- **Acetilación/desacetilación.** Numerosos estudios han revelado que la acetilación/desacetilación de ciertos residuos presentes en HIF-1/2 α puede afectar tanto a su estabilidad como a su actividad transcripcional. Por ejemplo, la acetilación de residuos de lisina presentes en el dominio ODD puede favorecer la degradación de HIF-1 α dependiente de VHL [62]. Por el contrario, la desacetilación de dichas lisinas por parte de enzimas

desacetilasas como HDAC1 aumenta la estabilidad de HIF-1 α [93,94]. También se ha descrito que la acetilación de los residuos K709 y K674 presentes en el extremo C-terminal por parte de p300 y PCAF, respectivamente, afecta a la interacción de HIF-1 α con el coactivador p300, mientras que la desacetilación por parte de SIRT1 del residuo K674 bloquea el reclutamiento de p300, comprometiendo la actividad transcripcional de HIF-1 α [95,96]. En cuanto a HIF-2 α , se ha demostrado que la acetilación de los residuos K385, K685 y K741 por parte de CBP y la desacetilación por parte de SIRT1 son capaces de modular su señalización [97,98].

- **Fosforilación.** La ruta de señalización MAPK/ERK está implicada en la actividad transcripcional de HIF-1 α puesto que se ha descrito que la fosforilación de p300/CBP por parte de la quinasa ERK1/2 aumenta su interacción con HIF-1 α . Además, ERK2 puede fosforilar dos residuos de serina (S641 y S643) presentes en el extremo C-terminal de HIF-1 α , bloqueando así la exportación fuera del núcleo y provocando su acumulación en el mismo [99,100]. Por otro lado, la fosforilación de residuos de treonina presentes en HIF-1 α y HIF-2 α bajo condiciones de hipoxia (T796 y T844, respectivamente) también aumenta la interacción con los coactivadores p300/CBP e incluso en el caso de HIF-1 α , se ha corroborado que la fosforilación de la T796 evita la hidroxilación del residuo N803 por parte de FIH [101,102]. De la misma forma, se ha descrito el efecto de la fosforilación de múltiples residuos sobre la estabilidad de HIF-1 α y HIF-2 α . La fosforilación de T63 y S692 por parte de la proteína PKA, de S696 por parte de ATM y de S668 por parte de CDK1 aumentan la estabilidad de HIF-1 α , mientras que la fosforilación de S551, T555 y S589 por parte de GSK3 β y la fosforilación de PI3K de S576 y S657 promueve su degradación [103–107]. La proteína CK1 δ también es capaz de modular la actividad de HIF-1/2 α , aunque de distinta forma ya que la fosforilación de HIF-2 α en el residuo de S383 y T528 provoca su acumulación en el núcleo, mientras que la fosforilación de HIF-1 α en el residuo de S247 impide su asociación con HIF-1 β [108–110].
- **PI3K/AKT y MAPK/ERK.** Varios estudios han demostrado que tanto PI3K a través de AKT y mTOR como la ruta de señalización de las MAPKs regula la traducción de HIF-1 α de manera

INTRODUCCIÓN

positiva [111–113]. Asimismo, se ha visto que el factor IGF-1 es capaz de inducir la transcripción de HIF-1 α y HIF-2 α a través de PI3K/AKT y PI3K/mTORC2, respectivamente [112,114,115].

- **Hsp90, HAF y Hsp70.** HIF-1 α , como otras proteínas de la familia bHLH-PAS se asocia a la chaperona Hsp90, la cual favorece la estabilidad del factor de transcripción uniéndose al dominio PAS predominantemente en condiciones de normoxia (es desplazado por HIF-1 β en condiciones de hipoxia). La unión de Hsp90 al dominio PAS de HIF-1 α desplaza a la proteína RACK1, cuya interacción con HIF-1 α se ha comprobado que favorece su degradación vía proteasomal [116–118]. Por el contrario, la chaperona Hsp70, mediante el reclutamiento de la ubiquitina ligasa CHIP y la proteína HAF, ha resultado tener un papel en la degradación proteasomal de HIF-1 α , pero no HIF-2 α tras una hipoxia prolongada [119–121].
- **Poli ADP-ribosilación.** Al inicio de la respuesta a la hipoxia, el aumento de la actividad de PARP1 conduce a la PARilación de HIF-1 α en residuos específicos ubicados en su dominio C-terminal. Esta PARilación dirige HIF-1 α a un subgrupo selectivo de genes (en su mayoría excluyendo genes relacionados con el metabolismo de la glucosa) lo que sugiere una jerarquía para evitar la superposición en la regulación de la expresión génica dependiente de HIF y para proteger las funciones críticas de supervivencia durante la hipoxia [122].

1.2.3. Definiendo normoxia, fisoxia e hipoxia

A pesar de la multitud de estudios que hay sobre la hipoxia tumoral, sigue habiendo confusión en cuanto al uso de los términos normoxia e hipoxia. Hasta el momento y de manera universal el término normoxia hace referencia al porcentaje “normal” de oxígeno presente en un tejido o en un cultivo de células *in vitro* y suele estar entorno al 20-21% de O₂. Sin embargo, este porcentaje sólo se corresponde con el porcentaje de oxígeno presente en el aire (con una presión atmosférica normal). Se ha visto que incluso a nivel alveolar, los niveles de oxígeno sólo alcanzan un 14,5% de O₂ aproximadamente, llegando a disminuir hasta entorno un 3,4%-6,8% en los distintos tejidos

(**Tabla 1**) [123]. Por lo tanto, el termino normoxia no representa la realidad fisiológica y es por lo que surgió el término fisoxia, el cual hace referencia al porcentaje real de oxígeno en los tejidos, cuyo valor como referencia se ha propuesto que sea del 5% [124]. Se propuso este término más preciso entre otras razones porque hay un gran desbalance en el porcentaje de oxígeno, el cual puede llegar a ser tóxico y porque los investigadores han exigido exactitud a la hora de mencionar otros parámetros igual de importantes como el pH y los niveles de glucosa [125]. Así pues, los valores de fisoxia varían entre los diferentes tejidos, sugiriendo que las células con distintos orígenes poseen diferente sensibilidad al oxígeno. Por ejemplo, el cerebro es particularmente sensible y sólo puede sobrevivir durante 3 minutos sin una adecuada oxigenación, mientras que en otros tejidos el tiempo de tolerancia a la carencia de O_2 es mayor. Por ejemplo el riñón y el hígado (15-20 minutos), el músculo esquelético (60-90 minutos) y liso (24-72 h) y el pelo y las uñas (varios días) presentan una mayor tolerancia [126].

Por otro lado, una vez diferenciados los términos normoxia y fisoxia, también habría que diferenciar los términos “hipoxia fisiológica” e “hipoxia patológica”. La hipoxia fisiológica podría ser definida como el nivel de oxígeno al cual el tejido es capaz de reaccionar y poner en marcha mecanismos para volver a los niveles de fisoxia de manera inmediata. Para ello el tejido pone en marcha distintos mecanismos como la vasodilatación, el aumento del flujo sanguíneo o la estabilización de las subunidades alfa de la familia HIF con el fin de aumentar la expresión de genes de respuesta a hipoxia. Como los niveles de fisoxia varían entre los distintos tejidos (3-7% O_2), los niveles de hipoxia fisiológica también lo hacen manifestando niveles entre un 2% y un 6% de O_2 , lo cual indica que los elementos de respuesta a hipoxia podrían controlarse a diferentes concentraciones de oxígeno según el tejido [127,128]. Tras definir los niveles de hipoxia fisiológica, se propuso definir aquellos valores por debajo de los estimados como “hipoxia patológica” (0,3-4,2% O_2). Se propuso el término hipoxia patológica porque en esta situación de carencia de O_2 , los mecanismos moleculares no logran revertir la situación patológica para mantener la homeostasis. En el caso de los tumores se ha visto que, a pesar de la inducción de la

INTRODUCCIÓN

angiogénesis, la vasculatura tumoral suele ser caótica, pues está compuesta por vasos sanguíneos que contienen fugas y extremos ciegos y que tienden a colapsar, lo cual lleva a un fallo en el mantenimiento de los niveles de oxígeno. En este caso, los niveles de hipoxia patológica también varían entre los distintos tejidos, aunque en la mayoría de los casos suele ser inferior al 2% (**Tabla 1**) [124,129].

Tipo de tumor	Porcentaje fisiológico de O ₂	Porcentaje de O ₂ en el tumor
Cerebro	3,4 %	1,7 %
Cabeza y cuello	5,9 %	1,7 %
Pulmón	5,6 %	2,1 %
Mama	6,8 %	1,3 %
Cérvix	5,5 %	1,2 %
Hígado	3,9 %	0,8 %
Páncreas	6,8 %	0,4 %
Próstata	3,7 %	0,7 %
Vulva	ND	1,5 %
Melanoma	5,3 %	1,5 %
Riñón	4,9 %	1,3 %
Recto	6,8 %	3,4 %
Sarcoma	6,7 %	1,8 %

Tabla 1. El porcentaje de oxígeno en los distintos tumores. Se representa la media del porcentaje de oxígeno fisiológico (fisoxia), así como la media del porcentaje de los distintos órganos del cuerpo cuando hay un tumor (hipoxia patológica). Información obtenida de Mckeown SR; 2014 [124]. ND: No definido.

1.2.4. La relevancia de la hipoxia y el factor HIF-1 en la progresión tumoral

Los procesos de homeostasis en los tumores sólidos se ven alterados principalmente por dos motivos: El primero es debido a la presencia de una vasculatura de baja calidad, la cual no es capaz de cumplir con la función de proporcionar la cantidad necesaria de oxígeno y nutrientes al tumor en crecimiento, así como de liberar los deshechos producidos. El segundo motivo es la tolerancia de las células tumorales a la hipoxia. En un tumor pueden definirse tres zonas sometidas a tres

ambientes distintos. Por un lado, está la zona más próxima a la vasculatura, cuyas condiciones son óptimas, dado que las células de dicha zona reciben la mayor cantidad de oxígeno y nutrientes. A continuación, hay una segunda zona en la que las células están en un ambiente de hipoxia, pero viable. Por último, hay una tercera zona sometida a una falta completa de oxígeno o anoxia, la cual se caracteriza por la presencia de necrosis celular e inflamación [124,130](Figura 9).

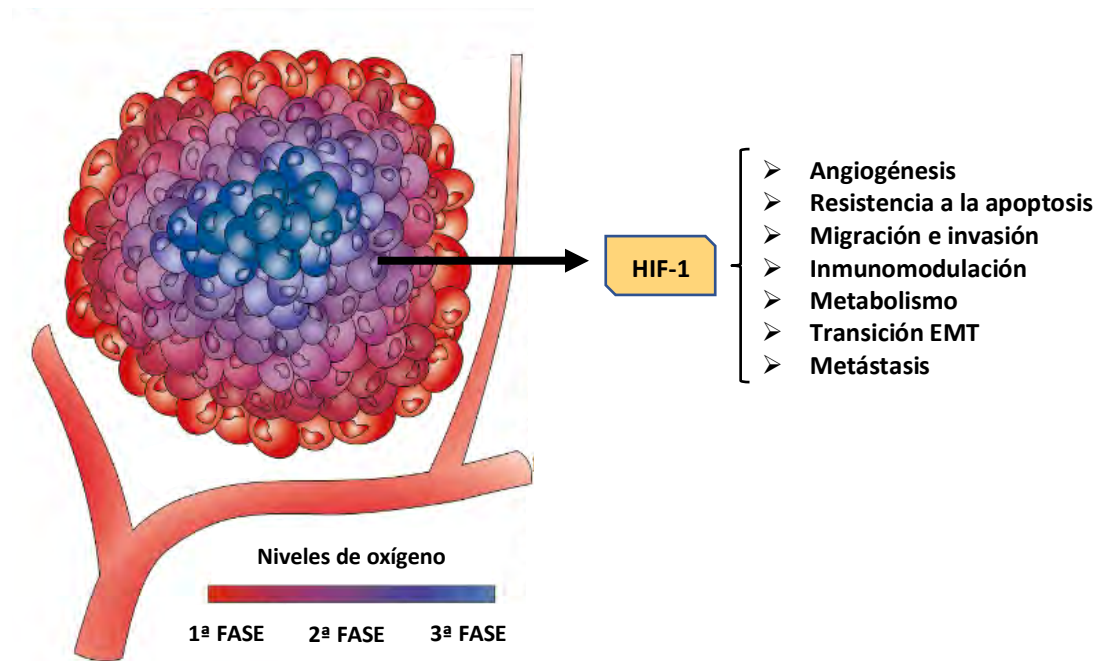


Figura 9. Niveles de oxigenación en los tumores sólidos. En los tumores sólidos existe una primera fase bien oxigenada, una segunda fase sometida a hipoxia y una tercera fase en condiciones de anoxia. Las células de la segunda fase expresan el factor HIF-1 α , el cual desencadena una respuesta a múltiples niveles (angiogénesis, metabolismo, inmunomodulación...) que permite el crecimiento y la progresión del tumor. Imagen adaptada de *Nature Portfolio Cancer Community* 2022.

El problema con la vasculatura en la segunda zona mencionada previamente lleva a que las células se expongan a un ambiente de hipoxia patológica prolongada, el cual debería ser letal para las células y generaría daño tisular. No obstante, dicha exposición continuada genera una selección de aquellas células cancerosas que son más tolerantes a la hipoxia, las cuales además suelen presentar mayor malignidad, resistencia a situaciones de estrés y adaptabilidad a las mismas. Es difícil de saber el nivel exacto de oxígeno en el que esto ocurre, pues dependerá del requerimiento

INTRODUCCIÓN

de oxígeno y la tolerancia de cada tipo de tumor, aunque se ha visto que en el 60% de los tumores sólidos suele ocurrir por debajo del 1% de O₂ [60]. La hipoxia intratumoral lleva a la estabilización y activación de HIF-1/2 α , con una sobreexpresión de HIF-1 α en múltiples tipos de tumores, la cual se ha asociado a un incremento en la capacidad de realizar metástasis y una mayor tasa de mortalidad [131,132]. Dicha sobreexpresión, además de por la hipoxia, puede estar mediada por otros factores como la insulina, IGF-1/2, lactato, piruvato e incluso alteraciones genéticas como la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores [85,114,133,134]. El aumento de la expresión de HIF-1 α también se ha relacionado con la progresión tumoral dado el papel relevante que juega este factor de transcripción en múltiples procesos tales como la angiogénesis, la regulación del sistema inmunológico, el metabolismo y la regulación de pH, el proceso de EMT y la metástasis (**Figura 9**):

- **Angiogénesis:** Los tumores inicialmente se forman como masas en las que no hay vasos sanguíneos, por lo que dependen de la permeabilidad celular para recibir oxígeno y nutrientes. Conforme el tumor va creciendo, su rápida expansión excede el suministro local de sangre, de manera que comienzan a generarse nichos de hipoxia [135–137]. Como respuesta a la hipoxia, la estabilidad y activación del factor HIF-1 promueve la inducción tanto en las células tumorales como en las estromales de factores proangiogénicos como VEGF, CXCL12, ANGPT1/2, PGF y PDGF β que actúan sobre las células endoteliales y pericitos, promoviendo la angiogénesis en el tumor [138–140]. En condiciones fisiológicas, la angiogénesis da lugar a la formación de vasos sanguíneos funcionales mediante la expresión organizada de múltiples factores angiogénicos. Sin embargo, la angiogénesis tumoral es un proceso ineficaz, debido al desajuste y/o a la excesiva producción de factores angiogénicos. Esto conlleva a la formación rápida, excesiva y caótica de vasos sanguíneos que además se caracterizan por tener paredes delgadas, variedad de formas y tamaños e incluso oclusiones y fugas (**Figura 10A**). Esta vasculatura poco funcional no puede suplir las necesidades de las

células cancerígenas, por lo que se acaban generando ciclos de hipoxia y reoxigenación que dan lugar a un fenotipo tumoral más agresivo [138,141–143].

- **Inmunomodulación:** Las áreas hipóxicas y necróticas del tumor liberan factores proinflamatorios que reclutan y activan células del sistema inmunitario como TAMs, CAFs, células supresoras derivadas del linaje mieloide y células T reguladoras. Estas promueven la supresión de la respuesta inmunológica contra el tumor mediante diversos mecanismos, a la vez que favorecen otros procesos como la proliferación, la angiogénesis y la metástasis [27,144–146]. Por ejemplo, la expresión de HIF-1 en los TAMs promueve la angiogénesis a través de la inducción de factores (VEFG, IL-6 y TNF- α) y enzimas (iNOS, MMP-9 y COX2) proangiogénicos [147–151]. Los CAFs, activados por HIF-1, secretan proteínas remodeladoras de la matriz extracelular como las prolil-hidroxilasas de colágeno (P4HA1/P4HA2) con el fin de favorecer la metástasis [152]. La exposición prolongada a hipoxia, a altos niveles de HIF-1 y/o lactato también reduce e inactiva a los linfocitos NK y CD8⁺ [153–156]. Asimismo, las células tumorales evaden al sistema inmunológico mediante la sobreexpresión del receptor CD47 (señal “no me comas”) y del *checkpoint* inmunológico PD-L1 con el fin de bloquear la activación de los macrófagos y las células T (**Figura 10B**) [157–159].
- **Metabolismo:** En condiciones fisiológicas, el metabolismo celular y la fuente principal de ATP recae principalmente en la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa. No obstante, ante la falta de oxígeno, las células cancerígenas tienen que adaptar su metabolismo para promover la supervivencia y obtener energía de una fuente alternativa. Es entonces cuando se produce el denominado efecto *Warburg*, el cual establece que ante una situación como por ejemplo la hipoxia o un daño mitocondrial importante, la célula pasa a utilizar la glicólisis como fuente principal de energía en lugar del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa [160–162]. En el caso de la hipoxia, se sabe que HIF-1 es capaz de promover la glicólisis gracias a su interacción con varios cofactores como por ejemplo PKM2 para mediar la adaptación a través de la inducción de múltiples enzimas glicolíticas como PDK1, HK2, PFKFB3 o LDHA. Al mismo

INTRODUCCIÓN

tiempo, HIF-1 media la disminución del metabolismo mitocondrial mediante varios mecanismos como el intercambio o la modificación de las subunidades de la cadena transportadora de electrones, la inducción de la mitofagia a través de la expresión de las proteínas BNIP3 y BNIP3L, la supresión de la generación de nuevas mitocondrias mediante la activación del supresor MXI1 y la disminución de la fosforilación oxidativa, lo cual permite a su vez adaptar la producción de ROS. Dado que con la glicólisis se obtiene menor cantidad de ATP, tiene que haber un aumento en el consumo de glucosa. HIF-1 también induce la expresión de transportadores de glucosa como GLUT-1 y GLUT-3 [163–166]. Como consecuencia de este cambio metabólico hacia la glicólisis, se produce un incremento en la producción de lactato e iones H^+ . Para evitar cambios en el pH intracelular, la célula a través de HIF-1 induce la expresión de transportadores de lactato (MCT4) e iones (NHE1) y otras enzimas (gj), ya sea en las células tumorales o en las células estromales. Este hecho lleva a la acidificación del microambiente tumoral (pH 6-6,5) [167–170]. Se ha comprobado que la acidosis del medio extracelular modula la respuesta inflamatoria, atenúa la inmunidad antitumoral y la eficacia a la hora de incorporar de fármacos al interior de la célula tumoral. La atenuación del sistema inmunológico se produce por diversos mecanismos como la inhibición de la activación y proliferación de las células $CD4^+$, $CD8^+$ y NK o la inducción de la apoptosis en las células $CD8^+$ y NK [171–173]. El descenso del pH intercelular también conlleva un aumento en la actividad de las metaloproteinasas con el fin de destruir la matriz extracelular y promover la motilidad celular, la invasión y la metástasis [92] (**Figura 10C**). Además, varios autores han comprobado que existe una simbiosis metabólica entre las células sometidas a hipoxia y las células que están cerca de vasos sanguíneos. Estas células expresan el transportador MCT-1 y la enzima lactato deshidrogenasa B (LDHB), que permiten recoger el lactato que han expulsado las células hipóxicas al medio extracelular y transformarlo en piruvato, para finalmente utilizarlo como combustible en la fosforilación oxidativa y dejar así la glucosa para las células tumorales hipóxicas [92,174].

- **EMT y metástasis:** La progresión tumoral está asociada con el proceso de metástasis a través de la interacción de las células cancerígenas con el microambiente tumoral y el proceso de transición epitelio-mesénquima [175]. HIF-1 juega un papel clave en el proceso de metástasis mediante el cambio en la adhesión y la movilidad de las células tumorales y en la activación de la EMT. La EMT inducida es un proceso de desdiferenciación celular que se caracteriza por la disminución en la expresión de genes que codifican proteínas asociadas a un fenotipo epitelial, como E-cadherina y β -catenina, y por la inducción de genes que codifican proteínas que favorecen un fenotipo mesenquimal como N-cadherina, vimentina, α -SMA y CXCR4 [176–178]. HIF-1 induce la expresión de varios represores de E-cadherina a la vez que contribuye a que se produzcan cambios en el citoesqueleto mediante la inducción de TGF- α y vimentina [176,179,180]. También promueve la activación de metaloproteinasas como MMP1/2, MMP9 y LOX y proteínas como TWIST1 y MET (capaces de inducir a las metaloproteinasas), favoreciendo así los procesos de migración e invasión. Se ha visto que el aumento en la expresión de LOX en las células metastásicas favorece la formación de colonias en diversos tejidos [140,181,182]. Asimismo, otro proceso clave en la metástasis es el proceso de intravasación de las células tumorales en los vasos sanguíneos. Se ha visto que HIF-1 induce la expresión de ANGPTL4, cuyo efecto disminuye la adhesión de las células endoteliales vasculares, favoreciendo así la entrada de las células cancerosas al lumen vascular [178,183]. Por otro lado, dentro de la heterogeneidad celular en el tumor, existe una pequeña población de células denominadas células progenitoras tumorales. Esta población posee la capacidad de autorrenovación, la cual promueve los procesos de tumorigénesis y metástasis. Aunque su existencia sigue siendo un tema controvertido, múltiples autores han descrito la presencia de esta población celular en varios tipos de tumores (leucemia, mama, esófago, estómago, ovario y riñón). Las zonas hipóxicas son consideradas nichos para las células progenitoras tumorales y la inducción de HIF-1 promueve la expresión de genes que fomentan este fenotipo (*OCT-4*, *SOX-2*, *NANOG*, *c-Myc*, *CD44* y *CD133*) (**Figura 10D**) [184–190].

INTRODUCCIÓN

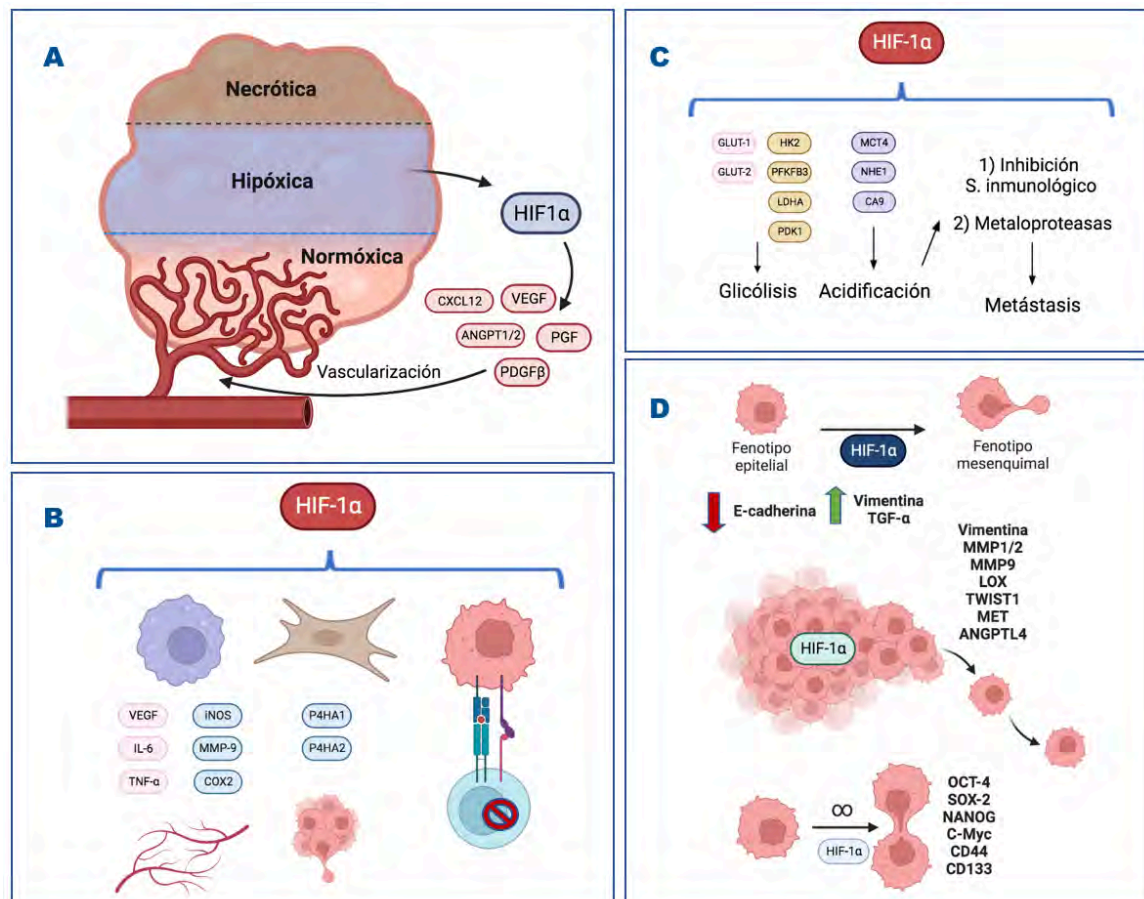


Figura 10. El efecto de HIF-1 en la progresión tumoral. En los tumores sólidos, la expresión de HIF-1 α conduce a la inducción de gran cantidad de genes que permiten la adaptación del tumor, así como el incremento de su malignización. HIF-1 ejerce un papel relevante de múltiples formas: induciendo la vascularización (A), modulando el sistema inmunológico (B), modificando su metabolismo (C) y promoviendo la EMT y la metástasis (D).

1.3. El proceso de vascularización en cáncer

Los tumores sólidos tienen una alta demanda metabólica y generan gran cantidad de productos de desecho. En estas condiciones, los tumores sólo pueden crecer más de 1 mm³ siempre y cuando se produzca el fenómeno de neovascularización, que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos, para así poder distribuir O₂ y nutrientes a todas las células tumorales a la vez que se recoge CO₂ y otros productos no deseados. A nivel general, la vasculatura en adultos permanece en un estado de quiescencia, es decir, que las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos rara vez proliferan. No obstante, existen algunas excepciones como los procesos de

cicatrización y el ciclo menstrual femenino, ya que en estos casos la generación de nuevos vasos es necesaria para la reparación tisular o para apoyar el crecimiento de una nueva vida [8].

El proceso de angiogénesis se define como la brotación de nuevos vasos a partir de la vasculatura preexistente y es un fenómeno que está regulado de manera cuidadosa en el contexto fisiológico. Por el contrario, las células cancerígenas y el microambiente tumoral son conocidos por inducir el cambio angiogénico que se caracterizan por la continua predominancia de señales proangiogénicas y la inhibición de las señales antiangiogénicas. Además del mecanismo de angiogénesis por brotación, los tumores pueden recurrir a otros mecanismos de neovascularización para cumplir con la elevada demanda metabólica como la vasculogénesis, el crecimiento microvascular por invaginación, la proliferación microvascular glomeruloide, la cooptación vascular y el mimetismo vasculogénico (VM) [191] (**Figura 11**).

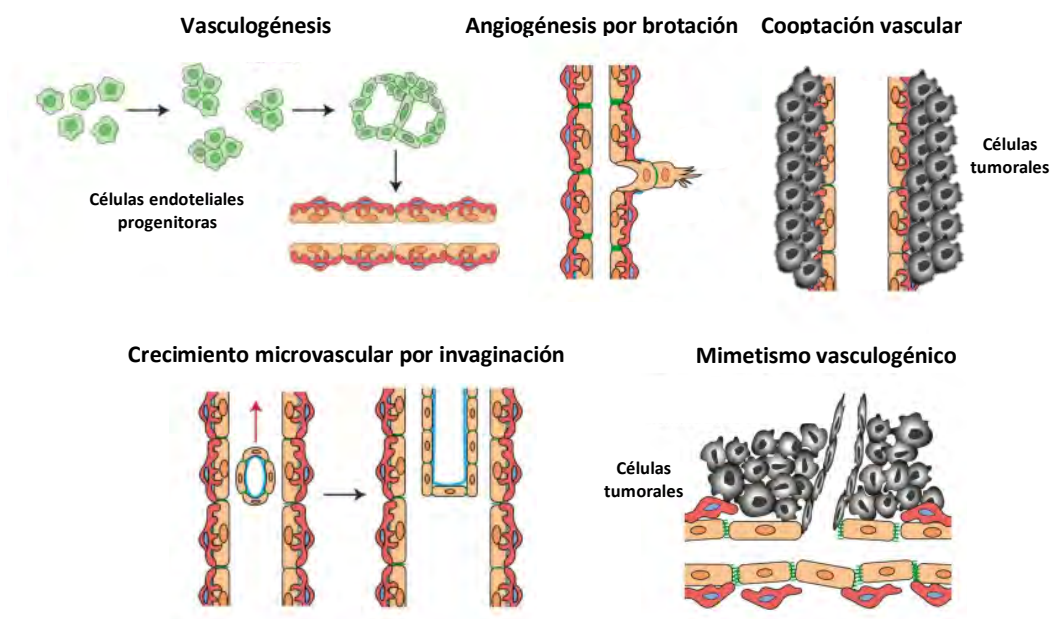


Figura 11. Mecanismos de neovascularización en el cáncer. En la vasculogénesis los vasos sanguíneos se originan *de novo* a partir de células endoteliales progenitoras. La angiogénesis por brotación genera vasos sanguíneos a partir de una vasculatura preexistente. En la cooptación vascular, las células tumorales migran y crecen alrededor de los vasos sanguíneos. El crecimiento microvascular por invaginación genera vasos sanguíneos a partir de la invaginación de las células endoteliales en el lumen de un vaso preexistente. Por último, en el proceso de mimetismo vasculogénico, las células tumorales adquieren un fenotipo pseudoendotelial y generan estructuras aberrantes denominadas canales vasculares. Imagen adaptada de Lugano R; 2020 [192].

INTRODUCCIÓN

1.3.1. Mimetismo vasculogénico

El fenómeno de mimetismo vasculogénico o mimetismo vascular (VM) hace referencia a un tipo de neovascularización tumoral en el que, a diferencia de otros como la angiogénesis, las células endoteliales no participan. En su lugar, los canales están constituidos por las propias células cancerígenas, lo cual determina que no sean considerados verdaderos vasos sanguíneos. No obstante, estos pseudovasos tienen la capacidad de conducir sangre y células sanguíneas, por lo que pueden administrar nutrientes y O₂ al tumor de manera independiente a la angiogénesis endotelial [193].

El término mimetismo vasculogénico fue descrito por primera vez en 1999 por Maniotis y colaboradores (ICM, USA) mientras trataban de estudiar la microcirculación tumoral usando la tinción PAS. Este tipo de tinción permite detectar los depósitos de matriz extracelular que forman la membrana basal alrededor de los vasos sanguíneos. Maniotis et al observaron la presencia de redes ricas en matriz en muestras de melanoma uveal y cutáneo. Estas redes PAS⁺ eran huecas en algunas zonas e incluso contenían glóbulos rojos, pero no contenían células endoteliales de acuerdo a los marcadores PECAM1 y CD34 entre otros (los canales eran PECAM-1⁻ y CD34⁻). De esta forma, se llegó a la conclusión de que los canales estaban revestidos por células de melanoma, lo que llevó a los investigadores a realizar varias pruebas con células de melanoma cutáneo y uveal en cultivos 3D con matrigel. Los resultados indicaron que sólo las líneas de melanoma altamente invasivas podían formar redes capaces de distribuir colorantes inyectados. Finalmente, este hecho sugirió que los canales podrían distribuir sangre *in vivo* sin la ayuda de otro tipo celular y dadas las similitudes con la vasculogénesis *de novo*, se definió este fenómeno como mimetismo vasculogénico [194]. A partir de su descubrimiento, Hendrix y colaboradores (ICM, USA) publicaron numerosas evidencias que descifran las bases moleculares del mimetismo vasculogénico a la vez que redefinían el paradigma de la vascularización tumoral. Desde sus inicios, el concepto de VM se enfrentó a cierta controversia y oposición, aunque pronto otros grupos

describieron la presencia de VM en múltiples tipos de tumores como mama, hígado, colon, próstata, pulmón, cabeza y cuello, mieloma múltiple, glioblastoma y sarcoma de Ewing [195–202].

Se ha comprobado que la presencia de VM puede afectar al grado de malignización de los tumores e incrementar hasta un 50% del riesgo de muerte por metástasis [203,204]. Un estudio de la expresión de genes comparando líneas de melanoma altamente agresivas VM⁺ con líneas de melanoma poco agresivas VM⁻ reveló que las células que podían realizar VM expresaban una variedad de genes relacionados con un fenotipo típicamente epitelial, endotelial y hematopoyético. Aunque el proceso de VM sea un tipo de neovascularización en el que no participen las células endoteliales, las células VM⁺ expresan ciertos marcadores comunes, además de otros propios que permiten distinguirlas de las mismas [196,205–211] (**Tabla 2**).

Célula VM ⁺	Célula endotelial
Similitudes	
Endoglin/CD105 ⁺	
Endotelina-1 ⁺	
TFPI1 ⁺	
TIE-1/2 ⁺	
VE-cadherina ⁺	
VEGF-C ⁺	
VEGFR-1/2 ⁺	
Diferencias	
P/E-selectinas ⁻	P/E-selectinas ⁺
PECAM-1/CD31 ⁻	PECAM-1/CD31 ⁺
Receptor de trombinas ⁻	Receptor de trombinas ⁺
VCAM-1/CD106 ⁻	VCAM-1/CD106 ⁺
EphA-2 ⁺	EphA-2 ⁻
Integrina β1 ⁺	Integrina β1 ⁻
LAMC2 ⁺	LAMC2 ⁻

Tabla 2. Similitudes y diferencias a nivel de expresión de proteínas entre las células endoteliales y las células tumorales VM⁺. Se representa los marcadores endoteliales que presentan las células tumorales con capacidad para realizar VM en común con las células endoteliales, así como algunos marcadores que las diferencian de las mismas.

INTRODUCCIÓN

1.3.2. La importancia de VE-cadherina en el mimetismo vasculogénico

Uno de los primeros marcadores que se asoció con el VM fue VE-cadherina, una proteína transmembrana característica del endotelio vascular que media la adhesión célula-célula. VE-cadherina es el miembro más estudiado de la familia de las cadherinas y su estructura consta de cinco dominios extracelulares dependientes de calcio (DEC) necesarios para la formación de homodímeros con otra VE-cadherina, un dominio transmembrana (DTM) y un dominio intracelular sobre el que se producen la mayoría de las modificaciones postraduccionales (**Figura 12**) [193,212].

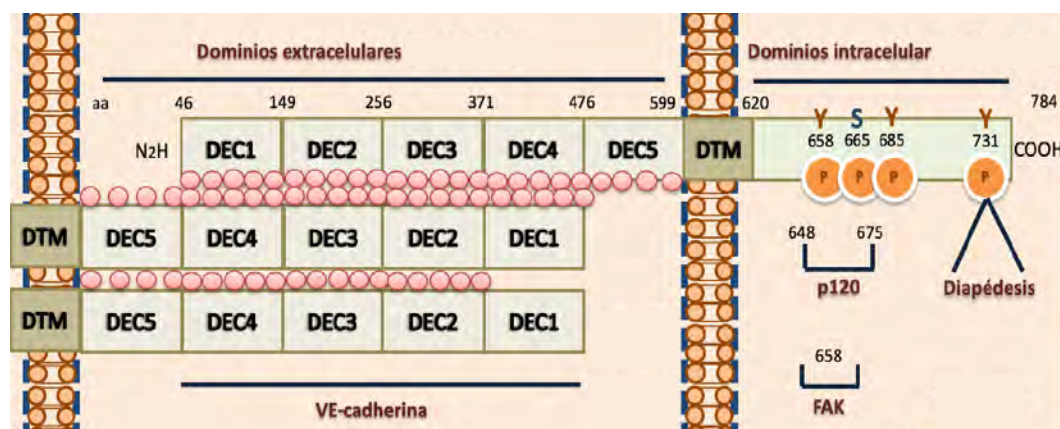


Figura 12. Estructura de VE-cadherina. Imagen en la que representa los distintos dominios de VE-cadherina: el dominio extracelular encargado de mediar la interacción con otras proteínas, así como con la propia VE-cadherina, el dominio transmembrana y el dominio intracelular donde se encuentran los residuos de Y658, S665, Y685 y Y731, cuya fosforilación es esencial para la función de VE-cadherina.

A pesar de ser un marcador clásico de células endoteliales, se observó que las células de melanoma VM⁺ expresaban VE-cadherina de manera aberrante y que su depleción interfería con la capacidad de realizar VM [213]. A partir de este descubrimiento, numerosos autores detectaron su expresión en múltiples tipos de tumores VM⁺, demostrando que jugaba un papel importante en el desarrollo este fenómeno [199,214–217]. Se han descubierto varias proteínas y rutas de señalización que inducen la expresión de VE-cadherina en células tumorales como ZEB1, HER2, Nodal o Wnt3a [214,215,218]. Por ejemplo, se ha descrito que el factor Notch4 puede inducir la

expresión de la proteína Nodal, miembro de la familia de TGF- β . La proteína Nodal a su vez puede inducir la expresión de VE-cadherina, de manera que el silenciamiento de Notch4 o Nodal reduce los niveles de VE-cadherina y con ello la formación de VM [219]. La expresión de Wnt3a también se ha correlacionado con el proceso de VM en pacientes de cáncer de colon y en estudios *in vitro* donde se ha demostrado que Wnt3a puede aumentar la expresión de VE-cadherina y VEGFR2, así como la formación de estructuras en forma de tubo [220].

Los factores de transcripción HIF-1 α , HIF-2 α , TWIST1 y SP1 también están implicados en la expresión de VE-cadherina durante el VM, pues se ha visto que pueden unirse a su promotor para inducir la transcripción. Los factores HIF-1/2 α y TWIST1 son inducidos por la hipoxia, mientras que el factor SP1 es inducido por la proteína IGFBP2, la cual se encuentra sobreexpresada en cáncer [199,216,221,222]. En melanoma, la expresión de VE-cadherina se ha asociado con subpoblaciones de células progenitoras tumorales ABCB5⁺ y CD133⁺, en ambos casos contribuyendo al desarrollo de VM [223].

No obstante, el papel de VE-cadherina en la formación de VM es más complejo y va más allá de su expresión aberrante. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la fosforilación de VE-cadherina en el residuo de Y658 es crucial para el proceso de VM en células de melanoma uveal y cutáneo. En las células endoteliales, VE-cadherina puede ser fosforilada en varios residuos de tirosinas y serinas con el fin de regular su localización y estabilidad. Cuando VE-cadherina es fosforilada en el residuo de Y658, S665 o Y685 se internaliza y se marca para su degradación, provocando así una desestabilización en las uniones adherentes de las células endoteliales [224,225]. Este mecanismo es necesario para algunos procesos fisiológicos como el crecimiento vascular y la trans migración de leucocitos [226]. Sin embargo, la excesiva internalización de VE-cadherina puede alterar la barrera de las células endoteliales, como por ejemplo ocurre en los procesos de angiogénesis tumoral. Es por ello que la fosforilación de VE-cadherina se regula de manera estricta, dependiendo de estímulos muy específicos como por

INTRODUCCIÓN

ejemplo la estimulación con VEGF y de enzimas fosfatasa como VE-PTP, controlando así la desfosforilación de los residuos [227]. En células endoteliales, se ha observado que la quinasa FAK puede fosforilar el residuo de Y658 en respuesta a VEGF durante la angiogénesis tumoral con el fin de promover la permeabilidad vascular, la intravasación de células tumorales y la metástasis. Sin embargo, en células de melanoma cutáneo y uveal con capacidad de realizar VM, VE-cadherina está siendo fosforilada de manera constitutiva en el residuo de Y658 por la quinasa FAK, la cual parece permanecer activa de manera constante [228–230]. Una vez fosforilada VE-cadherina es internalizada, aunque no se desencadena el proceso de degradación. En su lugar, VE-cadherina se transloca al núcleo donde forma un complejo con la catenina p120 y el represor transcripcional *Kaiso*. Al unirse a VE-cadherina y p120, *Kaiso* deja de estar unido al ADN, permitiendo así la expresión de los genes que reprime (*CCND1* y *WNT11*). La inhibición de FAK con el inhibidor PF-271 o el silenciamiento de los genes diana de *Kaiso* bloquea la formación de estructuras en forma de tubo sobre matrigel, indicando que la fosforilación de Y658 de VE-cadherina y su efecto sobre *Kaiso* son importantes mediadores en la formación de VM [229] (Figura 13).

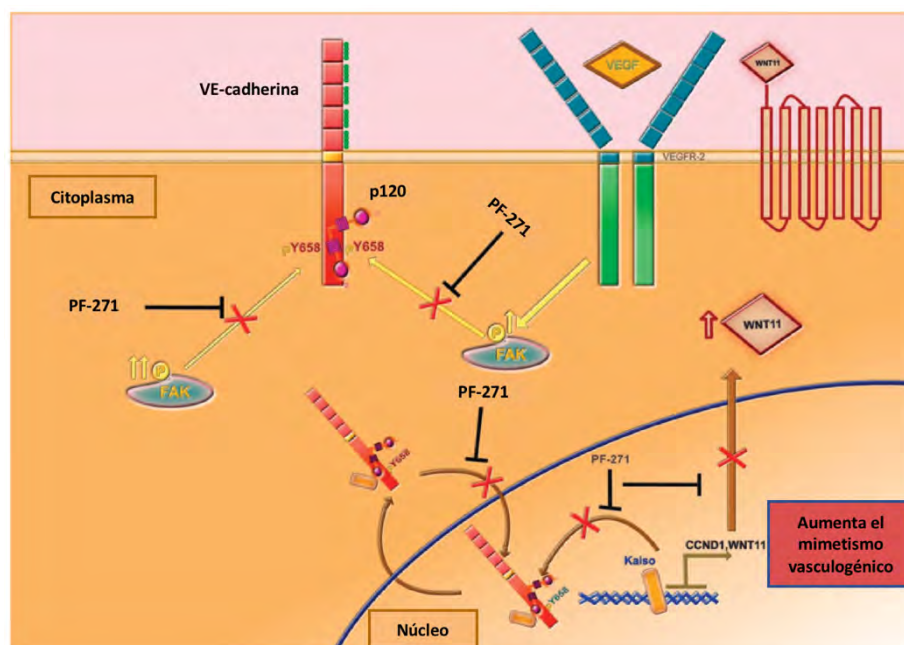


Figura 13. Implicación de VE-cadherina en el mimetismo vasculogénico. El complejo VE-cadherina/p-120 media el secuestro del represor *Kaiso*, promoviendo la activación de genes reprimidos por éste (*CCND1* y *WNT11*) que inducen la formación de mimetismo vasculogénico. Imagen adaptada de Delgado-Bellido D; 2019 [229].

Además, se ha demostrado la relevancia de VE-PTP en el VM. Nuestro grupo ha demostrado que la falta de esta fosfatasa conlleva a un aumento de la fosforilación de p120, lo que provoca la desestabilización del complejo p120/VE-cadherina, la degradación de VE-cadherina vía autofagia y con ello la reducción de la formación de estructuras con forma de tubo sobre matrigel [231] (Figura 14).

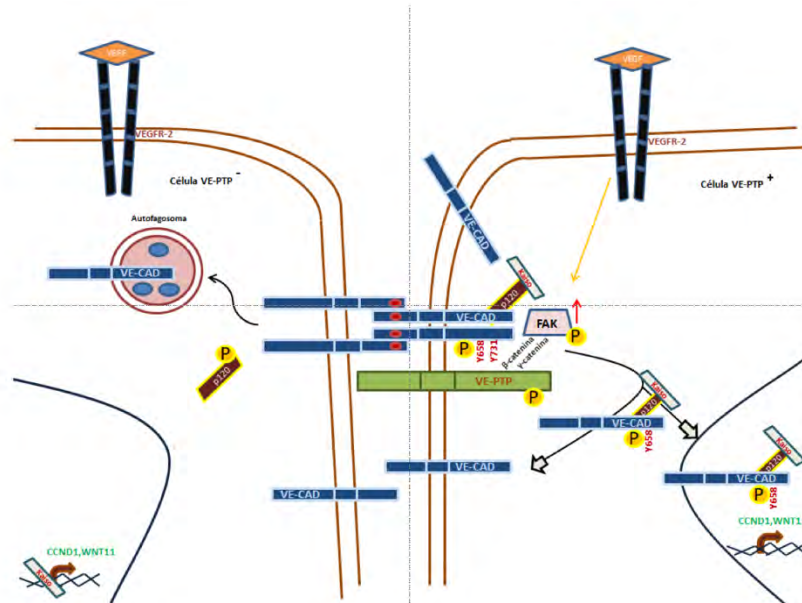


Figura 14. El efecto de VE-PTP sobre el mimetismo vasculogénico. La falta de VE-PTP puede disminuir la formación de mimetismo vasculogénico a través de la degradación de VE-cadherina por vía autofágica. Imagen adaptada de Delgado-Bellido D; 2020 [231].

La fosforilación del residuo de Y658 de VE-cadherina no ha resultado ser el único relevante en el proceso de formación de VM. La proteína S1PR1 puede mediar la fosforilación del residuo de Y731. A diferencia de otros residuos como Y658 y Y685, el residuo de Y731 está fosforilado de manera constitutiva y es su desfosforilación lo que causa la internalización de VE-cadherina, por lo que dicha fosforilación mediada por S1PR1 reduce la formación de VM [232,233].

INTRODUCCIÓN

1.3.3. Otros factores que contribuyen a la formación de mimetismo vasculogénico

Existen numerosos estudios que apoyan la relevancia de la proteína VE-cadherina en la formación de VM. No obstante, conforme se ha ido avanzando en el estudio del VM, también se ha descubierto la contribución de otras rutas de señalización a la formación de dicho fenómeno. Además de su papel en la fosforilación de VE-cadherina, la quinasa FAK puede promover el VM mediante el incremento de la señalización de la ruta de ERK1/2. Esta ruta promueve la actividad de proteasas de la matriz extracelular como por ejemplo MMP14. Se ha demostrado que MMP14 actúa activando la proteasa MMP2, la cual se encarga de escindir la laminina 5 γ 2, un componente de la membrana basal, para producir los fragmentos pro-migratorios γ 2' y γ 2x. Un estudio mostró que los niveles de expresión de MMP14, así como de MMP2 y la laminina 5 γ 2 eran superiores en células de melanoma agresivas VM⁺ al compararlas con células de melanoma poco agresivas VM⁻ [230,234]. Esto puso de manifiesto el papel que puede llegar a tener la degradación y/o remodelación de la matriz extracelular en la formación de VM. La composición y arquitectura de la propia matriz extracelular puede afectar al VM, ya que se ha visto por ejemplo que el colágeno I dificulta la formación de VM *in vitro* mediado por VEGF, mientras que el dominio 11 no colágeno del colágeno XVI parece favorecerla. Asimismo, se ha demostrado que una matriz de colágeno de alta densidad promueve la expresión de la integrina β 1, lo cual desencadena una respuesta transcripcional que favorece la migración y la formación de VM [235–237].

La hipoxia es un factor que también promueve el proceso de VM de manera independiente a la regulación de VE-cadherina mediada por HIF. Por ejemplo, se ha descrito que la enzima LOXL2 y la proteína BNIP3, ambas inducidas en condiciones de hipoxia por HIF-1, pueden favorecer el VM a través de la remodelación de la matriz extracelular y del citoesqueleto, respectivamente. Un estudio mostró que el silenciamiento de BNIP3 impedía que células de melanoma formasen estructuras en forma de tubo sobre matrigel a pesar de la activación de FAK [238,239].

Por último, se ha demostrado que la formación de VM puede darse de manera independiente a la presencia/ausencia de VE-cadherina. Desde su descripción por el grupo del Dr. Hendrix, el VM suele detectarse *in vivo* por la presencia de canales PAS⁺ y PECAM-1/CD31⁻ o PAS⁺ y CD34⁻. Sin embargo, un estudio publicado por Dunleavy y compañía demostró que existían subpoblaciones de células de melanoma de ratón que podían expresar espontáneamente PECAM-1 y promover la formación de VM *in vitro* e *in vivo*, independientemente de VE-cadherina y VEGFR [240].

1.3.4. Microambiente tumoral y mimetismo vasculogénico

Al igual que con la angiogénesis endotelial, se ha demostrado que la formación de mimetismo vasculogénico tampoco depende únicamente de las células tumorales. El grupo de Hendrix publicó en 2002 el primer estudio en el que se ponía de manifiesto la influencia del microambiente tumoral sobre la capacidad de formación de VM. El trabajo publicado consistió en un estudio *in vivo* en el que se inyectaron células de melanoma cutáneo altamente agresivas (C8161) y poco agresivas (C81-61) en ratones *nude* a los que previamente se les había inducido un ambiente isquémico por oclusión de la arteria femoral. Los resultados mostraron que sólo las células de melanoma altamente agresivas se reagruparon para reperfundir la zona isquémica. Además, se observó que únicamente los ratones que habían sido inyectados con la línea de melanoma agresiva expresaban marcadores de vasculogénesis embrionaria como Notch3/4 [241]. Varios estudios han demostrado que las células de melanoma altamente agresivas no sólo tienen capacidad de formar VM, sino que además pueden modificar el microambiente para inducir la formación de VM en otras poblaciones celulares. Ejemplo de ello son las células de melanoma poco agresivas que de por sí no podían realizar VM mediante la inducción de expresión de ciertas proteínas como VE-cadherina, VEGF-C, EphA2, TIE-1, laminina 5γ2 y algunas metaloproteinasas o las células estromales mesenquimales a través de la expresión de VEGF-A [242,243].

INTRODUCCIÓN

La hipoxia puede influir en la formación de VM de distintas formas además del efecto mediado por la estabilidad de HIF-1/2 α . Se ha observado que la reducción en la producción de ROS puede activar el protooncogen *MET*, el cual puede inducir en células de melanoma la formación de estructuras en forma de tubos sobre matrigel [244]. Asimismo, se ha descrito que la falta de oxígeno y nutrientes podría favorecer que las células progenitoras tumorales CD133⁺ llevaran a cabo la formación de VM en pacientes con cáncer de riñón [245].

Varios autores han señalado que las células del sistema inmunitario juegan un papel importante en el fenómeno de VM. Por ejemplo, se ha descubierto que los TAMs promueven la formación de VM en células de glioblastoma multiforme mediante la inducción de la expresión de la enzima COX2 [246]. Los CAFs también pueden llegar a ser determinantes para el fenómeno de VM, pues se ha descrito la relación entre la expresión de la proteína de la matriz extracelular CCN2 por parte los CAFs y los procesos de vascularización tumoral, incluido el VM. Así pues la ausencia de CCN2 impide la formación de VM [247].

Por último, un estudio publicado recientemente por Thijssen y por nuestro propio grupo ha revelado el papel que juegan los pericitos en el VM. Se ha visto que los pericitos pueden asociarse a los pseudotubos formados a partir de células de melanoma que han llevado a cabo el proceso de VM, promoviendo su estabilidad. Dicho reclutamiento está mediado por la secreción de PDGF β por parte de las células tumorales y pone de manifiesto la importancia de esta población celular en la vascularización tumoral dependiente de VM [248,249].

1.4. La familia de proteínas PARP

Las proteínas PARP (Poli ADP-ribosa Polimerasas), también llamadas ARTDs (ADPRTs, diphtheria toxin-like) constituyen una familia formada por 17 miembros, todos ellos caracterizados por homología de secuencia con el dominio catalítico de primer miembro descrito de la familia, llamado PARP-1. Todos los miembros presentan estructura, actividad catalítica, localización

subcelular y funciones diferentes; sin embargo el 90% de los miembros de la familia son consideradas proteínas que modifican postraduccionalmente otras proteínas, denominándose de forma genérica como “*ADP-ribose-writers*” [250,251]. Basándose en sus dominios estructurales y funciones, los distintos miembros PARPs pueden ser clasificados en 4 subgrupos. [252–254](Figura 15):

- **PARPs dependientes de ADN:** PARP1 (ARTD1), PARP2 (ARTD2) y PARP3 (ARTD3) tienen en común un dominio de unión al ADN involucrado en la respuestas ante situaciones de daño al ADN.
- **Tankirasas:** Tankirasa 1 (TNKS, TNKS1, PARP5a, ARTD5) y tankirasa 2 (TNKS2, PARP5b, ARTD6) interactúan con una gran variedad de sustratos a través de su dominio Ankirina (ANK), que permite la interacción proteína-proteína.
- **PARPs CCCH:** PARP7 (ARTD14), PARP12 (ARTD12) y PARP13 (ARTD13) se caracterizan por presentar un dominio de unión y regulación al ARN Cis-Cis-Cis-His, nombrándolas como RBPs o proteínas de unión al ARN.
- **Macro-PARPs:** PARP9 (BAL1, ARTD9), PARP14 (BAL2, ARTD8) y PARP15 (BAL3, ARTD7) son proteínas capaces de reconocer unidades de ADP-ribosa unida a diferentes dianas de PARPs, a través de un macrodominio que las caracteriza. Son denominadas comúnmente “*ADP-ribose Readers*”.
- **Otras PARPs:** El resto de los miembros tienen una arquitectura distinta, por lo que no encajan en la clasificación: PARP4 (ARTD4), PARP6 (ARTD17), PARP8 (ARTD16), PARP10 (ARTD10), PARP11 (ARTD11) y PARP16 (ARTD15).

Cada miembro de la familia presenta una capacidad intrínseca para modificar diferentes sustratos a través de ADP-ribosilación. Actualmente esta actividad catalítica no ha sido descrita en varios miembros PARPs, a pesar de presentar estructuralmente el dominio catalítico o “Firma PARP”. El proceso de ADP-ribosilación consiste en una modificación postraducciona l de proteínas, que

INTRODUCCIÓN

resulta en la unión covalente de unidades de ADP-ribosa (ADPr); pudiendo ser la unión de mono ADP-ribosa (MAR, MARilación) o un polímero de longitud variada que puede ser lineal o ramificado llamado poli ADP-ribosa (PAR, PARilación o Poli ADP-ribosilación). La capacidad de sintetizar polímeros o monómeros de ADP-ribosa, partiendo del sustrato β -NAD⁺, y transferirlos covalentemente, permite renombrar las proteínas PARP como ADP-ribosas Transferasas (ARTDs). Hasta la fecha sólo 5 PARPs pueden llevar a cabo PARilación: PARP1, PARP2, PARP3, TNKS1 y TNKS2 mientras que PARP4, PARP6, PARP7, PARP8, PARP10, PARP11, PARP12, PARP14, PARP15, PARP16 y según ciertos autores también PARP3 catalizan reacciones de MARilación [255–258]. A través de técnicas de secuenciación se ha identificado la presencia del dominio PARP en la proteína PARP13, aunque no se ha caracterizado si puede llevar a cabo reacciones de MARilación o PARilación. En cuanto a PARP9, en un principio se describió como catalíticamente inactiva, pero estudios recientes han demostrado que es capaz de llevar a cabo la MARilación de ciertos motivos de la ubiquitina ligasa Dtx3L, contribuyendo así a su heterodimerización y jugando un papel relevante en procesos de ubiquitinación [254,259].

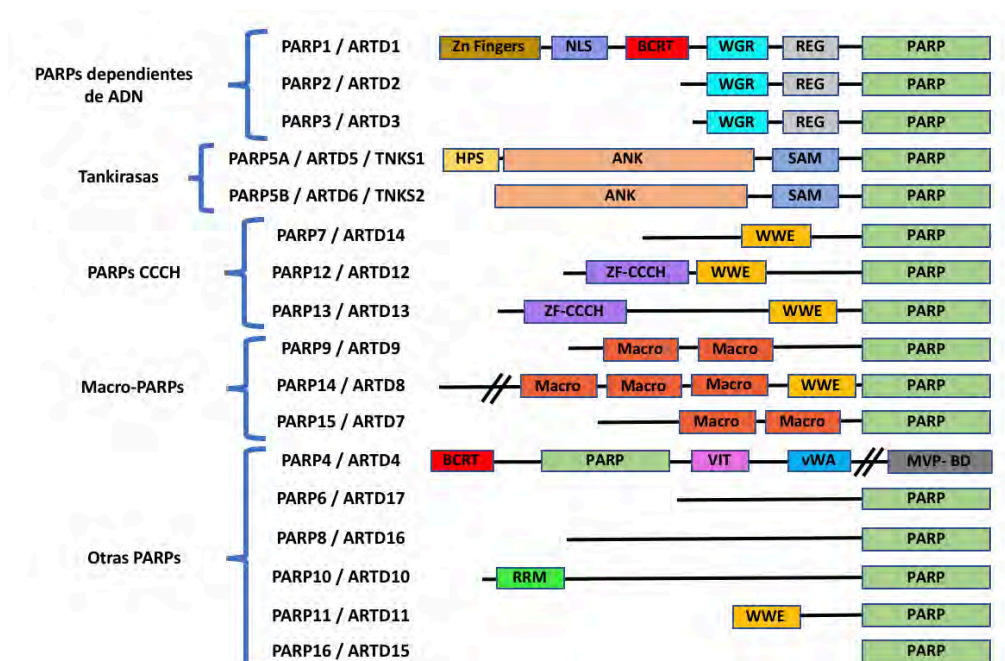


Figura 15. Clasificación de la familia PARP. Imagen en la que se muestra la clasificación de la familia PARP de acuerdo a la arquitectura de sus dominios. En base a este criterio existen 4 grupos: PARPs dependientes de ADN, tankirasas, PARPs CCCH y macro-PARPs. El resto de PARPs dada la variedad de dominios que hay en su estructura no encajaría en ninguno de los grupos mencionados previamente.

La mayoría de los estudios llevados a cabo durante las tres últimas décadas se han centrado en la caracterización funcional, bioquímica y clínica del grupo de PARPs dependiente de ADN. Desde la década de los 80, varios grupos han denominado a PARP1 como uno de los principales elementos relacionados con el reclutamiento y la liberación de proteínas implicadas en el reconocimiento y la reparación del daño al ADN, tanto en condiciones basales como en situaciones de estrés celular [260,261]. PARP1 se ha considerado el principal miembro de la familia PARP, pues es responsable de sintetizar aproximadamente el 90% de PAR necesario para mantener la homeostasis celular. Las dianas moleculares de PARP1 son variadas y se relacionan con procesos tales como reconocimiento y reparación del ADN, transcripción, replicación y proliferación celular [262]. Sin embargo, la repercusión clínica de esta proteína ha crecido exponencialmente en los últimos 20 años, caracterizándola como una diana terapéutica en inflamación, angiogénesis e hipoxia, progresión tumoral y adaptabilidad de células tumorales o diversas enfermedades neurodegenerativas. [263–269]. Basándose en la relevancia de PARP1 en diferentes enfermedades humanas y teniendo en cuenta su actividad enzimática, se han generado una importante batería de inhibidores catalíticos (competidores por el centro activo con β -NAD⁺) todos ellos con gran relevancia clínica en diversas patologías. En oncología a día de hoy la FDA ha aprobado el uso de cuatro inhibidores de PARP (olaparib, rucaparib, niraparib y talazoparib) como tratamiento frente a tumores de mama, ovario y próstata que presentan mutaciones en los genes *BRCA 1/2* [254,270]. La bioquímica de la inhibición de PARP se basa en los mecanismos de letalidad sintética, en aprovechar una “ventaja molecular” de una célula tumoral que para cualquier célula no transformada ocasionaría muerte celular, volviéndola en su contra en un juego de doble inhibición y eliminación selectiva de estas células transformadas [271]. No obstante, nuevos grupos han centrado sus proyectos en el estudio funcional y bioquímico de otros miembros menos caracterizados, cuyo potencial clínico está en expansión. De todos ellos, el grupo de las tankirasas presenta un gran potencial terapéutico aplicado principalmente al cáncer, pero también a otras

INTRODUCCIÓN

enfermedades humanas como fibrosis, isquemia miocárdica, diabetes y enfermedad de Chagas [272–276], por lo que las consideramos como objeto de estudio en esta tesis doctoral.

1.4.1. Tankirasa 1 y tankirasa 2: similitudes y estructura

Tankirasa 1 (TNKS1) y tankirasa 2 (TNKS2) son dos proteínas homólogas que comparten un 81% y un 85% de homología a nivel de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente [277]. El gen de *TNKS* se localiza en el cromosoma 8 y su estructura a nivel de proteína contiene cuatro dominios diferentes: El dominio catalítico PARP en el extremo C-terminal, encargado de mediar la adición de cadenas lineales de PAR a los sustratos; el motivo alfa estéril (SAM) responsable de la formación de homo y heteroligómeros; el dominio ankirina (ANK) dividido en 5 subdominios (ARC 1-5) que sirven como sitio de unión a los sustratos; y el dominio rico en histidina, prolina y serina (HPS) en el extremo N-terminal cuya función se desconoce a día de hoy [278,279]. *TNKS2* se encuentra en el cromosoma 10 y su estructura es similar a la de TNKS1, presentando un 94% de homología en el dominio catalítico, un 74% en el dominio SAM y un 83% en el dominio ANK. Sin embargo, TNKS2 presenta una región N-terminal diferente, pues carece del dominio HPS [280] (**Figura 16**).



Figura 16. Estructura de TNKS1 y TNKS2. Imagen en la que se muestra la estructura de ambas tankirasas: El dominio catalítico PARP, el motivo alfa estéril (SAM), el dominio ankirina y en el caso de TNKS1 el motivo HPS.

El dominio catalítico se encuentra muy conservado en todos los miembros de la familia PARP. Su función consiste en transferir unidades de ADP-ribosa desde moléculas de NAD^+ a los distintos sustratos de tankirasa. Este dominio contiene un sitio donador, donde las moléculas de NAD^+ se unen y son hidrolizadas, y un sitio aceptor donde las proteínas aceptoras reciben las unidades de

ADP-ribosa [281,282]. El sitio donador a su vez se puede dividir en la zona nicotinamida (adyacente al sitio aceptor) y la zona adenosina. La zona nicotinamida de tankirasas se ha descrito como flexible y presenta una conformación cerrada en ausencia de sustrato gracias a un bucle D, el cual cierra el surco de unión a NAD^+ . En la fase inicial, la molécula de NAD^+ se sitúa en el sitio donador, mientras que la proteína diana se acomoda en el sitio aceptor. Entonces, se produce la hidrólisis de la molécula de NAD^+ , liberando nicotinamida y el grupo ADPr que se transfiere a la proteína aceptora (**Figura 17A**) [283,284]. Los residuos de glutamato, lisina, arginina, serina, aspartato y tirosina son conocidos aceptores de las unidades de ADPr por parte de la familia PARP, aunque ensayos *in vitro* han demostrado hasta la fecha que los residuos de glutamato y aspartato son los principales receptores en los sustratos de tankirasa [250,285–287]. En la fase de elongación, una nueva molécula de NAD^+ se une al sitio donador, pero en este caso, la cadena de ADPr ocupa el sitio aceptor y es la receptora de la nueva unidad de ADPr (**Figura 17A**) [288]. El dominio PARP presenta una triada de aminoácidos HYX cerca de la zona nicotinamida. Esta triada contiene histidina y tirosina en primera y segunda posición, mientras que el aminoácido de la tercera posición puede variar. Los residuos de histidina y tirosina median la unión de NAD^+ . Todos los miembros de la familia PARP que PARilan contienen la triada HYE, mientras que los miembros que MARilan presentan diferentes variantes (HYI, HYL y HYY). Basándose en estudios realizados con PARP1, el proceso de elongación parece necesitar como tercer residuo glutamato, porque puede estabilizar la cadena creciente de ADPr situada en el sitio aceptor a la vez que activa la posición 2' hidroxilo para aceptar la nueva molécula de ADPr [250,256,257,284]. En cuanto a las cadenas de polímero, para la formación de cadenas de PAR ramificadas, es necesario que la cadena rote 180° y para ello se requiere un surco lo suficientemente amplio en el sitio aceptor. El sitio aceptor de PARP1 puede albergar la cadena de polímero en ambas direcciones, aunque el sitio aceptor de tankirasas es más estrecho, de manera que esta podría ser la causa por la que tankirasa sólo podría mediar la formación de cadenas de PAR lineales [288,289].

INTRODUCCIÓN

El dominio SAM es responsable de la formación de homo- y heteroligómeros con otras tankirasas, aunque también se ha descrito que puede mediar la interacción con ADN, ARN y lípidos [290,291]. Se ha descrito que el dominio SAM de tankirasa es capaz de formar oligómeros de más de 30 moléculas de TNKS1 y/o TNKS2 y que este es un proceso reversible, puesto que los oligómeros pueden ser disociados cuando tankirasa se PARila a sí misma [292–294]. La estructura primaria de este dominio se encuentra muy cerca del dominio catalítico PARP, concretamente a 18 aminoácidos del sitio donador. Es por ello por lo que el dominio SAM parece interaccionar con el dominio PARP o incluso incrementar su actividad catalítica a través de la oligomerización (**Figura 17B**) [293,294]. Hasta la fecha no está claro del todo cómo la formación de oligómeros puede regular la actividad catalítica de tankirasa. Un análisis reciente del dominio catalítico de tankirasa (*Protein Data Bank, PDB database*) mostró la formación de dímeros del dominio catalítico, lo cual parecía alejar el bucle D del sitio nicotinamida con el fin de abrir el surco de unión a NAD⁺ y facilitar su acceso. Los miembros PARP1 y PARP2 presentan un dominio regulador α -hélice (ARD) responsable de la inhibición catalítica. Por el contrario, TNKS1 y TNKS2 no tienen este dominio regulador, aunque se ha visto que la estructura del bucle D está muy conservada en la estructura de tankirasa de distintas especies, pero no de otras PARPs. Por ello, este modelo proporciona un nuevo mecanismo de la regulación de tankirasa y podría explicar el papel de la oligomerización y el dominio SAM en la regulación de su actividad catalítica [295–297].

El dominio ankirina contiene 24 repeticiones de ankirina organizados en 5 subdominios, llamados comúnmente clúster de repeticiones de ankirina (ARC) [282,292,298]. Este dominio se encarga de la interacción de tankirasa con las proteínas diana gracias al reconocimiento del motivo de unión a tankirasa (TBM) presente en los sustratos. Cada ARC trabaja como una unidad básica de reconocimiento de péptidos presente en los sustratos de tankirasa [299,300]. Se han estudiado las distintas propiedades de los ARCs y se ha visto que ARC1, ARC2, ARC4 y ARC5 son capaces de interaccionar con los sustratos de tankirasa de un modo similar, mientras que ARC3 parece que no es capaz de unirse a los sustratos (**Figura 17C**) [284,301]. Cada ARC muestra distintas

afinidades por los sustratos de tankirasa y la posición espacial que presentan es esencial para la unión de tankirasa a las proteínas diana. Un modelo basado en cristalografía y dispersión de rayos X mostró que ARC1, ARC2 y ARC3 presentan una conformación rígida, mientras que ARC4 y ARC5 tienen una conformación más flexible. Además, ARC2 y ARC4 presentan una mayor afinidad por la unión de péptidos en comparación con ARC1 y ARC5. Toda esta información parece apuntar a que el dominio ANK de tankirasa funciona como un sistema de unión multivalente con una estructura especial que explica cómo los ARCs colaboran entre sí para interactuar con los distintos sustratos. El estudio sobre cómo TNKS1 interactúa con la proteína axina 1 también dio lugar a la idea de que la forma en la que axina 1 se une a TNKS1 favorece su PARilación debido a que esta se produce en la orientación óptima para dejar el dominio catalítico cerca de la proteína diana (**Figura 17C**) [294,301].

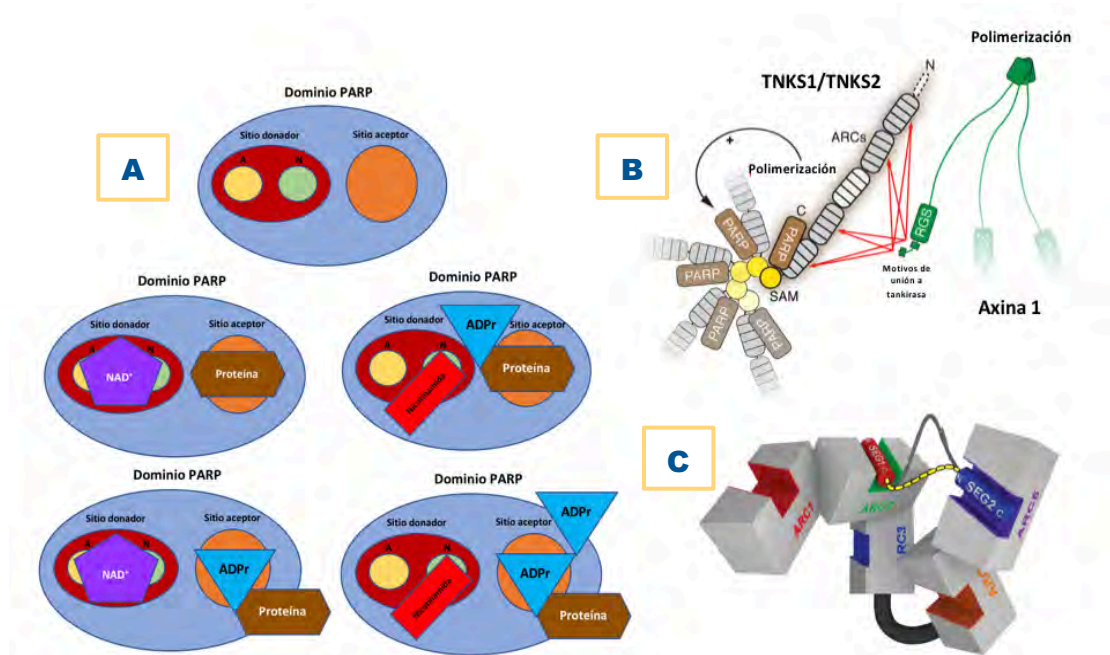


Figura 17. El proceso de PARilación y la regulación de TNKS1/2. A) Estructura del dominio catalítico PARP de tankirasa y su papel en el proceso de PARilación. **B)** Esquema de la formación de oligómeros de tankirasa mediado por el dominio SAM para así favorecer su actividad catalítica. **C)** Representación espacial de la organización de los distintos ARCs del dominio ANK de tankirasa e interacción con los TBMs (SEG1 y SEG2) de la proteína axina 1. Imagen adaptada de Eisemann T; 2016 y Mariotti L; 2018 [301,302].

INTRODUCCIÓN

1.4.2. Funciones y sustratos de TNKS1/2

Tankirasa 1 y tankirasa 2 fueron descubiertas como proteínas asociadas a telómeros debido a su interacción con el factor TRF1 [277,303]. TNKS1 ha sido el miembro más estudiado dado que es la isoforma más abundante. No obstante, desde su descubrimiento, se les ha asociado con múltiples funciones como la elongación de los telómeros, la señalización de la ruta Wnt/ β -catenina, la regulación de la degradación proteasomal, la formación de gránulos de estrés, la mitosis y la pexofagia [284,304]. Ambas tankirasas parecen tener la mayoría de los sustratos en común y una localización similar que incluye aparato de Golgi, citosol, peroxisomas, telómeros, centrosomas y poros nucleares [303,305–308]. Además, el doble KO de TNKS1/2 presenta letalidad embrionaria en ratones, mientras que la pérdida de TNKS1 o TNKS2 sí es viable y sólo genera daños leves (algún desorden metabólico o alteraciones en el tamaño) [278]. Por lo tanto, las tankirasas podrían compartir la mayoría de sus funciones y/o sustratos, de manera que una podría sustituir a la otra, aunque también se ha demostrado que las dos son necesarias para mantener ciertas funciones [306]. Para hablar de cómo tankirasa lleva a cabo su función es necesario hablar del motivo de unión a tankirasa (TBM), una secuencia de aminoácidos presente en todos sus sustratos. Inicialmente, el TBM fue descubierto como un hexapéptido RQSPDG, aunque varios estudios finalmente definieron la secuencia consenso del TBM como una secuencia de 8 residuos RXXPDGXX. De acuerdo a las evidencias científicas, los residuos necesarios para la unión son la arginina en primera posición y la glicina en sexta posición. La segunda y tercera posición pueden estar ocupadas por la mayoría de los aminoácidos excepto fenilalanina; la cuarta posición tiene que contener un aminoácido pequeño hidrofóbico; el quinto residuo suele ser aspartato; la séptima posición puede albergar la mayoría de los residuos excepto prolina y en octava posición se suele encontrar un residuo ácido [298,305,309]. No obstante, otro TBM diferente al TBM consenso o canónico ha sido descrito. Este TBM no canónico contiene aminoácidos adicionales entre la arginina de la primera y la glicina de la sexta posición y su mecanismo de unión al motivo ANK de TNKS1/2 parece ser el mismo que el de los TBMs canónicos. Esta información añadió

nuevas posibilidades al concepto de TBM y permitió incrementar el número de posibles sustratos de tankirasa, ya que algunos como axina 1 y RNF146 presentan ambos tipos de TBMs (canónicos y no canónicos) mientras que otros como NELFE y IF4A1 sólo contendrían TBMs no canónicos [301,310].

Como parte de la familia PARP, tankirasa puede mediar la adición de cadenas lineales de PAR a las proteínas sustrato. La PARilación es una modificación postraducciona covalente e irreversible. Los oligómeros de ADP-ribosa están cargados negativamente y este efecto puede alterar las propiedades de las proteínas aceptoras [311]. A diferencia de los otros miembros PARPs, tankirasa no contiene el dominio regulador α -hélice. Sin embargo, se ha visto que los dominios SAM y ANK pueden contribuir a la regulación de su actividad catalítica. Asimismo, ha comprobado que el hecho de poseer sólo uno o más TBMs no es suficiente para interactuar con tankirasa, sino que la posición de los distintos TBMs tiene que ser la adecuada para encajar e interactuar con el dominio ANK y posteriormente con el dominio PARP [293,295,301]. Todos estos mecanismos reguladores permiten una gran diversidad de respuestas biológicas tras la interacción con tankirasa, incluyendo la degradación proteasomal, la inactivación catalítica de tankirasa, la disrupción de complejos proteicos y la interacción entre proteínas gracias a su actividad de anclaje **(Figura 18) (Tabla 3) [298]:**

A. Degradación proteasomal. La función mejor caracterizada de tankirasas es la regulación de la estabilidad de proteínas vía la degradación proteasomal. La PARilación por tankirasas está estrechamente relacionada con la ubiquitinación mediada por una ubiquitina E3 ligasa llamada RNF146 o Iduna. Las tankirasas reconocen los distintos sustratos y los PARilan a través del dominio ANK y PARP, respectivamente. Entonces, RNF146 reconoce los sustratos PARilados a través de su dominio WWE, el cual reconoce los motivos de iso-ADPr presente únicamente en las cadenas de PAR. RNF146 cataliza la formación de una cadena de poliubiquitinas unidas entre sí por su lisina 48 con el fin de desencadenar la degradación del

INTRODUCCIÓN

sustrato en el proteasoma 26S. Este proceso es comúnmente conocido como ubiquitinación dependiente de PAR (PARdU) y fue descubierto mientras se estudiaba la implicación de RNF146 y TNKS1/2 en el proceso de degradación de axina 1 [312–314]. Varios grupos han demostrado que es necesaria una cadena de al menos cuatro ubiquitinas unidas por la lisina 48 para lograr la degradación proteasomal del sustrato [284]. Hasta la fecha, se ha descrito que la estabilidad de gran cantidad de proteínas está regulada por el mecanismo de PARdU, incluyendo axina 1/2, PTEN, 3BP2, TRF1 o incluso las propias tankirasas y RNF146 [298,303,312,315]. Se ha demostrado que tankirasa puede mediar su propia PARilación y posterior degradación a través de RNF146 y que la propia Iduna también es sustrato de tankirasa y puede mediar la degradación de aquellas RNF146 que hayan sido PARiladas (**Figura 18A**) (**Tabla 3**) [313,316].

- B. Otras respuestas biológicas desencadenadas tras la interacción con tankirasas.** A pesar de que el conocimiento sobre tankirasas está aumentando, algunos aspectos no parecen estar claros. Uno de ellos es cómo se regula la actividad catalítica de TNKS1/2. El dominio ANK de tankirasa es responsable de la interacción con una gran variedad de sustratos [285,301]. Esta variedad hace que tankirasa participe en múltiples procesos biológicos como el mantenimiento de los telómeros, la regulación del ciclo celular, la estabilidad de proteínas y el crecimiento celular [284,304]. Se ha demostrado que la mayoría de los sustratos de tankirasa son PARilados y que la respuesta biológica más común desencadenada tras dicha PARilación es el reconocimiento de los sustratos por la ubiquitina E3 ligasa RNF146 y la posterior ubiquitinación y degradación proteasomal de la proteína sustrato [316]. Sin embargo, existen varias evidencias que sugieren que esta no es la única respuesta biológica. Un estudio reciente mostró a LKB1 como un nuevo sustrato de tankirasa que tras ser PARilado era reconocido por RNF146, pero no degradado [317]. Se ha descrito que otras proteínas como Mcl-1, PEX14, ATG9A, MERIT40 y la enzima GMD también interaccionan con tankirasa, aunque no son modificadas e incluso pueden llegar a inhibir su actividad catalítica, indicando

que son diferentes parámetros los que determinan la interacción y/o PARilación por parte de TNKS1/2 (**Tabla 3**) [307,318–320]:

- **Disrupción de complejos.** LKB1 es una serina/treonina quinasa que regula la activación de AMPK (sensor energético celular) mediante su fosforilación [321]. Se ha visto que presenta una actividad catalítica muy débil por sí sola, de manera que necesita formar un complejo junto con las proteínas STRAD y MO25 para llevar a cabo la fosforilación de AMPK [322]. Dos TBMs fueron encontrados en la secuencia de aminoácidos de LKB1 y además se observó que RNF146 era capaz de reconocer a LKB1 tras ser PARilado por TNKS1/2. Sin embargo, un ensayo de ubiquitinación *in vivo* demostró que en el caso de LKB1, RNF146 no catalizaba su degradación vía proteasoma, sino que sintetizaba una cadena de poliubiquitinas unidas entre sí por la lisina 63, lo cual evitaba la formación del complejo LKB1-STRAD-MO25, bloqueando así su actividad quinasa (**Figura 18B**) (**Tabla 3**). Este hecho supuso el descubrimiento de un nuevo mecanismo de PARdU [317].
- **Inhibición de la actividad catalítica.** GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD) es una enzima necesaria para la síntesis *de novo* de fucosa [323]. GMD fue identificada como sustrato de TNKS1 y aunque un análisis de la secuencia de GMD reveló la presencia de un TBM, múltiples evidencias probaron que ésta no podía ser PARilada por tankirasa. De hecho, se observó que la unión de GMD a tankirasa suprimía su actividad catalítica (**Figura 18C**) [319]. Este caso no ha sido el único descrito, ya que un estudio previo detectó que la proteína Mcl-1, implicada en la regulación de la apoptosis, seguía un comportamiento similar. Se ha visto que Mcl-1 es capaz de inhibir la actividad catalítica de tankirasa, aunque no al mismo nivel que GMD y tampoco se ha confirmado si dicha habilidad depende de su TBM (**Tabla 3**) [318].
- **Función de anclaje.** El papel de las tankirasas en la homeostasis celular no sólo se define por la capacidad de PARilar gran cantidad de proteínas. TNKS1/2 puede formar estructuras multiméricas con otras tankirasas a través de su dominio SAM, actuando, así como proteínas de anclaje las cuales promueven la interacción entre diferentes proteínas a través de la unión

INTRODUCCIÓN

de estas al dominio ANK. La primera evidencia de esta nueva función se descubrió cuando se observó que tankirasa también tenía un papel relevante en la ruta de Wnt/ β -catenina independientemente de su actividad PARiladora [294,296,297]. Posteriormente, un estudio de proteómica reveló la interacción de ambas tankirasas con dos proteínas implicadas en la pexofagia, PEX14 y ATG9A. De acuerdo a dicho estudio, TNKS1/2 actúa como proteína de anclaje para mediar la interacción entre PEX14 (presente en la membrana del peroxisoma) y ATG9A (presente en la membrana del autofagosoma) para inducir el proceso de autofagia (**Figura 18D**) [307]. Por lo tanto, estamos ante un nuevo mecanismo independiente de PARilación y ubiquitinación que media la pexofagia. Recientemente, también se ha descubierto que MERIT40 puede interaccionar con tankirasa gracias a dos TBMs. Los niveles de PAR detectados en MERIT40 fueron demasiado bajos comparados con los del resto de sustratos PARilados y tampoco estos parecían afectar a su estabilidad. Por ello se concluyó que el complejo formado por MERIT40 y TNKS1/2 sirve de anclaje para controlar la maquinaria de respuesta de daño al ADN y la estructura y función del huso mitótico (**Tabla 3**) [320,324].

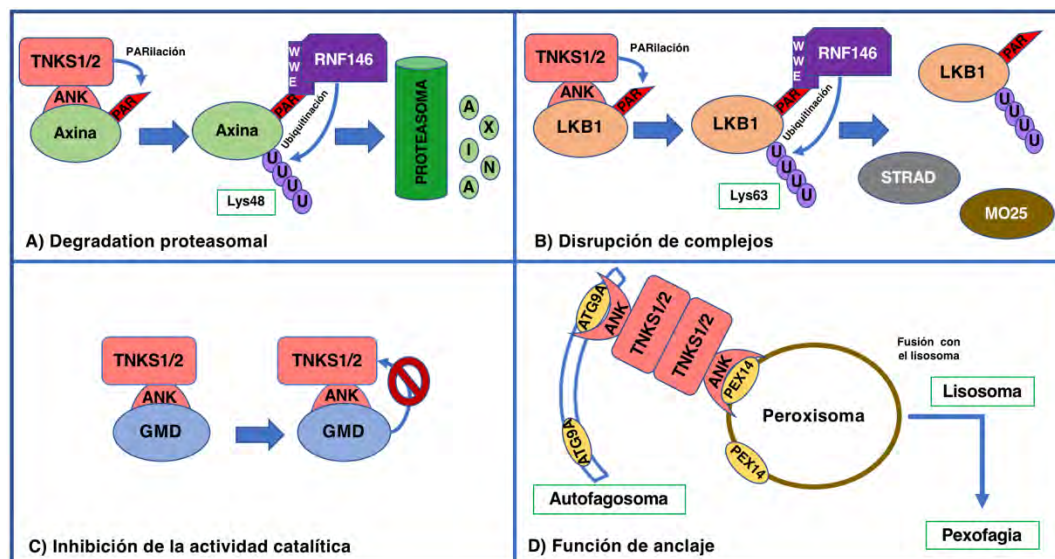


Figura 18. Mecanismos de acción de tankirasa. Imagen en la que se representan las distintas respuestas biológicas que se desencadenan tras la interacción de los diferentes sustratos con TNKS1/2: degradación de la proteína en el proteasoma (A), disrupción de complejos de proteínas (B), inhibición de la actividad catalítica de tankirasa (C) o función como proteína de anclaje para poner en contacto distintas proteínas (D).

Sustrato	PARilación	Respuesta biológica	TBM	Referencia
TRF1	Sí	Degradación proteasomal	RGCADG	[285,325]
3BP2	Sí	Degradación proteasomal	RSPPDG	[298]
RNF146	Sí	Degradación proteasomal	TBM ₁ : RESSADG TBM ₃ : RSHRGEG TBM ₄ : RSVAGG TBM ₅ : RSRRPDG	[310,326]
Axina 1	Sí	Degradación proteasomal	TBM ₁ : RPPVPG TBM ₂ : RRSDLDLGYEPG	[301]
PTEN	Sí	Degradación proteasomal	RYQEDG	[315]
LKB1	Sí	Disrupción de complejo	TBM ₁ : RAKLIG TBM ₂ : RRIPNG	[317]
Mcl-1	No	Inhibición catalítica	RPPPIG	[318]
GMD	No	Inhibición catalítica	RSGGDG	[285,319]
PEX14	No	Función de anclaje	TBM ₁ : RMEVQG TBM ₂ : RRGGDG	[307]
ATG9	No	Función de anclaje	RLPGLG	[307]
MERIT40	Sí	Función de anclaje	TBM ₁ : RSNPEG TBM ₂ : RSEGEG	[320,324]

Tabla 3. Los motivos de unión a tankirasa de los distintos sustratos de TNKS1/2. Tabla que recoge algunos de los sustratos más relevantes de tankirasa indicando la secuencia de los diferentes TBMs, así como la respuesta biológica que se desencadena tras la interacción con tankirasa.

1.4.3. El papel de las tankirasas en el desarrollo tumoral

Las tankirasas tienen tal cantidad y diversidad de sustratos, que su alteración (mutación y/o reducción o sobreexpresión) se ha relacionado con múltiples enfermedades entre las que se incluyen obesidad, diabetes, fibrosis, infecciones por Epstein Barr y Herpes simple, querubismo, esclerosis y cáncer [273,275,298,327–329]. En el caso del cáncer, se ha descrito que TNKS1 y/o TNKS2 se encuentran sobreexpresadas principalmente en cáncer de colon y pulmón, aunque también se han descrito casos en cáncer de mama, ovario, hígado y glioblastoma [317,330–336]. Existen múltiples rutas de señalización en las que tankirasa participa y son relevantes para la

INTRODUCCIÓN

generación y el desarrollo del cáncer como por ejemplo el mantenimiento de los telómeros, la mitosis, la reparación del ADN y las vías oncogénicas de Wnt, YAP y AKT:

- **Mantenimiento de los telómeros.** Tankirasa participa en la regulación de los telómeros a través de la regulación del factor TRF1. Este factor es conocido por bloquear el acceso de la telomerasa a los telómeros, pero cuando es PARilado por TNKS1/2, es liberado de la zona telomérica y posteriormente degradado en el proteasoma. La sobreexpresión de tankirasa en las células tumorales permite el mantenimiento de los telómeros por parte de la telomerasa, favoreciendo así la continua proliferación de dichas células [311].
- **Mitosis.** Se ha visto que TNKS1 interviene en la segregación de la zona telomérica de las cromátidas hermanas durante la mitosis. Existe un complejo formado por TRF1, TIN2 y SA1 que mantiene unida la zona telomérica de las cromátidas hermanas desde el momento en el que se produce la replicación hasta la segregación cromosómica en la mitosis. En dicho momento, TNKS1 actúa disgregando el complejo a través de la PARilación de TRF1, lo cual permite la correcta segregación de las cromátidas [337,338]. También se ha descrito que tankirasa puede PARilar a la proteína NuMA durante la mitosis con el fin de preservar la formación del huso mitótico y a las proteínas CPAP y Miki para que se produzca la correcta maduración de los centrosomas [339–341]. Así pues, en los casos en los que no haya TNKS1 o ésta se encuentre inhibida, se producirá una cohesión persistente de los telómeros junto con numerosos defectos en la formación del huso que dará lugar a problemas en la segregación de los cromosomas.
- **Reparación del ADN.** Recientemente se ha descubierto la implicación de TNKS1 en la respuesta frente al daño al ADN en los telómeros. De manera específica, cuando un daño oxidativo en el ADN causa una rotura de cadena simple en la zona telomérica, se produce el reclutamiento de TNKS1 a través de la interacción con TRF1. Entonces tankirasa PARila a TRF1, aunque en este caso no se produce la degradación del factor, sino que la cadena de polímero sirve de señal para reclutar proteínas implicadas en la reparación de rotura de cadena simple

como XRCC1 y Pol- β . Este fenómeno contribuye a la estabilidad de los telómeros y con ello a la supervivencia celular [342]. Asimismo, se ha visto que tankirasa juega un papel importante en el mecanismo de reparación de daños de doble cadena a través del anclaje a la proteína MERIT40, un regulador del proceso de recombinación homóloga. Se ha visto que este complejo puede ser la causa de la resistencia a la radioterapia en células tumorales de pulmón [320].

- **Rutas Wnt, YAP y AKT.** Tankirasa es capaz de regular múltiples rutas de señalización oncogénicas a través de distintos sustratos. Por ejemplo, TNKS1/2 son considerados reguladores positivos de la ruta Wnt/ β -catenina gracias a la regulación de la proteína axina 1, uno de los componentes del complejo de degradación de β -catenina. Axina 1 fue el sustrato con el que se describió por primera vez el mecanismo de PARdU llevado a cabo por tankirasa y RNF146, de manera que al degradarse axina 1, β -catenina permanece estable y puede promover un fenotipo tumoral a través de la transcripción dependiente de Wnt [312,313,343]. Otro sustrato de tankirasa, la proteína AMOT, es un regulador negativo de la oncoproteína YAP, efector clave en la ruta de señalización Hippo. Tankirasa y RNF146 median degradación de AMOT vía PARdU, lo cual sobreactiva la ruta Hippo en múltiples tipos de cáncer [344–346]. Por último, tankirasa también regula la estabilidad de PTEN, un importante supresor de tumores que actúa inhibiendo la ruta de PI3K/AKT. La sobreexpresión de tankirasa favorece la degradación de PTEN, lo que facilita la activación de la ruta y con ello la proliferación celular y el crecimiento tumoral [315].

1.4.4. El uso de los inhibidores de tankirasa como tratamiento frente al cáncer

La relevancia clínica de las tankirasas ha aumentado en los últimos años gracias al desarrollo de una gran batería de inhibidores catalíticos. El primer inhibidor de tankirasa, XAV939, fue desarrollado en 2009 por Huang G y colaboradores mientras investigaban cómo inhibir la ruta

INTRODUCCIÓN

Wnt/ β -catenina [347]. Esta ruta se ha visto alterada de manera significativa en varios tipos de cáncer (principalmente colon y pulmón), aunque actualmente no hay inhibidores aprobados por la FDA que bloqueen directamente su señalización. Los inhibidores de tankirasa se han desarrollado también como una alternativa para tratar el cáncer, aunque a día de hoy tampoco se ha aprobado su uso clínico. Estos inhibidores se caracterizan por reconocer el dominio catalítico, concretamente la zona donadora y pueden clasificarse de acuerdo al sitio al que se unan: al sitio nicotinamida (N), al sitio adenosina (A) o a ambos sitios (D) (**Tabla 4**) [272,348–351]. El sitio nicotinamida está altamente conservado entre los miembros de la familia PARP, mientras que el sitio adenosina es más específico de tankirasas. Este hecho permite que aquellos inhibidores que se unen al sitio adenosina presenten una mayor selectividad hacia TNKS [350,352]. De acuerdo a la literatura, el carcinoma de colon y pulmón son los principales modelos en los que se ha probado los inhibidores de tankirasa, aunque también se han empleado en menor medida modelos de cáncer de ovario, mama, cerebro, hígado y melanoma (**Tabla 4**).

Todos los inhibidores actuales de tankirasa son inhibidores catalíticos, pues van dirigidos al dominio PARP. Esto tiene como efecto la acumulación de multitud de sustratos, así como de las propias TNKS1/2 debido a que no se pueden autoPARilar para su degradación [306]. Recientemente se ha descrito una nueva función de tankirasa que es independiente a su función catalítica, por lo que la acumulación de TNKS1/2 tras el uso de los inhibidores catalíticos podría promover dicha función [294,307]. Por esta razón se han explorado diferentes maneras de desarrollar nuevos inhibidores de TNKS que vayan dirigidos al dominio ANK, responsable de la función de anclaje mediante el reconocimiento y la unión a los TBMs de los diferentes sustratos [353–358]. Entre las distintas aproximaciones destaca la estrategia que ha seguido el grupo liderado por la Profesora Laura Itzhaki (Universidad de Cambridge, UK), que consiste en el diseño de péptidos que puedan unirse a tankirasa basándose en el modelo de unión del TBM de la proteína 3BP2 al dominio ANK de TNKS2. Varios de los péptidos diseñados mostraron resultados positivos tanto *in vitro* como *in vivo* suprimiendo así la señalización de la ruta Wnt/ β -catenina

mediante el bloqueo de la interacción entre TNKS1/2 y axina [354]. Si bien es cierto que se necesita seguir profundizando, este tipo de aproximaciones suponen un nuevo enfoque sobre cómo inhibir las tankirasa y abre un nuevo camino para obtener inhibidores que sean eficaces para bloquear tanto la función catalítica como aquella que no depende del dominio PARP.

Inhibidor de TNKS	Diana	Tipo de cáncer	Referencia
XAV939	N	Ovario	[335]
		Mama	[334,359]
		Neuroblastoma	[360]
		Hepatocelular	[336,361]
IWR1	A	Pulmón	[332]
G007-LK	A	Colon	[362]
		Glioblastoma	[363]
		Hepatocelular	[361]
		Melanoma	[364]
OD36	A	Colon	[365]
OM-1700	A	Colon	[366]
K-756	A	Colon	[350]
AZ1366	N	Pulmón	[367]
TNKS656	D	Pulmón	[368]
		Hepatocelular	[369]
RK-582	N	Colon	[370]
LZZ-02	N	Colon	[352]

Tabla 4. Inhibidores catalíticos de tankirasa en cáncer. Tabla que recoge algunos de los inhibidores catalíticos más relevantes de tankirasa indicando la zona del dominio aceptor a la que se unen, así como el modelo tumoral en el que se ha estudiado. N: nicotinamida; A: adenosina; D: doble unión.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El estudio de las rutas de señalización y los procesos biológicos que subyacen el desarrollo primario del cáncer y la metástasis, así como la búsqueda de nuevos tratamientos eficaces para combatirlos, constituyen un desafío continuo para la ciencia. En el caso de los tumores sólidos, la presencia de zonas sometidas a hipoxia es uno de los factores que incrementa la malignización del tumor, así como la resistencia a tratamientos de quimioterapia y radioterapia. Otro de los procesos que destacan es el fenómeno de neovascularización tumoral ya que, ante la falta de oxígeno y nutrientes, las células tumorales son capaces de desarrollar múltiples mecanismos para cumplir con la alta demanda metabólica. Entre los procesos de vascularización, el mimetismo vasculogénico es uno sobre los que menos información se tiene al respecto. Es por ello por lo que esta tesis doctoral tiene dos objetivos generales, los cuales a su vez se desglosan en múltiples objetivos específicos.

El **primer objetivo general** del presente trabajo consiste en caracterizar el papel que TNKS1 y TNKS2 tienen en la adaptación de las células tumorales a la hipoxia. Para alcanzar dicho objetivo se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudio *in silico* para analizar de manera global el papel de TNKS1 y TNKS2 en cáncer.
2. Evaluar el papel de ambas tankirasas en conjunto, así como también la contribución de cada una de ellas a la estabilidad y en la actividad transcripcional del factor HIF-1 α .
3. En el caso de que exista una relación, estudiar el mecanismo por el que se relacionan las tankirasas y HIF-1 α en el contexto de la respuesta a la hipoxia.

El **segundo objetivo general** se centra en determinar si TNKS1 y TNKS2 juegan un papel en el proceso de mimetismo vasculogénico mediado por la proteína VE-cadherina, para lo que se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar la relación entre VE-cadherina y ambas tankirasas, así como su papel en el mimetismo vasculogénico.
2. En el caso de que exista una relación, estudiar el mecanismo por el cual las tankirasas participan en el proceso de mimetismo vasculogénico mediado por VE-cadherina.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo de células

3.1.1. Líneas celulares humanas

Para la realización de esta tesis doctoral se han utilizado las siguientes líneas celulares inmortalizadas humanas:

HeLa: Línea celular de adenocarcinoma de cérvix proporcionada por la Dra. M. Carmen Ruiz (Universidad de Granada, Granada). Para su mantenimiento se ha empleado medio DMEM bajo en glucosa (1 g/L) (Gibco, Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino inactivado (FBSi) al 10% (Gibco, Invitrogen), L-glutamina al 2% (Gibco, Invitrogen), aminoácidos no esenciales al 1% (Gibco, Invitrogen) y penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco, Invitrogen).

HeLa *knockout* y *knockdown* para TNKS1: Línea *knockout* (KO) y *knockdown* (KD) para el gen de *TNKS* generada en este trabajo (apartado 3.14) mediante la técnica de CRISPR-Cas9. La secuencia de ARN guía utilizada para la edición génica está dirigida contra el exón 1 del gen *TNKS*. Ambas líneas celulares fueron mantenidas en cultivo bajo condiciones controladas y en el mismo tipo de medio que la línea de la que proceden.

MUM2B: Línea de melanoma uveal metastásico, aislada de hígado de pacientes. Esta línea celular presenta alta capacidad para realizar mimetismo vasculogénico y fue proporcionada por el Dr. Juan Carlos Rodríguez Manzanque (Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica, Granada). Para su mantenimiento se ha empleado medio RPMi 1640 (Gibco, Invitrogen) suplementado con FBSi al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%.

MUM2C: Línea de melanoma uveal humano aislada de un paciente con metástasis en el hígado. Esta línea presenta el mismo origen que la línea MUM2B, aunque carece de la capacidad de realizar mimetismo vasculogénico. Fue proporcionada por el Dr. Juan Carlos Rodríguez

MATERIALES Y MÉTODOS

Manzaneque y para su mantenimiento se ha utilizado medio RPMi 1640 suplementado con FBSi al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%.

LN229: Línea celular de glioblastoma multiforme proporcionada por el Dr. Joan Seoane (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona). Para su mantenimiento se ha empleado medio DMEM alto en glucosa (4.5 g/L) (Gibco, Invitrogen) suplementado con FBSi al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%.

U87MG: Línea celular de glioblastoma multiforme adquirida de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Cat. 89081402) a través del Servicio de Líneas Celulares de la Universidad de Granada. Para su mantenimiento se ha empleado medio DMEM alto en glucosa (4.5 g/L) suplementado con FBSi al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%.

HEK-293T: Línea celular embrionaria de riñón proporcionada por el Dr. Carlés Suñé (IPBLN, Granada). Para su mantenimiento se usó medio DMEM bajo en glucosa (1 g/L) suplementado con FBSi al 10%, L-glutamina al 2%, aminoácidos no esenciales al 1% y penicilina/estreptomicina al 1%. Esta línea se empleó como célula empaquetadora para obtener partículas lentivirales tal y como se describirá en apartados posteriores de esta sección (apartado 3.14).

Todas las líneas celulares empleadas en esta tesis doctoral han sido mantenidas en condiciones de cultivo de 37 °C y una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Para su expansión, se realizaron las diluciones pertinente de cada cultivo (pase 1:4; 1:5 o 1:6) de manera periódica mediante el lavado con PBS 1X, la adición de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco, Invitrogen), su posterior neutralización con medio de cultivo y centrifugación (1.500 rpm durante 5 minutos) para finalmente obtener una nueva placa. Todas las líneas celulares fueron analizadas periódicamente mediante PCR para descartar la presencia de micoplasma, usando los siguientes *primers* (Sigma-Aldrich): Sentido: 5'-GATGTCAAGAGTGGGTAAGGTT-3'; Antisentido: 5'-GATGTTTAGCCGGGTCGAGAG-3'.

3.1.2. Bacterias

En este trabajo se han utilizado las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y STBL3 para la transformación y obtención de los plásmidos que se han empleado en los siguientes apartados (apartado 3.5). Las bacterias se han cultivado en placas con medio LB-agar con ampicilina y para su expansión se ha utilizado medio LB líquido suplementado con ampicilina. Ambos medios han sido adquiridos en el Servicio de Lavado y Esterilización del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. Las bacterias fueron almacenadas para su crecimiento en una cámara a 37 °C.

3.2. Congelación y descongelación de células

Para la congelación de células se llevó a cabo su mantenimiento habitual con la particularidad de que finalmente fueron resuspendidas en medio de congelación (70% de medio de cultivo, 20% de FBSi y 10% de DMSO) y almacenadas en criotubos. Los criotubos se almacenaron durante dos semanas a -80 °C y finalmente se guardaron en nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo. Para el proceso de descongelación se introdujeron los criotubos en un baño a 37 °C. Posteriormente se transfirió su contenido a un tubo con medio y se centrifugó para poder retirar el medio de congelación. Finalmente, el *pellet* celular fue resuspendido en medio de cultivo nuevo y se transfirió a una placa de cultivos.

3.3. Inducción de Hipoxia

La condición de hipoxia fue inducida en una cámara modelo *In vivo*O₂ 400 (Ruskin, UK) con una atmósfera de 1% O₂, 5% CO₂, 37 °C y 60% de humedad relativa durante al menos 4 horas, a menos que se indique otro tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.4. Inhibidores químicos

Los inhibidores químicos que se han empleado para este trabajo se encuentran resumidos en la siguiente tabla. Como control negativo se ha empleado DMSO (VWR) o agua, según el disolvente utilizado para cada inhibidor.

Inhibidor	Diana	Concentración y tiempo	Dilución	Compañía
Actinomicina-D	ADN	5 µg/mL durante 4, 8 y 24 horas	Agua	Sigma-Aldrich
Cloroquina	Autofagolisosoma	50 µM durante 4 horas	Agua	Sigma-Aldrich
Cicloheximida	Ribosoma 60S	100 µg/ mL durante 10 minutos	DMSO	Sigma-Aldrich
G007-LK	TNKS1/2	0,5; 1 y 5 µM durante 24 horas	DMSO	Calbiochem
MG132	Proteasoma	20 µM durante 8 horas	Agua	Sigma-Aldrich
XAV939	TNKS1/2	1; 2,5 y 10 µM durante 24 horas	DMSO	AdooQ Bioscience

Tabla 5. Inhibidores químicos e información sobre su uso.

3.5. Transformación de bacterias y aislamiento de plásmidos

La transformación de las bacterias competentes se llevó a cabo añadiendo una muestra del plásmido y produciendo un choque térmico. El choque térmico se produjo dejando las bacterias en hielo durante 30 minutos, 1 minuto a 42 °C y nuevamente en hielo durante 3 minutos. Una vez realizada la transformación se añadió 1 mL de medio SOC y se incubaron durante 45-60 minutos a 37 °C en agitación suave para que se recuperaran del choque térmico. Una vez recuperadas se sembraron distintas cantidades en placas de LB-agar para poder obtener colonias aisladas. Las colonias seleccionadas se añadieron a un tubo con 2-3 mL de medio LB para obtener un precultivo. Al cabo de unas 4-6 horas se vertió el contenido del tubo en un matraz *Erlenmeyer* con 250 mL de medio LB para obtener un cultivo. Tras obtener el cultivo se aisló el plásmido mediante un *kit* de *Maxiprep* (Qiagen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Una vez obtenido el plásmido,

medimos la concentración en el *NanoDrop* (Thermo Nanodrop 1000). Antes de realizar la *maxiprep* se obtuvo una parte del cultivo para almacenarlo en glicerol y así tener un stock de la bacteria transformada con el plásmido de interés. Asimismo, una vez obtenido el plásmido se mandó a secuenciar al servicio de genómica del IPBLN para verificar la presencia del mismo.

Los plásmidos que se han utilizado en este estudio son los siguientes:

Nombre	Inserto	Resistencia	Referencia	Uso
pcDNA3.1-CTPR6	CTPR6	Ampicilina	[354]	Vector de expresión
pcDNA3.1-3RL-CTPR6	3RL-CTPR6	Ampicilina	[354]	Vector de expresión
pcDNA3.1-3TBP-CTPR6	3TBP-CTPR6	Ampicilina	[354]	Expresión de péptido de unión a tankirasa
pL-CRISPR.EFS.GFP	TNKS1sg	Ampicilina	#57818, Addgene	Expresión ARNg frente a TNKS1
pMD2.G	VSV-G	Ampicilina	#12259, Addgene	Expresión de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular
p8.91 delta	Gag/Pol/Rev/Tat	Ampicilina	#187441, Addgene	Expresión de genes necesarios para la formación de partículas lentivirales

Tabla 6. Lista de plásmidos y vectores.

3.6. Transfección transitoria de líneas celulares

La transfección transitoria de las líneas celulares se realizó con el *Kit* de transfección *jetPRIME* (Polyplus transfection) siguiendo las indicaciones del protocolo proporcionado por la casa comercial para llevar a cabo la transfección de un *siRNA* o de plásmidos. En ambos casos se preparó una mezcla de 200 μ L (placas 6-pocillos y 60 mm) o 500 μ L (placas 100 mm) del *buffer* de transfección, la cantidad de *siRNA* o plásmido necesaria y el doble de volumen de reactivo

MATERIALES Y MÉTODOS

jetPRIME. La mezcla se agitó de manera suave y se dejó incubar durante 10-15 minutos para finalmente añadirla gota a gota sobre cada condición a la que previamente se le había añadido medio fresco.

3.6.1. Silenciamiento génico transitorio mediante *siRNA*

El silenciamiento del gen de interés se llevó a cabo mediante la transfección con un ARN pequeño de interferencia (*siRNA*). Para ello se sembraron las células en placas de 6 pocillos (100-150.000 células aproximadamente) o placas de 60 mm (150-200.000 células aproximadamente) 24 horas antes para que el día de la transfección las células tuvieran una confluencia aproximadamente del 50%. Para la transfección se preparó una mezcla siguiendo el protocolo de la casa comercial para transfectar el *siRNA* a una concentración de 40-60 nM. Pasadas 24 horas se cambió el medio y se volvió a incubar nuevamente 24 horas hasta su recogida (extracción de proteína o ARN). Los *siRNAs* empleados en este trabajo se recogen en la siguiente tabla (Sigma-Aldrich):

Gen	Secuencia sentido (5' → 3')	Secuencia antisentido (5' → 3')
<i>β-catenina</i>	CAGGGGGUUGUGGUUAAGCUCUU	AAGAGCUUAACCACAACCCCCUG
<i>RNF146</i>	GCACGUUUUCUGCUAUCUA	UAGAUAGCAGAAAACGUGC
<i>Scrambled</i> (Control)	CUUUGGGUGAUCUACGUUA	UAACGUAGAUCACCCAAAG
<i>TNKS 1.1</i>	GCAUGGAGCUUGUGUUAUUUU	AAAUUAACACAAGCUCCAUGC
<i>TNKS 1.2</i>	CUAGAUGUGUUGGCUGAUA	UAUCAGCCAACACAUCUAG
<i>TNKS2 1.1</i>	GAGGGUAUCUCAUUAGGUA	UACCUA AUGAGAUACCCUC
<i>TNKS2 1.2</i>	GGAACAUAAGUAGGAUGUACAU	AUGUAACAUCUACUUAUGUUC
<i>TWIST1</i>	AAGCUGAGCAAGAUUCAGACC	GGUCUGAAUCUUGCUCAGCUU

Tabla 7. Lista de las secuencias de *siRNAs* empleados.

3.6.2. Transfección transitoria de ADN plasmídico

Para la transfección de plásmidos se sembraron alrededor de 150-200.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos 24 horas antes de realizar la transfección, de manera que las células alcanzasen una confluencia del 60-80%. Para la transfección se preparó una mezcla siguiendo las indicaciones del fabricante para transfectar entre 0.5-2 µg del plásmido de interés. Pasadas 4 horas se renovó el medio de cultivo y se dejó incubar nuevamente durante 24 horas para finalmente llevar a cabo la extracción de proteínas.

3.7. Western blot

La extracción de proteínas para su posterior análisis se llevó a cabo generalmente con el *buffer* de extracción TR3 (excepto para la inmunoprecipitación y el subfraccionamiento celular). Para ello se lavaron las células con PBS 1X, se añadió una cantidad de TR3 (Na₂HPO₄ 10 mM; SDS 3%, glicerol 10%) dependiendo del tamaño de la placa y se recogió la muestra con un raspador (Sarstedt). La muestra obtenida se sonicó durante 10-20 segundos para así completar el proceso de lisis celular. Una vez obtenido el lisado, se cuantificó la cantidad total de proteína siguiendo el método de *Lowry* [371] con el *kit DC protein assay* (BioRad) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Las muestras se prepararon tomando unos 30-40 µg de proteína, añadiendo *buffer* de desnaturalización *Laemmli 6X* (Tris-HCl 250 mM pH 7,5; SDS 10%, glicerol 20%, β-mercapetoetanol 1,4 M y azul de bromofenol 1%) y equilibrando con *buffer* TR3 para tener en todas las muestras el mismo volumen. Posteriormente se desnaturalizaron las proteínas incubando las muestras a 95 °C durante 5 minutos y se llevó a cabo su separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5 o 12% (según el peso molecular de las proteínas de interés) en condiciones desnaturalizantes (*SDS-PAGE*). Tras separar las proteínas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Pall Corporation) mediante transferencia húmeda durante 90 minutos. Una vez obtenida la membrana se incubó en PBS 1X- *Tween* 20 al 1% con leche desnatada en polvo al 5% durante 1 hora en agitación suave para evitar las uniones inespecíficas y posteriormente se incubó

MATERIALES Y MÉTODOS

con el anticuerpo primario a 4 °C en agitación suave hasta el día siguiente. Entonces se realizaron dos lavados de 15 minutos en agitación con PBS 1X- Tween 20 al 1%, se incubó con el anticuerpo secundario que está unido a la peroxidasa de rábano (Dako) durante 90 minutos y se volvieron a realizar dos lavados de 15 minutos. Finalmente se visualizaron las proteínas por quimioluminiscencia usando los líquidos de detección ECL (GE Healthcare) e immobilon (Milipore) y exponiendo las membranas a películas autorradiográficas (Agfa). Los resultados obtenidos para cada proteína se cuantificaron y normalizaron respecto a la cantidad de α -tubulina de la misma muestra.

Los anticuerpos primarios empleados en este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Dilución	Anticuerpo secundario	Referencia
α -tubulina	1:10.000	Ratón (1:10.000)	T5168, Sigma
β -catenina	1:1.000	Ratón (1:10.000)	E-5, Santa Cruz
β -catenina activa	1:1.000	Conejo (1:5.000)	Cell Signaling
Axina 1	1:1.000	Conejo (1:5.000)	Cell Signaling
BNIP3	1:2.000	Conejo (1:10.000)	BD Pharmigen
CA9	1:2.000	Conejo (1:10.000)	Novus
HA	1:1.000	Conejo (1:2.000)	M9035, Sigma-Aldrich
HIF-1 α	1:4.000	Conejo (1:10.000)	NB100-479, Novus
HK2	1:2.000	Ratón (1:10.000)	B-8, Santa Cruz
Laminina β 1	1:1.000	Conejo (1:10.000)	Abcam
PARP-1	1:10.000	Ratón (1:10.000)	Enzo
PFKFB4	1:2.000	Conejo (1:5.000)	GeneTex
PFKP	1:2.000	Ratón (1:10.000)	F-7, Santa Cruz
RNF146	1:1.000	Ratón (1:2.500)	Sigma-Aldrich
TNKS1/2	1:2.000	Ratón (1:5.000)	E-10, Santa Cruz
VE-cadherina	1:500	Ratón (1:5.000)	F-8, Santa Cruz
VE-cadherina (Y658)	1:1.000	Conejo (1:5.000)	Thermofisher

Tabla 8. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en *western blot*.

3.8. Niveles de expresión génica mediante RT-qPCR

La determinación de los niveles de expresión de los genes de interés se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Primero se extrajo el ARN con el *kit RNeasy Plus Mini* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante para obtener ARN sin contaminación de ADN genómico. Para ello se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células 2 veces con PBS 1X. A continuación, se añadió el *buffer* de lisis (RLT con β -mercaptoetanol) y se recogieron las muestras con un raspador a un tubo libre de ARNasas. Se pasó el lisado varias veces por una jeringa para romper el ADN genómico y se añadió el contenido a la primera columna (columna morada) para eliminar el ADN genómico. Tras centrifugar 30 segundos a 10.000 rpm nos quedamos con el sobrenadante, sobre el que añadimos etanol al 70%. Posteriormente pasamos la mezcla a la segunda columna (columna rosa) y centrifugamos 1 minuto a 10.000 rpm. Añadimos el *buffer* de lavado RW1 sobre los bordes de la columna y centrifugamos 1 minuto a 10.000 rpm. Luego añadimos el *buffer* de lavado RPE sobre la columna y volvimos a centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm (este paso se realizó dos veces). Finalmente, transferimos la columna a un tubo nuevo y añadimos agua para eluir el ARN.

Una vez obtenido el ARN, se cuantificaron las muestras en el *nanodrop* y se realizó la retrotranscripción de 1 μ g de ARN a ADNc con el *kit* de retrotranscripción *iScript Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad) de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial en un termociclador (Bio-Rad). Para ello por cada muestra mezclamos el volumen correspondiente a 1 μ g de ARN junto con 4 μ L de *Supermix* y el volumen de agua necesario hasta completar 20 μ L.

Tras obtener el ADNc se preparó una mezcla para cada gen con la polimesasa *iTaq Universal SYBR green supermix* (Bio-Rad), los *primers* para el gen de interés (que estaban preparados a 10 μ M) y agua, teniendo en cuenta para el volumen final el número de muestras y el control (todo ello por triplicado). Por último, se añadió el ADNc de cada condición al pocillo con la mezcla que se había preparado previamente y se llevó a cabo la RT-qPCR en un termociclador CFX96 (Bio-Rad) con una

MATERIALES Y MÉTODOS

temperatura de alineamiento de 60 °C para todos los *primers*. Los resultados de cada gen se obtuvieron teniendo como normalizador el gen *36B4* o *18S* y se representaron mediante el método de *fold change* respecto a la condición control. Los *primers* utilizados en este estudio se detallan en la siguiente tabla:

Gen	Secuencia sentido (5' → 3')	Secuencia antisentido (5' → 3')
18S	CTACCACATCCAAGGAAGCA	TTTTTCGTCACTACCTCCCCG
36B4	CAGATTGGCTACCCAAGTGT	GGCCAGGACTCGTTTGTACC
BNIP3	GTCTGGACGGAGTAGC	GGCCGACTTGACCAAT
CA9	TAAGCAGCTCCACACCCTCT	TTCATCTGCACAAGGAACG
COPS5	GATCGGGAGGCAACTTGAAG	TGCGGATATTGTTCTTGTGGA
DDIT4	GACAGCAGCAACAGTGGCTTC	CCACGCTATGGCAGCTCTTGC
HIF-1α	CTGCAACATGGAAGGTATTGCA	TACCCACACTGAGGTTGGTTACTG
HK2	TCACGGAGCTCAACCATGAC	CCCAAAGCACACGGAAGTTG
MAP3K1	CCACAGAGAACAGTTCCCCT	CCATTGGCTTTGGTTGCTCT
PDK1	CTGTGATACGGATCAGAAACCG	TCCACCAAACAATAAAGAGTGCT
PFKFB3	ATCTACCTGAACGTGGAGTCCGCTG	TCAGTGTTTCCTGGAGGAGTCAGC
PFKFB4	TTAATTTTGAGAACAGAATGGC	CGTAGCCTCATCACTGTCGC
PFKP	CGGAAGTTCCTGGAGCACCTCTC	AAGTACACCTTGGCCCCACGTA
SLC16A3	TGTGTGCGTGAACCGCTTT	AAACCCAACCCCGTGATGAC
TNKS	ATGCCCCCAGAGGCCTTAC	GGTGGATGCTGGTGAGATCA
TNKS2	ATCTGCTCTGCCCTCTTGTTACAA	GCTAAAATCTACTCTGGAACCTC
TWIST1	GCAGGACGTGTCCAGCTC	CTGGCTCTTCTCGCTGTT
TXNIP	ACTCGTGTCAAAGCCGTTAGG	TCCCTGCATCCAAAGCACTT

Tabla 9. Lista de oligonucleótidos utilizados como cebadores para RT-qPCR.

3.9.Array de la ruta de señalización de respuesta a hipoxia

Para estudiar la vía de señalización de respuesta a la hipoxia utilizamos un *Array* que incluía una batería de genes que forman parte de la ruta, incluyendo HIF-1α, HIF-3α, PHDs y otros genes inducidos por la familia HIF. Para ello se sembraron 200.000 células en una placa de 60 mm 24 horas previas a la transfección. Entonces se llevó a cabo el silenciamiento génico de ambas tankirasas (apartado 3.6.1) para finalmente someterlas a 4 horas de normoxia o hipoxia (apartado

3.3). Posteriormente se llevó a cabo la extracción de ARN con el *kit* de extracción de ARN *RNeasy Mini* siguiendo las instrucciones del fabricante y se midió la cantidad de ARN extraído, así como la calidad en el *nanodrop*. Una vez cuantificado se usaron 2 µg de ARN por condición para llevar a cabo la retrotranscripción con el *kit* *RT² First Strand* (Qiagen) que también contiene un paso para eliminar el ADN genómico, de acuerdo al protocolo proporcionado por la casa comercial. Para la eliminación del ADN genómico se mezclaron 2 µL de *buffer* GE con el volumen necesario para tener 2 µg de ARN y se completó con agua hasta un volumen final de 10 µL. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 42 °C y luego se dejó durante 1 minuto en hielo. Para realizar la retrotranscripción se añadió a la mezcla que ya teníamos el *buffer* BC3, el control P2 y la retrotranscriptasa. La nueva mezcla se incubó durante 15 minutos a 42 °C y luego durante 5 minutos a 95 °C para inactivar la reacción.

El ADNc obtenido se usó para llevar a cabo el *array* de hipoxia *Hypoxia Signaling RT² Profiler PCR Array* (PAHS-032Z-2, Qiagen) junto con la polimerasa *RT² SYBR Green qPCR Mastermix* (Qiagen) según las indicaciones del protocolo que contenía el *kit* en un termociclador CFX96. Los resultados obtenidos, así como la calidad del experimento se analizaron en la página web de *Qiagen*. Para normalizar los resultados se utilizaron los genes *36B4* y *β2M* y se seleccionaron aquellos genes que habían modificado su expresión 1,8 veces al comparar con la condición control.

3.10. Ensayo de inmunoprecipitación

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación de proteínas se sembraron 350.000 células aproximadamente en placas de 100 mm y una vez pasadas 24 horas se realizó el tratamiento pertinente (inhibición, hipoxia...) o directamente se recogieron. Para ello, se lavaron las células con PBS 1X y posteriormente se volvió a añadir PBS 1X para recoger la muestra con un raspador. Las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min a 4 °C y posteriormente se eliminó el sobrenadante. Para extraer las proteínas se incubaron las muestras con un *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8; NaCl 120 mM; NP-40 0,1%; EDTA 1 mM; NaF 10 mM; Na₃VO₄ 1 mM) suplementado

MATERIALES Y MÉTODOS

con inhibidores de proteasas (Roche) durante 10-15 minutos en hielo. Tras obtener el lisado se cuantificó la cantidad de proteína según el método de *Lowry* y se añadieron 20 μ L de bolas magnéticas *Dynabeads* para inmunoprecipitación (ThermoFischer), incubándose durante 30 minutos en rotación a 4 °C para eliminar las uniones inespecíficas. Posteriormente se retiraron las bolas magnéticas con ayuda de un soporte magnetizado (Milipore) y se tomó la misma cantidad de proteína para cada condición de la inmunoprecipitación (IP), guardándose el resto de la muestra como *input*. La muestra elegida como IP se incubó con 2 μ g de anticuerpo/mg de proteína hasta el día siguiente en rotación a 4 °C: HIF-1 α (NB100-479, Novus); TNKS1/2 (E-10, Santa Cruz); VE-cadherina (F-8, Santa Cruz) e IgG (Sigma). Al día siguiente se añadieron 50 μ L de bolas magnéticas *Dynabeads* a cada muestra y se incubaron durante 2-3 horas en rotación a 4 °C. una vez terminada la incubación, se realizaron 3 lavados con el *buffer* de lisis y se llevó a cabo la desnaturalización de las proteínas añadiendo 50-60 μ L de *buffer Laemmli* 2X e incubando en agitación (1.200 rpm) durante 10 minutos a 95 °C. Finalmente se retiraron las bolas magnéticas de las muestras con ayuda de un soporte magnetizado y se almacenaron a -20 °C.

3.11. Subfraccionamiento celular

Las condiciones de siembra y recogida de las células para obtener las distintas fracciones subcelulares fueron exactamente iguales que para la inmunoprecipitación. Una vez obtenido el *pellet* celular se incubó con el primer *buffer* de lisis (Sacarosa 250 mM; Tris-HCl 50 mM pH7,4; MgCl₂ 5 mM; Na₃VO₄ 1 mM; y NP-40 0,25%) suplementado con inhibidores de proteasas durante 10 minutos en hielo. Tras la incubación las muestras se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos a 4 °C, recogiendo el sobrenadante y guardándolo a -20 °C como fracción citoplasmática. El *pellet* que quedó se incubó con el segundo *buffer* de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 0,4 M; glicerol 15% y Tritón X-100 1,5%) durante 45 minutos en agitación a 4 °C. Tras la incubación las muestras se centrifugaron a 5.000 g durante 5 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante y se guardó a -20 °C como fracción nuclear.

3.12. Ensayo de lactato extracelular

Los niveles de lactato del medio extracelular se midieron mediante ensayo colorimétrico con el *kit* de colorimetría/fluorimetría para detectar L-Lactato (ab65330, Abcam). Para ello se sembraron 100.000 células aproximadamente en placas de 6 pocillos y tras 24 horas se realizó el doble silenciamiento de TNKS1/2 (apartado 3.6.1). El medio se renovó pasadas 48 horas desde la transfección y las células se sometieron a 24 horas de normoxia o hipoxia al 1% O₂. Entonces se recogió el medio de cada muestra y también se extrajo proteína con el buffer TR3 y se cuantificó siguiendo el método de *Lorwry*. Los niveles de lactato presentes en el medio extracelular se midieron siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras recoger el medio, las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C para eliminar los restos celulares y se almacenaron a -80 °C para inactivar la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Posteriormente se tomaron 0,5 µL de medio de cada muestra y se mezcló con el *buffer* del *kit* hasta tener un volumen de 50 µL por condición. Por cada condición también se prepararon 50 µL de mezcla de reactivos (46 µL de *buffer*, 2 µL de enzima y 2 µL de sonda). Las muestras se añadieron en una placa de 96 pocillos por duplicado y se incubaron junto con la mezcla de reactivos a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 30 minutos. Se generó una recta patrón con concentraciones conocidas de lactato (2, 4, 8 y 10 nMol). Finalmente, el cambio de color fue analizado en un lector de placas (VersaMax) a una longitud de onda de 570 nm. La concentración de lactato se calculó con ayuda de la recta patrón y la siguiente fórmula:

$$C \left(\frac{nMol}{\mu L} \right) = \frac{\text{cantidad de lactato en nMol}}{\text{Volumen usado en } \mu L}$$

Tras obtener la concentración de lactato, se normalizó de acuerdo a la cantidad de proteína total de cada condición y se expresó en porcentaje, siendo el 100% la condición de hipoxia control.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.13. Ensayo de ligación por proximidad

El ensayo de ligación por proximidad para detectar la posible interacción entre las proteínas HIF-1 α y TNKS1/2 se llevó a cabo con el *kit* de detección *in situ* DuoLink (DUO92008, Sigma-Aldrich). Para realizar esta técnica se sembraron 100.000 células sobre cristales de 12 mm de diámetro situados en placas de 6 pocillos. Tras 48 horas las células fueron sometidas a normoxia o hipoxia al 1% de O₂ las 4 últimas horas y posteriormente se fijaron con una solución de paraformaldehído 4% y sacarosa 2% en PBS 1X durante 15 minutos y se permeabilizaron con una solución de Tritón X-100 0,5% en PBS 1X durante 10 minutos (con sus respectivos lavados con PBS 1X tras ambos procesos).

Para poder estudiar la interacción se siguió el protocolo de la casa comercial para detectar interacciones entre proteínas que están a una distancia inferior a 40 nm. Primero incubamos las muestras con la solución de bloqueo durante 1 hora a 37 °C en condiciones de humedad. Luego incubamos las muestras con el anticuerpo primario diluido en la solución diluyente hasta el día siguiente a 4 °C. En este estudio se emplearon los anticuerpos frente a HIF-1 α (Novus, conejo, 1:500) y TNKS1/2 (Santa Cruz, ratón, 1:50). Al día siguiente se realizaron 3 lavados con el *buffer* de lavado A 1X y se añadieron las sondas Plus (conejo) y Minus (ratón) para reconocer los anticuerpos primarios. Las muestras se incubaron con las sondas durante 1 hora a 37 °C en condiciones de humedad y posteriormente se volvieron a realizar 3 lavados con el *buffer* de lavado A 1X. A continuación, se llevó a cabo la incubación de las muestras con la enzima ligasa durante 45 minutos a 37 °C en condiciones de humedad. Luego se volvieron a realizar 3 lavados con el *buffer* de lavado A 1X y se añadió la enzima polimerasa durante 100 minutos a 37 °C en condiciones de humedad y protegido de la luz. Finalmente se realizaron 2 lavados con el *buffer* de lavado B 1X y 1 lavado con el mismo *buffer*, pero a una concentración 0,01X. Tras ello dejamos secar los cristales al aire en oscuridad y realizamos el montaje con el medio que contiene DAPI.

Una vez preparadas las muestras se procedió a la obtención de un *stack* de imágenes en el eje axial utilizando para ello el microscopio confocal de barrido SP5 (Leica) con el objetivo de 63X (apertura numérica 1,45). Se obtuvieron imágenes siguiendo el modo de trabajo secuencial siendo la líneas de excitación las siguientes: diodo 405 nm y láser de *Hene* 561 nm. Posteriormente las imágenes se visualizaron como una proyección máxima y se analizaron en el programa *ImageJ* versión 1.52 (National Institutes of Health), en el que cada posible interacción entre HIF-1 α y TNKS1/2 se visualiza como un punto de fluorescencia. Los resultados se obtuvieron cuantificando los puntos por célula de 100 células por condición y representando la media de 3 réplicas independientes. Como controles negativos se usaron muestras a las que se les añadió sólo uno de los anticuerpos primarios y sólo una de las dos sondas. Como control positivo se visualizó la interacción entre HIF-1 α y p300 (Sigma, ratón, 1:400)

3.14. Generación de líneas *knockout* y *knockdown*

Las líneas HeLa *knockout* y *knockdown* para TNKS1 se obtuvieron mediante la técnica de *CRISPR/Cas9*. Para ello se empleó un ARN guía (ARNg) de 20 pares de bases (5'-CGATCCCCGGACCCGGTTGA-3') dirigido contra el primer exón del gen de *TNKS* [306]. Dicha guía se insertó en el vector lentiviral *pL-CRISPR-EFS.GFP* mediante la fosforilación de las guías y la ligación de la guía con el plásmido. Este vector contiene los elementos necesarios para la replicación, transcripción y traducción del plásmido, junto con el promotor y el gen de la nucleasa Cas9, un gen de resistencia a ampicilina y el gen de la proteína *GFP* (Figura 19).

La fosforilación de las secuencias guías se llevó a cabo incubando ambas guías (sentido y antisentido) con la enzima PNK T4, una polinucleotido quinasa que transfiere los grupos fosfatos a la guía. La mezcla fue sometida a 37 °C durante 45 minutos, luego a 95 °C durante 150 segundos y posteriormente se programó para que la temperatura bajase de manera gradual 0,1 °C hasta alcanzar 22 °C. Para la ligación de la guía con el vector se incubaron ambos elementos con la enzima ADN ligasa T4 y se sometió la mezcla a una rampa creciente de temperatura desde los 4

MATERIALES Y MÉTODOS

°C hasta los 22 °C para así asegurarnos de que alcanzase la temperatura óptima para que se produjera la ligación. Una vez obtenido el plásmido con la guía se llevó a cabo su transformación y expansión usando bacterias competentes (apartado 3.5).

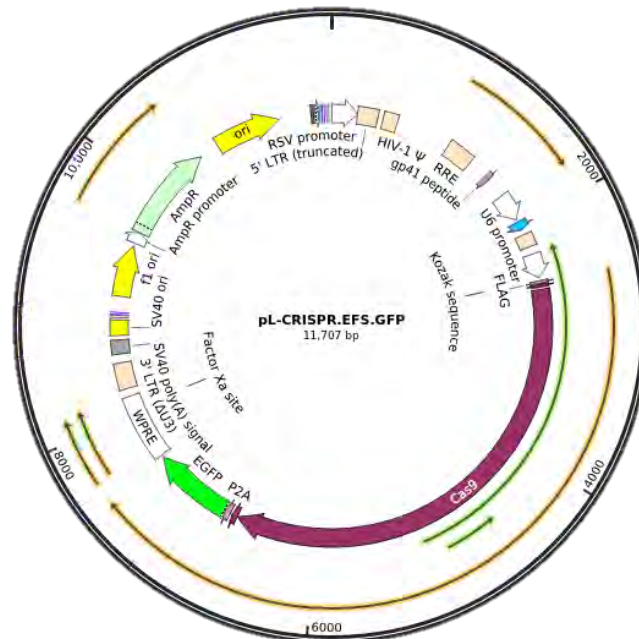


Figura 19. Estructura del plásmido pL-CRISPR.EFS.GFP. El plásmido contiene la maquinaria necesaria para realizar la edición génica mediante la tecnología de CRISPR-Cas9 y además expresa la proteína *GFP*, para la posterior selección de aquellas células que hayan incorporado el vector. Imagen adaptada de Addgene (#57818).

Tras obtener el plásmido de interés se procedió a la generación de las partículas lentivirales mediante el protocolo proporcionado por el laboratorio del Dr. Paco Martín. Para ello empleamos la línea celular HEK-293T como célula empaquetadora a la que le incorporamos el plásmido de interés con la guía y los plásmidos p8.91 delta y pMD2.G, que contienen los genes *Gag/Pol/Tat/Rev*, necesarios para el empaquetamiento y el gen de la envuelta, respectivamente. Se sembraron unos 7 millones de células HEK-293T en placas pretratadas con poli-L-lisina al menos 1-2 horas antes de añadir las células. Al día siguiente las células fueron transfectadas con los 3 plásmidos empleando el reactivo LipoD293 (SignaGen), que requiere de DMEN sin suero y posteriormente se reemplazó el medio tanto a las 5 horas como al día siguiente por medio *Optimem* (Gibco). Tras producirse en las células empaquetadoras, las partículas virales se

liberaron al medio, por lo que realizamos dos recogidas de dicho medio a las 24 y a las 48 horas. Con las partículas virales listas se llevó a cabo la transducción de la línea celular HeLa. Para ello se sembraron entre 20.000 y 40.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y posteriormente se añadió 0,5 mL de medio con lentivirus en dos días alternos. La transducción se comprobó observando la presencia de GFP en las células al microscopio y tras dejar crecer para tener la suficiente cantidad se seleccionaron por citometría *Sorter* aquellas células que expresaban GFP, de manera que mediante la técnica de célula única se obtuvieron 5 placas de 96 pocillos con 1 célula por pocillo. Tras dejar que las células creciesen 1 mes aproximadamente se seleccionaron clones, se expandieron y se comprobó mediante qPCR y Western blot la pérdida total o parcial de TNKS1.

3.15. Estudio proteómico

El estudio de las proteínas asociadas a tankirasas en condiciones basales y tras la inhibición con el inhibidor G007-LK se llevó a cabo mediante la inmunoprecipitación de TNKS1/2 (apartado 3.10). El análisis de las proteínas asociadas a VE-cadherina se realizó al inmunoprecipitar VE-cadherina tras haber realizado un subfraccionamiento citosol-núcleo (apartados 3.10 y 3.11). Tras la obtención y preparación de las muestras, se mandaron al Servicio de Proteómica de la Universidad de Córdoba para separar, identificar y cuantificar los péptidos unidos a tankirasas y VE-cadherina mediante la combinación de cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución. Los resultados fueron obtenidos mediante espectrometría de masas de alta resolución en un espectrómetro *Orbitrap Fusion* (Thermo Scientific) en modo “*Data Dependent Acquisition*”. Los datos fueron adquiridos mediante el programa *Proteome Discover 2.1* con el algoritmo *Sequest HT* y los péptidos se obtuvieron, validaron y filtraron por un FDR (*False Discovery Rate*) al 1% a partir de los valores de probabilidad obtenidos a través del algoritmo *Percolator* usando un valor $\leq 0,01$.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.16. Fraccionamiento de polisomas

Con el fin de estudiar el proceso de traducción de un ARNm se obtuvo el perfil de los polirribosomas o polisomas mediante el fraccionamiento de la muestra de ARN al pasar por un gradiente de sacarosa. Para ello se prepararon varias soluciones de sacarosa (10-50%), se añadieron 2,2 mL de cada solución de sacarosa a un tubo de ultracentrífuga de 14x95 mm (Beckman Coulter) y se dejaron toda la noche a 4 °C para que se generara un gradiente lineal. Las células se sembraron en placas de 100 mm y se realizó el silenciamiento de ambas tankirasas en hipoxia (apartado 3.6.1). Antes de llevar a cabo la lisis celular se trataron las células con 100 µg/mL de cicloheximida (CHX) por condición durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS 1X suplementado con 100 µg/mL de CHX, se recogieron en PBS 1X-CHX con ayuda de un raspador y se centrifugaron durante 5 minutos a 500 g a 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante se resuspendió el *pellet* celular en el *buffer* de extracción de polisomas (Tris-HCl pH 7,5 20 mM; KCl 100 mM; MgCl₂ 5 Mm y NP-40 0,5%) suplementado con 100 µg/mL de CHX, inhibidor de proteasas 1X (Roche) e inhibidor de ARNasas (RiboLock, ThermoScientific) a una dilución 1:1.000. La mezcla se incubó durante 10 minutos en hielo (invirtiendo cada dos minutos) y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g a 4 °C, quedándonos con aproximadamente 9/10 partes del sobrenadante, sobre el que se midió la cantidad de proteína mediante el método de *Lowry* para así normalizar y emplear la misma cantidad en cada condición.

Para el fraccionamiento de los polisomas se añadió la misma cantidad de muestra a los tubos con los gradientes de sacarosa (1 mL de volumen final, equilibrando todos los tubos con agua DEPC) y se centrifugaron en una ultracentrífuga con el rotor SW40Ti (Beckman Coulter) durante 90 minutos a 36.000 rpm a 4 °C con máxima aceleración y deceleración. Tras la separación de las muestras en los gradientes, se colocaron los tubos en el sistema manual de recolección de fracciones (Beckman) y se obtuvieron 12 tubos correspondiente a 12 fracciones (se recogió aproximadamente 1 mL por tubo). El perfil de distribución del ARN total a lo largo de las fracciones

se obtuvo al analizar cada fracción en el nanodrop con una longitud de onda de 260 nm. Finalmente, una vez obtenidas las fracciones se realizó la extracción de ARN, la retrotranscripción a ADNc y el análisis de la distribución del ARNm de interés mediante RT-qPCR. La extracción de ARN se llevó a cabo siguiendo el método con TRIzol. Para ello se tomó 0,5 mL de muestra y se mezcló con 0,5 mL de TRIzol (Omega) y 200 µL de cloroformo (Carlo Erba). La mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 g a 4 °C y 0,5 mL de la capa superior se transfirió a un nuevo tubo con 1 mL de isopropanol (VWR) y 2 µL de reactivo Glycoblue (Invitrogen) para teñir el ARN. La mezcla se incubó durante toda la noche a -20 °C para precipitar el ARN y al día siguiente se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 g a 4 °C. Tras descartar el sobrenadante se lavó el *pellet* que contenía el ARN precipitado con etanol al 70% (Sigma-Aldrich), se eliminaron los restos de etanol y se dejó secar el *pellet* al aire libre para finalmente eluir el ARN con 16 µL de agua libre de ARNasas. La retrotranscripción del ARN a ADNc se llevó a cabo con el *kit* de retrotranscripción *iScript Reverse Transcription Supermix* y para la RT-qPCR se empleó la polimesasa *iTaq Universal SYBR green supermix*, todo ello tal y como se ha descrito previamente (apartado 3.8).

3.17. Angiogénesis *in vitro*

El desarrollo de mimetismo vasculogénico se estudió de manera *in vitro* a través de la capacidad de las células para formar unas estructuras denominadas tubos o redes vasculares cuando se siembran en una matriz 3D. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos a las que se añadió 50 µL de matrigel frío (4 °C) (Corning) y posteriormente se dejaron a 37 °C durante 30 minutos para que gelificara. Se sembraron 25.000 células por pocillo y tras 24 horas de incubación se visualizaron al microscopio *Olympus CKX4*, tomándose fotos con el objetivo 10X de una cámara *Olympus E-330* acoplada al microscopio. La formación de tubos 3D se analizó mediante el programa *Wimtube* (*Wimasis, Onimagin Technologies, Spain*) con el que se cuantificó el número de estructuras en forma de tubo de al menos 3 imágenes por condición, en 3 experimentos independientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.18. Análisis de datos con *CBioportal*

La web *CBioportal* fue utilizada para consultar los múltiples estudios que contiene y llevar a cabo tres tipos de análisis [372,373]. Para el primer análisis se empleó un estudio combinado de la TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) de 10.967 muestras en el que se integraban todo tipo de tumores (*TCGA PanCancer Atlas Studies*) y se analizó el porcentaje de alteraciones de *TNKS* y *TNKS2* organizados por tipos de tumores, así como la distribución de las mutaciones en la secuencia de ambos genes. Para el segundo y el tercer análisis se utilizaron varios estudios de la TCGA y se analizó la relación entre la expresión de ambas tankirasas y la de otros genes de interés, según el coeficiente de *Spearman* y su significancia estadística mediante el *q-valor*. Para el segundo análisis se recurrió a un estudio de la TCGA de 2.922 muestras en la que se incluía el análisis de todos los genomas (*PanCancer analysis of whole genomes, ICGC/TCGA, Nature*) y para el tercero se utilizaron estudios concretos de la TCGA de 80 muestras de melanoma uveal y 448 muestras de melanoma cutáneo (*TCGA, PanCancer Atlas*).

3.19. Análisis estadísticos

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos se usó el programa *Gradphad prism* (Versión 5) en el que se representaron los datos de al menos 3 experimentos independientes en forma de media y error estándar ($\pm$ SEM). Para comprobar la significancia se utilizó la *t de student* o bien el test *ANOVA*, según el número de condiciones del experimento. Las diferencias observadas se consideraron estadísticamente significativas siempre que el *p*-valor fuera < 0.05 (* si $p < 0,05$; ** si $p < 0,01$; *** si $p < 0,001$ y **** si $p < 0,0001$).

3.20. Otros buffers

El resto de los *buffers* utilizados en este trabajo se encuentran en las siguientes tablas:

PBS 10X (pH 6,8)	
NaCl	140 mM (81,9 g)
KCl	2,7 mM (2 g)
Na ₂ HPO ₄	10 mM (14,2 g)
KH ₂ PO ₄	1,8 mM (2,45 g)
Completar con agua Milli-Q hasta 1 L	
PBS 1X → Diluir 100 mL de PBS 10X con 900 mL de agua Milli-Q. (pH 7,2-7,4)	
Buffer de electroforesis SDS-PAGE 10X (pH 8,6-8,8)	
Tris-Base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Completar con agua Milli-Q hasta 1 L	
Buffer 1X → Diluir 100 mL de PBS 10X con 900 mL de agua Milli-Q.	
Buffer de transferencia húmeda 10X	
Tris-Base	24,25 g
Glicina	90 g
Completar con agua Milli-Q hasta 1 L	
Buffer 1X → Diluir 100 mL de PBS 10X con 700 mL de agua Milli-Q y 200 mL de metanol	

MATERIALES Y MÉTODOS

Buffers para hacer geles de poliacrilamida		
Buffer gel separador 4X 1,5 M pH 8,8	Tris-Base	90,85 g
	SDS 10%	20 mL
	Completar con agua Milli-Q hasta 500 mL	
Buffer gel acumulador 4X 0,5 M pH 6,8	Tris-Base	6,06 g
	SDS 10%	4 mL
	Completar con agua Milli-Q hasta 100 mL	

Geles de poliacrilamida			
	Separador		Acumulador
	7,5%	12%	4%
Acrilamida	2,25 mL	3,6 mL	666 µL
Buffer gel separador /acumulador 4X	2,25 mL	2,25 mL	1,25 mL
APS	45 µL	45 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL
Agua Milli-Q	4,5 mL	3,15 mL	3,15 mL

Tabla 10. Lista de *buffers* utilizados para *western blot*.

Solución de sales 10X	
NaCl	1000 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	200 mM
MgCl₂	50 mM

Gradientes de sacarosa → A partir de sacarosa 2,2 M					
Gradiente de Sacarosa	10%	20%	30%	40%	50%
Sacarosa 2,2 M	24 mL	48 mL	72 mL	96 mL	120 mL
Solución de sales 10X	18 mL	18 mL	18 mL	18 mL	18 mL
Agua DEPC	138 mL	114 mL	90 mL	66 mL	42 mL

Tabla 11. Lista de *buffers* para realizar el fraccionamiento de polisomas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Papel de las tankirasas en la adaptación tumoral a la hipoxia

4.1. Análisis de la frecuencia de alteración de los genes de *TNKS* y *TNKS2* en cáncer

A través de este primer bloque de resultados hemos realizado un análisis en profundidad del papel que juegan las proteínas tankirasas en cáncer. Para abordar esta tarea, en primer lugar, recurrimos a la información disponible en la base de datos *CBioportal*. Para el primer análisis utilizamos un estudio combinado de la *TCGA* (*The Cancer Genome Atlas*) compuesto por 10.967 muestras correspondientes a 33 tipo de tumores. Por un lado, analizamos el porcentaje de alteraciones de *TNKS* y *TNKS2* y observamos que, para ambos genes, el carcinoma endometrial era el tumor que presentaba mayor porcentaje de alteraciones, siendo estas principalmente mutaciones y en menor medida amplificaciones y deleciones profundas. En el caso de *TNKS* le seguían el adenocarcinoma colorrectal, el carcinoma urotelial de vejiga y el adenocarcinoma esofagogástrico. La principal causa de los dos primeros eran las deleciones profundas, seguidas de mutaciones, fusiones y amplificaciones, mientras que para el tercero la primera causa eran las amplificaciones, seguidas de mutaciones y deleciones profundas (**Figura 20**). En el caso de *TNKS2*, el melanoma estaba en segunda posición debido a la presencia de mutaciones en todos los casos, seguido del adenocarcinoma colorrectal causado por mutaciones y deleciones profundas y el adenocarcinoma de próstata en cuarta posición debido a deleciones profundas principalmente y al resto de alteraciones en menor medida (**Figura 20**).

A través de este estudio también pudimos acceder al tipo de mutaciones puntuales que se producían en ambas tankirasas y su localización a lo largo de la secuencia del gen. En ambos genes la mayoría de las mutaciones que se producían eran mutaciones con cambio de sentido no

RESULTADOS

conservadoras, que son aquellas que se producen por un cambio en un nucleótido y que provoca el cambio de un aminoácido por otro. No obstante, también había mutaciones que producía proteínas truncadas y en muy bajo porcentaje fusiones y mutaciones conservadoras cuyo cambio no alteraba el aminoácido que codificaba. En cuanto a la distribución a lo largo de la secuencia de los genes, no encontramos ningún hecho que nos resultara significativo, pues las mutaciones se producían a lo largo de toda la secuencia de los genes (**Figura 21**).

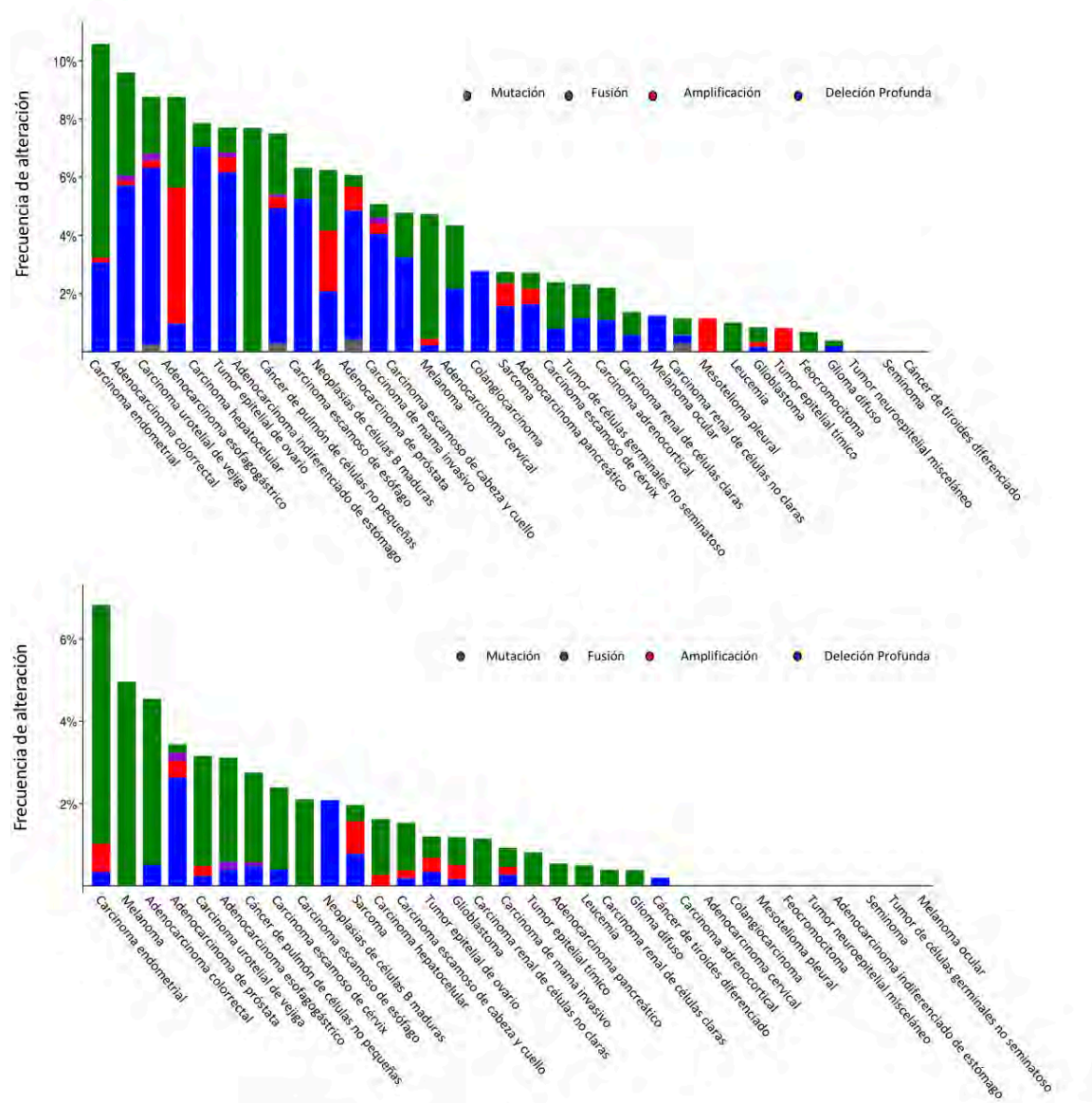
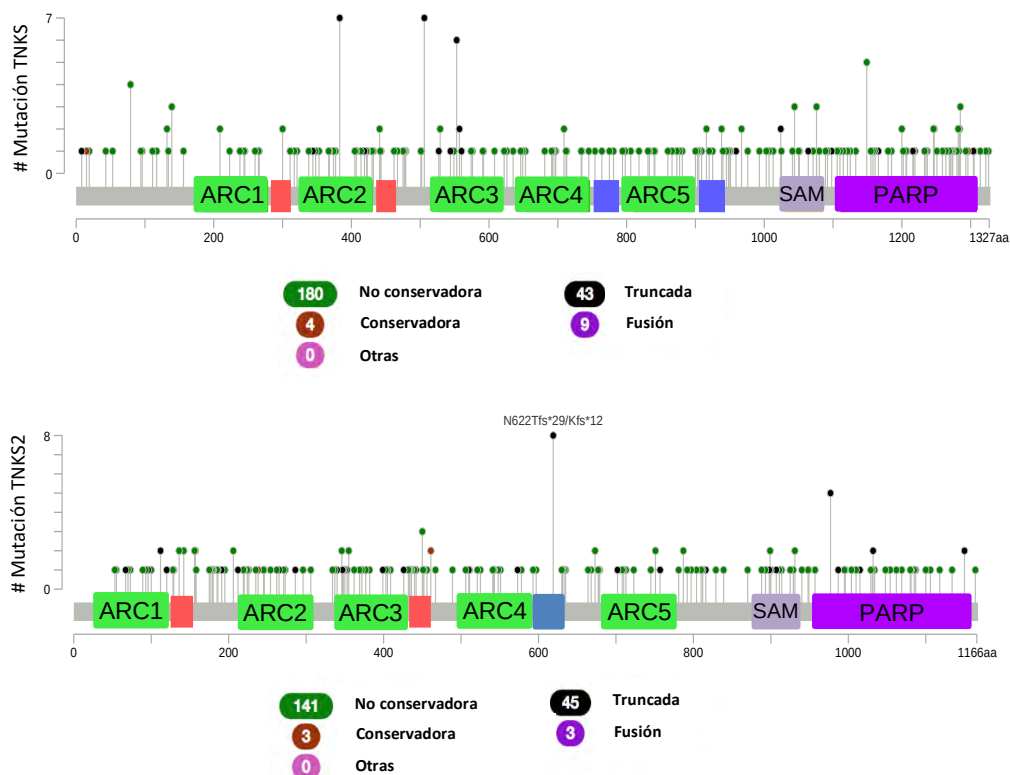


Figura 20. Alteraciones de *TNKS* y *TNKS2* en cáncer. Los gráficos muestran el porcentaje de alteraciones (mutación, fusión, amplificación y delección profunda) del gen de *TNKS* (gráfica superior) y *TNKS2* (gráfica inferior) en 33 tipos de tumores de un estudio de la *TCGA PanCancer Atlas* al que se accedió a través de la web *CBioportal*.



Por lo tanto, el hecho de que no hubiese más de un 10% de alteraciones en el caso del gen de *TNKS* y un 6% en el gen de *TNKS2* en los distintos tipos de tumores, junto con la falta de un patrón concreto en la distribución de las mutaciones a lo largo de los genes, nos hizo concluir que el papel de tankirasa en cáncer no se caracteriza por sus alteraciones a nivel de ambos genes.

4.2. Correlación significativa entre la expresión de los genes de tankirasa y genes de los miembros de la familia HIF

Basándonos de nuevo en los datos aportados por otro estudio de *CBioportal* con 2.922 muestras de todo tipo de tumores, analizamos la relación entre los niveles de expresión de tankirasa y los miembros de la familia de factores inducibles por hipoxia (HIFs), proteínas encargadas de regular la respuesta celular ante la falta de oxígeno. El análisis nos permitió obtener gráficos de puntos

RESULTADOS

donde cada punto corresponde a la expresión del ARNm de una muestra del estudio y además pudimos conocer qué muestras contenían mutaciones en alguno de los genes o ambos. Basándonos en el coeficiente de *Spearman*, que mide la asociación entre dos variables, y el q-valor para comprobar la significancia estadística de dicha asociación, detectamos que existe una relación estadísticamente significativa entre la expresión de TNKS1 y la expresión de todos los miembros de la familia HIF a excepción de HIF-3 α . No obstante, mientras que con HIF-1 α (*Spearman* de 0,24 y q-valor de $1,10 \times 10^{-19}$) y HIF-1 β (*Spearman* 0,21 y q-valor de $3,03 \times 10^{-13}$) existía una relación directamente proporcional de acuerdo al coeficiente de Spearman, con HIF-2 α (*Spearman* de -0,09 y q-valor de $4,94 \times 10^{-3}$) existía una relación inversamente proporcional (**Figura 22**).

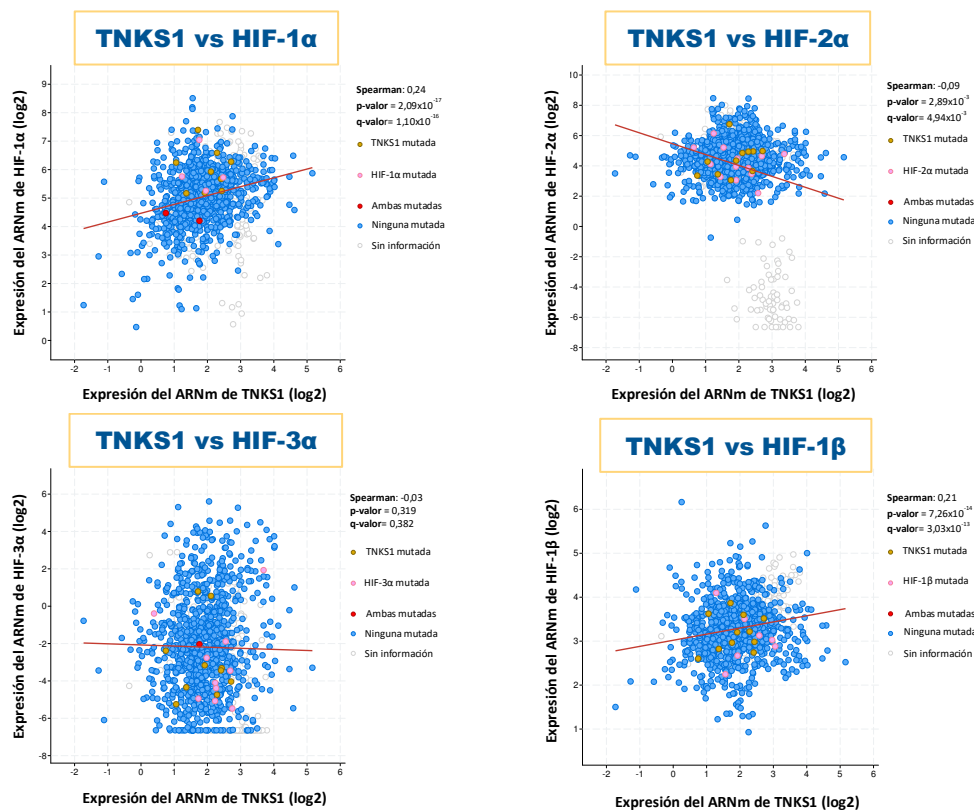


Figura 22. Relación entre TNKS1 y los miembros de la familia HIF. Los gráficos de dispersión muestran la relación entre la expresión del ARNm de TNKS1 y el de los miembros de la familia HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α y HIF-1 β) según el coeficiente de Spearman en un estudio en el que se incluyen múltiples tipos de tumores. Cada punto se corresponde con una muestra. La información se obtuvo a través de un estudio de la *TCGA PanCancer Atlas* al que se accedió a través de la web *CBioportal*.

La expresión de TNKS2 sí que mantenía una relación significativa con la de todos los miembros de la familia HIF, siendo directamente proporcional en el caso HIF-1 α (*Spearman* de 0,32 y q-valor de $1,20 \times 10^{-28}$) y HIF-1 β (*Spearman* de 0,35 y q-valor de $2,50 \times 10^{-35}$) e inversamente proporcional con HIF-2 α (*Spearman* de -0,07 y q-valor de 0,0270) y HIF-3 α (*Spearman* de -0,19 y q-valor de $1,15 \times 10^{-10}$) (**Figura 23**). En cuanto a la frecuencia de mutaciones, la mayoría de las muestras mantenían ambos genes sin ninguna mutación para ambas tankirasas o para los miembros de la familia HIF, lo cual apoyaba nuestra hipótesis de que las alteraciones relacionadas con tankirasas en cáncer se producen a nivel de proteínas y no a nivel genético.

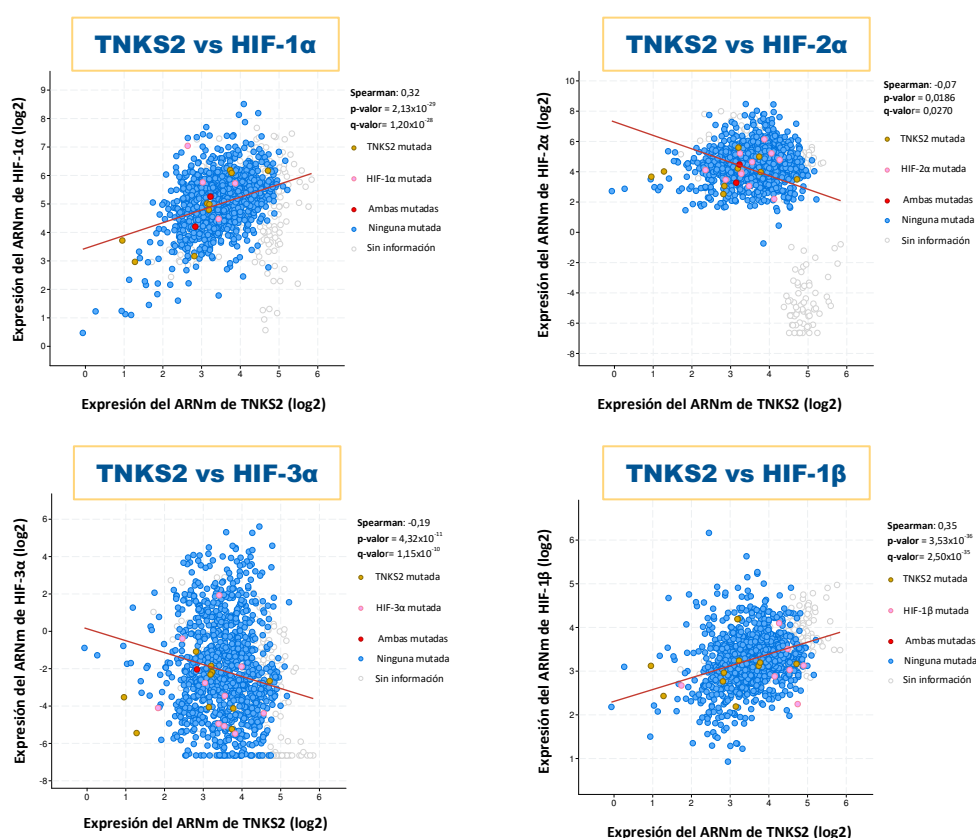


Figura 23. Relación entre TNKS2 y los miembros de la familia HIF. Los gráficos de punto muestran la relación entre la expresión del ARNm de TNKS2 y el de los miembros de la familia HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α y HIF-1 β) según el coeficiente de Spearman en un estudio en el que se incluyen múltiples tipos de tumores. Cada punto se corresponde con una muestra. La información se obtuvo a través de un estudio de la *TCGA PanCancer Atlas* al que se accedió a través de la web *CBioportal*

RESULTADOS

4.3.El silenciamiento de TNKS1/2, pero no su inhibición, disminuye los niveles de proteína de HIF-1 α durante hipoxia

Tras analizar la relación entre las tankirasas y los miembros de la familia HIF, decidimos profundizar en la posible relación funcional entre ambas tankirasas y el factor de transcripción HIF-1 α . HIF-1 α es un factor dependiente de ausencia de oxígeno, de tal manera que sus niveles de proteína se ven regulados dependiendo de la disponibilidad del mismo. En condiciones basales de oxígeno (O₂), que en nuestro trabajo nombraremos como normoxia, HIF-1 α es modificado a través de hidroxilaciones que marcan su degradación vía proteasoma (**Figura 7**). Por lo tanto, para realizar el trabajo experimental de esta tesis doctoral, trabajaremos bajo condiciones controladas de baja disponibilidad de oxígeno, en adelante hipoxia. Experimentos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que 4 horas son suficientes para inducir la estabilización de la subunidad HIF-1 α y así poner en marcha la maquinaria de regulación del factor de transcripción HIF-1. Para corroborar esto en nuestro modelo tumoral, sometimos a la línea celular HeLa a una situación de hipoxia al 1% de O₂ durante tiempos relativamente cortos de exposición (2, 4, 6 y 8 horas). Los resultados obtenidos por *western blot* mostraron que 2 horas de hipoxia 1% fueron suficientes para estabilizar HIF-1 α , mostrando acúmulo de la proteína, en adelante no dependiente del tiempo de exposición a niveles bajos de O₂. También medimos los niveles de tankirasa, aunque su expresión no se vio modificada por la hipoxia (**Figura 24A**).

Tras establecer el tiempo de hipoxia, quisimos comprobar si la estabilidad de HIF-1 α se vería comprometida al inhibir la actividad catalítica de las tankirasas. Por ello elegimos dos inhibidores catalíticos de tankirasas, XAV939 y G007-LK, para estudiar su efecto sobre HIF-1 α durante hipoxia. Primero llevamos a cabo una puesta a punto de la concentración de ambos inhibidores, tratando células HeLa durante 24 horas para posteriormente analizar los niveles de TNKS1/2 así como de dos de sus sustratos más conocidos, RNF146 y axina 1 por *western blot*. Tal y como se ha mencionado antes, la inhibición de la actividad de tankirasa impide que ésta pueda PARilar a gran

cantidad de sustratos, incluyéndose a ella misma, para mediar el proceso de PARdU que desencadena la degradación de proteínas en el proteasoma. Por lo tanto, un tratamiento efectivo con los mismos inducirá acumulación de ambas tankirasas. Tras el tratamiento con los inhibidores XAV939 y G007-LK observamos la acumulación de los niveles de TNKS1 (banda superior) y TNKS2 (banda inferior), así como de dos sustratos clásicos de estas proteínas (RNF146 y axina 1) (**Figura 24B**).

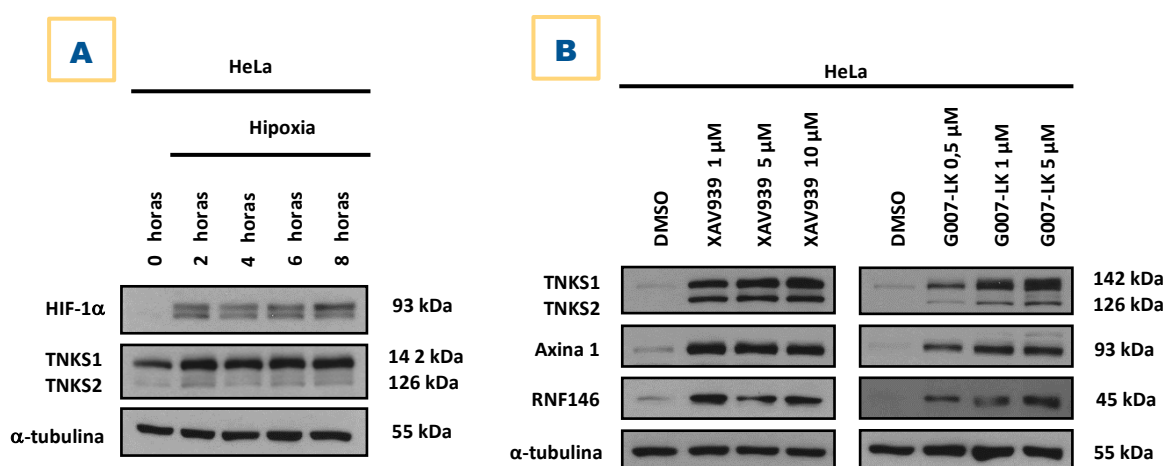


Figura 24. Puesta a punto del tiempo de hipoxia y los inhibidores de tankirasa. A. Análisis por *western blot* de la estabilidad de HIF-1α y TNKS1/2 a distintos tiempos de hipoxia (2, 4, 6 y 8 horas) al 1% O₂. B. Análisis por *western blot* de las proteínas TNKS1/2, axina 1 y RNF146 tras usar distintas concentraciones de los inhibidores de tankirasa XAV939 (1, 5 y 10 μM) y G007-LK (0,5, 1 y 5 μM) durante 24 horas.

La dosis respuesta de ambas moléculas, nos permitió seleccionar las dosis de 10 μM para el XAV939 y de 5 μM para el G007-LK. A continuación, confirmamos el resultado obtenido en células HeLa en diversas líneas tumorales humanas, tales como células MUM2B, LN229 y U87MG. Todas las líneas celulares fueron tratadas con XAV939 y G007-LK durante 24 horas, de las cuales las 4 últimas horas fueron en condiciones de hipoxia al 1% de O₂. Como control positivo de la acción de los inhibidores medimos los niveles de las propias tankirasas y del sustrato RNF146, observando un claro aumento de los niveles de las proteínas como consecuencia de su acumulación respecto al control con DMSO. Los niveles de HIF-1α, acumulado en las condiciones de hipoxia, no sufrieron

RESULTADOS

ninguna variación tras el uso de los dos inhibidores en ninguna de las cuatro líneas empleadas (Figura 25).

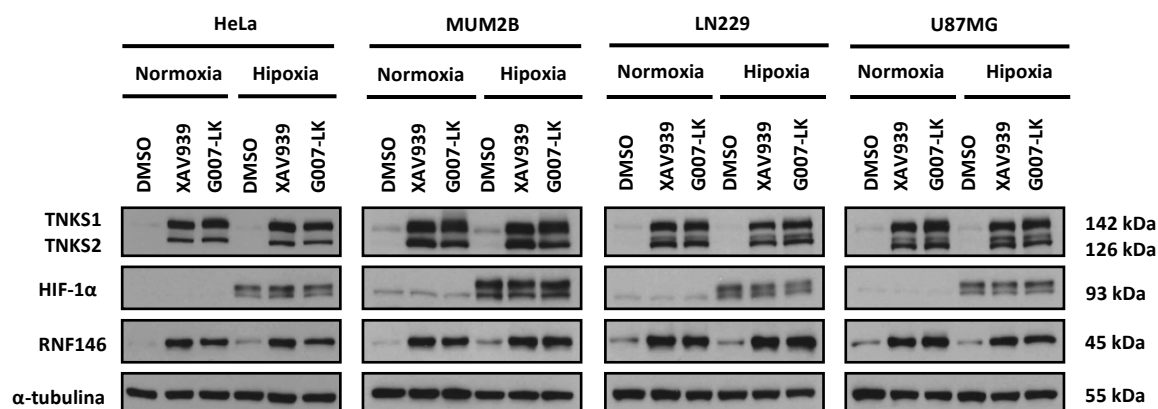


Figura 25. Efecto de los inhibidores de tankirasa en hipoxia. Análisis por *western blot* de la estabilidad de HIF-1α, así como los niveles de TNKS1/2 y RNF146 tras inhibir ambas tankirasas con XAV939 10 μM y G007-LK 5 μM durante 24 horas en condiciones de normoxia e hipoxia (4 horas al 1% O₂) en la líneas tumorales HeLa, MUM2B, LN229 y U87MG.

A continuación, nos planteamos si la presencia de las tankirasas (independientemente de su actividad) podría tener un efecto sobre la estabilidad de HIF-1α durante hipoxia. Para ello se diseñó un experimento de silenciamiento transitorio mediante *siRNA* frente a cada una de las tankirasas. El resultado debería ser reproducible a las mismas condiciones y tiempos de hipoxia, así como en las mismas líneas celulares donde se ensayó el uso de XAV939 y G007-LK. Tras el diseño y transfección durante 48 horas con el *siRNA* para cada candidato, las células se sometieron a hipoxia siguiendo el protocolo del experimento anterior, es decir, los extractos celulares se obtendrían a las 48 horas de haber añadido los *siRNAs*, de las cuales las últimas 4 horas fueron en condiciones de hipoxia al 1% O₂. Los niveles de TNKS1/2 y RNF146 fueron analizados como controles para comprobar que el silenciamiento se había producido y se constató una caída en los niveles de proteína de ambas tankirasas en comparación con el control SCR (*Scrambled* o secuencia *siRNA* no específica), así como una acumulación del sustrato RNF146 (Figura 26A). Al medir los niveles de HIF-1α se observó una caída en los niveles de la proteína durante hipoxia en

ausencia de ambas tankirases, en comparación con el control SCR y en todas las líneas celulares ensayadas (**Figura 26A**). No obstante, esto no ocurrió cuando medimos los niveles de otros miembros como HIF-2 α y HIF-1 β (**Figura 26B**). Para comprobar que este efecto no se debía únicamente a un efecto inespecífico por esa pareja de *siRNAs* en concreto, decidimos utilizar una segunda pareja. Entonces llevamos a cabo el silenciamiento de tankirasa 1 y 2 en la línea HeLa combinando las dos parejas de *siRNAs* que teníamos para cada tankirasa y el resultado obtenido fue el mismo, confirmando que la ausencia de TNKS1/2 (pero no la inhibición de su actividad) ejerce una acción decisiva sobre la estabilidad de HIF-1 α (**Figura 26C**).

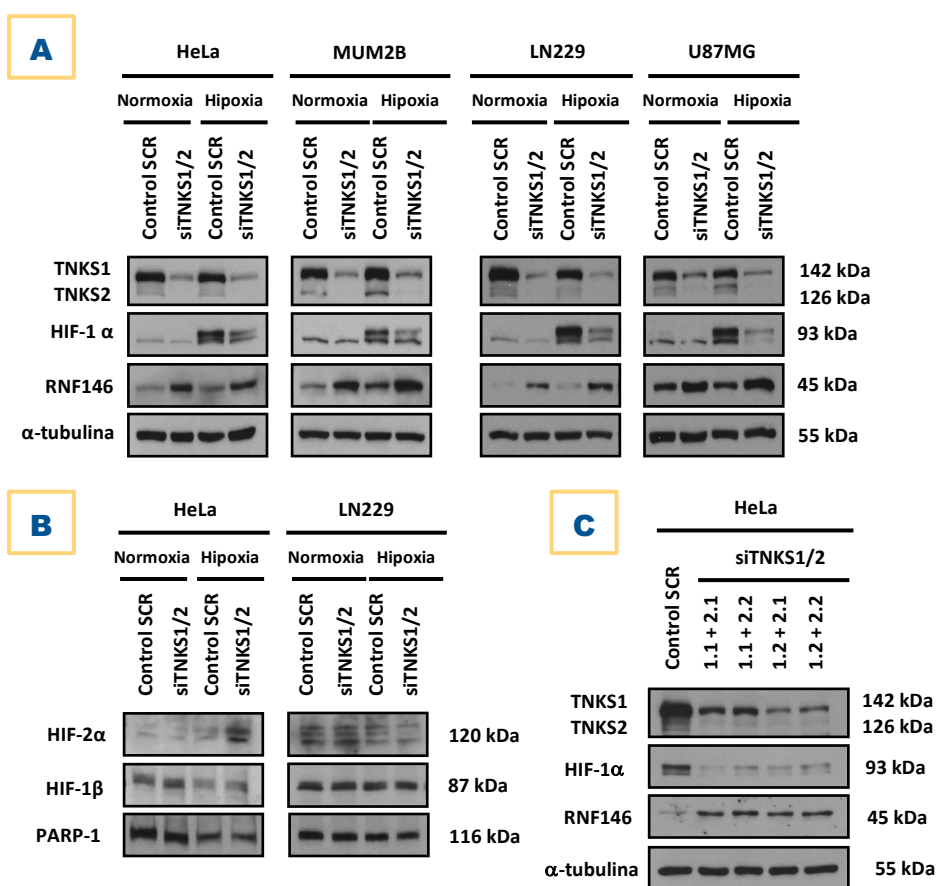


Figura 26. Efecto del doble silenciamiento de TNKS1/2 en hipoxia. A/B. Análisis por *western blot* de los miembros de la familia HIF (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-1 β) así como los niveles de TNKS1/2 y RNF146 tras realizar el silenciamiento génico transitorio de ambas tankirases durante 48 horas en condiciones de normoxia e hipoxia (4 horas al 1% O₂) en varias líneas tumorales. **C.** Análisis por *western blot* de la estabilidad de HIF-1 α tras el doble silenciamiento de TNKS1/2 al combinar varios *siRNAs* en hipoxia.

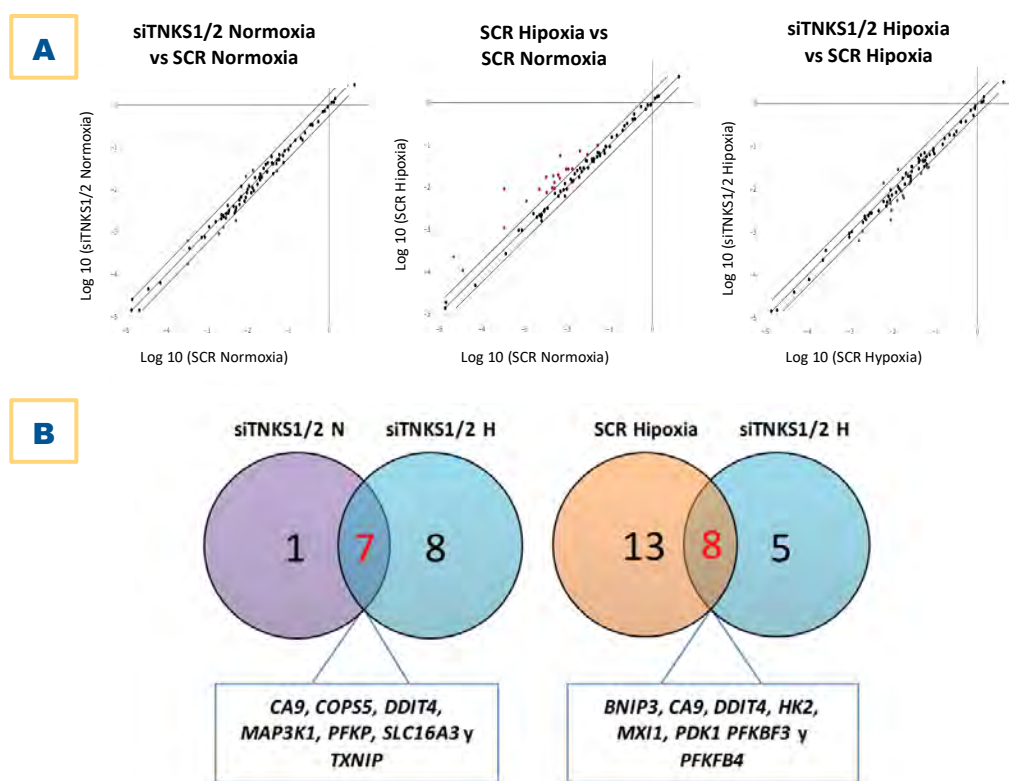
RESULTADOS

4.4.El silenciamiento de TNKS1/2 compromete la actividad de HIF-1 α como factor de transcripción

La disminución en los niveles de HIF-1 α tras el doble silenciamiento de TNKS1/2 nos hizo preguntarnos si además de su estabilidad se estaba viendo comprometida su actividad como factor de transcripción. Por lo tanto, el siguiente paso fue estudiar genes de respuesta a hipoxia (1% O₂) dependientes de HIF-1 α , cuyos niveles de expresión pudiesen estar afectados en las condiciones de doble silenciamiento de TNKS1/2. En una primera aproximación, se llevó a cabo un *array* de expresión en células HeLa doblemente silenciadas para las TNKS1/2 en condiciones de normoxia e hipoxia. Utilizamos el *Hypoxia Signaling RT² Profiler PCR Array* que recoge algunos de los genes dependientes de HIF-1 α más representativos. De acuerdo con las instrucciones del kit y usando herramientas informáticas que la casa comercial Qiagen ofrece en su web, se analizó el ciclo umbral (Ct) de los diferentes genes dianas de HIF-1 α recogidos en el kit. De acuerdo a las instrucciones del kit, todos los criterios de calidad de las muestras, incluidos controles de ADN genómico y controles negativos eran fiables, asegurando la reproducibilidad de los resultados obtenidos. De los 5 genes control para realizar la normalización de los resultados que incluye el *kit*, se decidió normalizar con los genes *36B4* y *β 2M*. Para analizar los resultados decidimos fijar una modificación de la expresión de al menos 1,8 veces y generamos gráficos de dispersión al realizar las siguientes comparaciones: siTNKS1/2 Normoxia vs SCR Normoxia; SCR Hipoxia vs SCR Normoxia; y siTNKS1/2 Hipoxia vs SCR Hipoxia (**Figura 27A**). En la primera comparación observamos que había 3 genes cuya expresión había aumentado y 5 genes que había disminuido su expresión en respuesta al doble silenciamiento de tankirasa durante normoxia. Al comparar la condición de SCR normoxia con la de SCR hipoxia se detectaron 21 genes que se habían sobre-expresado en respuesta a una exposición de 4 horas a hipoxia. Por último, tal y como se puede observar en la figura **27A**, la tercera comparación arrojó un resultado en el que se observaron 2 genes cuya expresión había aumentado y 13 genes cuya expresión había disminuido en respuesta al doble silenciamiento TNKS1/2 en hipoxia respecto a la condición SCR hipoxia (**Figura 27A**).

RESULTADOS

Una vez obtenidos los genes con expresión diferencial en cada comparación quisimos hacer una distinción entre los genes que *a priori* estaban regulados únicamente por tankirasa sin tener en cuenta la hipoxia y los genes que estaban regulados por tankirasa en hipoxia a través del factor HIF-1 α . Los genes regulados únicamente por tankirasa los obtuvimos al comparar los genes con expresión diferencial de las dos condiciones de silenciamiento de TNKS1/2 (normoxia e hipoxia), habiendo 7 genes comunes en ambas condiciones (*CA9*, *COPS5*, *DDIT4*, *MAP3K1*, *PFKP*, *SLC16A3* y *TXNIP*) (**Figura 27B**). Por otro lado, comparamos aquellos genes sobreexpresados en la condición SCR hipoxia con los genes que habían disminuido su expresión tras el silenciamiento de TNKS1/2 en hipoxia y en este caso el análisis mostró 8 genes (*BNIP3*, *CA9*, *DDIT4*, *HK2*, *MXI1*, *PDK1*, *PFKFB3* y *PFKFB4*) cuya expresión había aumentado tras 4 horas de hipoxia, pero disminuyó con el doble silenciamiento de tankirasa (**Figura 27B**). Tras estas dos comparaciones decidimos que un total de 13 genes de interés, cuyo *Fold Regulation* fue recogido en una tabla (**Figura 27C**).



RESULTADOS

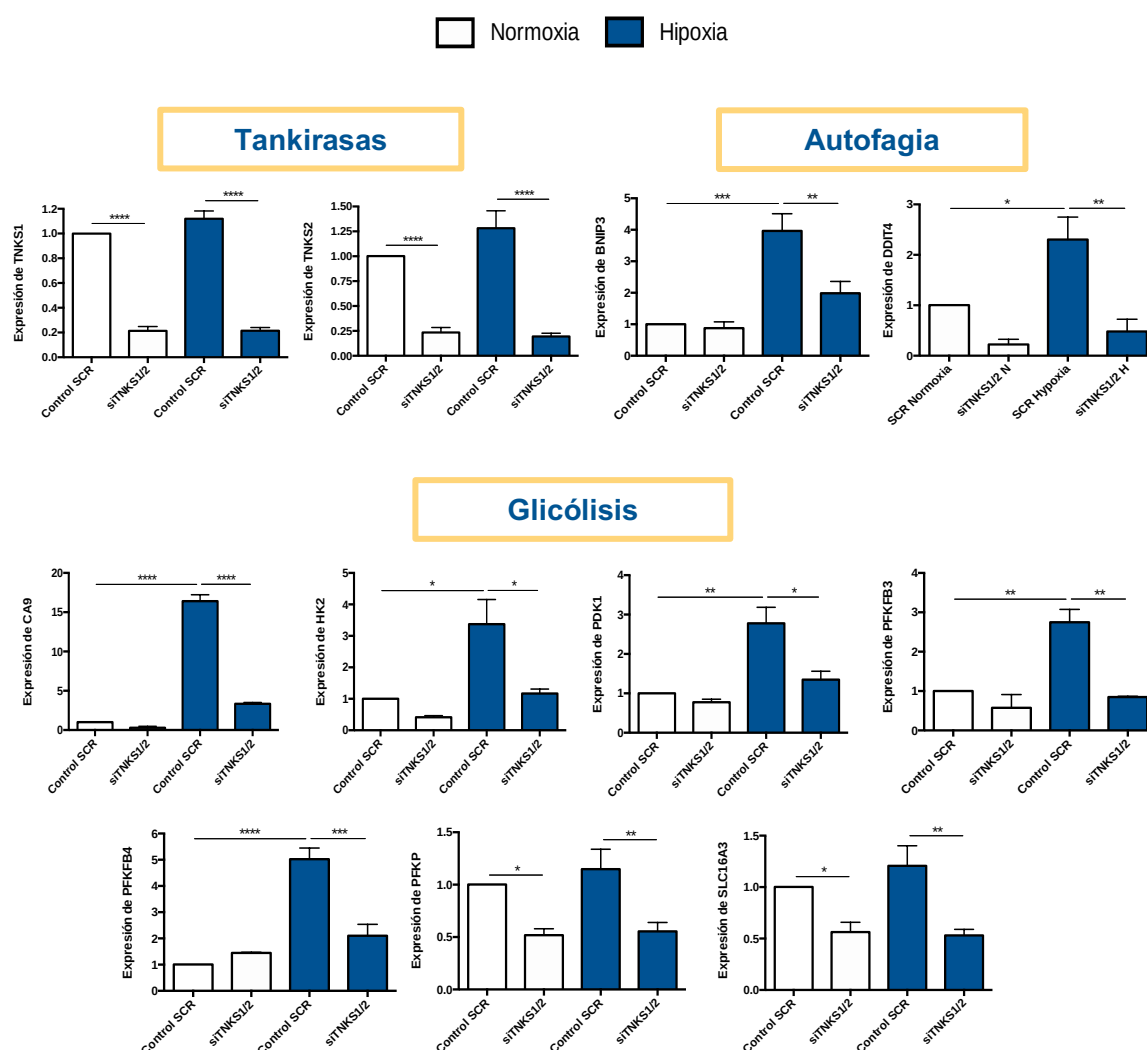
C

Genes	siTNKS1/2 Normoxia	SCR Hipoxia	siTNKS1/2 Hipoxia
	Fold Regulation		
	Comparado con SCR Normoxia		Comparado con SCR Hipoxia
BNIP3	-1.17	3.54	-2.17
CA9	-1.91	26.72	-4.71
COP55	2.12	-1.00	2.15
DDIT4	-2.74	1.82	-2.88
HK2	-1.70	3.85	-2.92
MAP3K1	-2.16	-1.00	-1.87
MXI1	-1.01	2.39	-1.81
PDK1	-1.09	3.95	-1.88
PFKP	-1.88	1.25	-2.05
PFKB3	-1.55	2.55	-2.37
PFKB4	1.34	5.38	-2.48
SLC16A3	-1.94	-1.58	-2.52
TXNIP	2.30	-1.47	2.27

Figura 27. Array de la ruta de hipoxia tras el doble silenciamiento de TNKS1/2. A. Gráficos de dispersión obtenidos al comparar las distintas condiciones de los genes contenidos en el *Hypoxia Signaling RT2 Profiler PCR Array* con un *Fold Regulation* superior a 1,8. Los puntos rojos hacen referencia a genes que han aumentado su expresión respecto al control, mientras que los puntos verdes indican que el gen ha disminuido su expresión. **B.** Diagramas de *Venn* que muestran los genes regulados por tankirasa sin tener en cuenta la hipoxia (izquierda) y los genes regulados por tankirasa en hipoxia (derecha). **C.** Tabla que muestra los 13 genes elegidos de ambas comparaciones con su correspondiente *Fold Regulation*. El color rojo indica que su expresión ha aumentado, el color verde que su expresión ha disminuido y el amarillo que su expresión no ha variado respecto al control.

Una vez acabado el análisis informático, quisimos comprobar los resultados obtenidos, para los 13 genes de interés mostrados en la figura anterior. Para ello cuantificamos sus niveles de expresión mediante RT-qPCR y confirmamos los datos del *array* de expresión en 12 de los 13 genes candidatos (la expresión de MXI1 no cambió en ninguna de las condiciones) (**Figura 28**). Los niveles de expresión del ARNm de TNKS1 y TNKS2 se redujeron en un 75-80% tras el doble silenciamiento, confirmando la eficiencia del silenciamiento. En cuanto a los 12 genes restantes, los clasificamos de acuerdo a su función celular, siendo 9 de ellos genes relacionados con el metabolismo y bioenergética celular (7 genes relacionados con la glicólisis y 2 relacionados con la autofagia) (**Figura 28**). Al analizar los niveles de expresión pudimos detectar diferentes situaciones. Por un

lado, la expresión de los mensajeros de CA9, HK2, PFKFB3, PFKFB4, PDK1, BNIP3 y DDIT4 aumentó de manera significativa tras la exposición a hipoxia, pero también mostró una disminución significativa al realizar el doble silenciamiento de tankirasa. En el caso del gen DDIT4 también se detectó una disminución en su expresión tras el silenciamiento en normoxia, aunque no fue significativa. Por otro lado, la expresión de los genes PFKP, SLC16A3, MAP3K1, COPS5 y TXNIP cambió de manera significativa tras el silenciamiento de TNKS1/2 en normoxia e hipoxia, pero de distinta manera, ya que la expresión de PFKP, SLC16A3 y MAP3K1 disminuyó mientras que la expresión de COPS5 y TXNIP aumentó tras el silenciamiento (**Figura 28**).



RESULTADOS

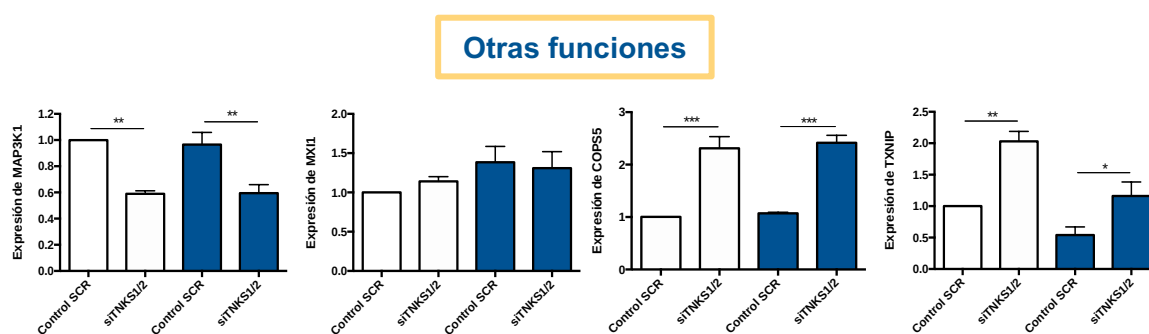
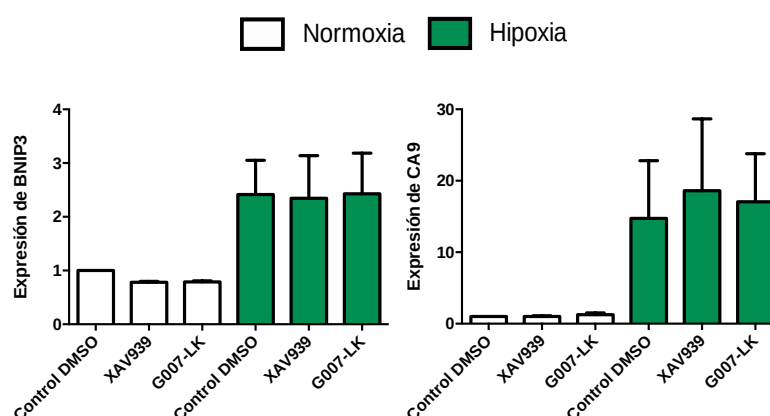


Figura 28. Efecto del silenciamiento de TNKS1/2 en la expresión de genes dependientes de HIF-1 α en HeLa. Análisis de la expresión del ARNm de los genes seleccionados tras realizar el *array* de la ruta de hipoxia en la línea celular HeLa al silenciar TNKS1/2 durante 48 horas. Los resultados se normalizaron respecto al gen *36B4*. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ($\pm$ SEM).

Este apartado de resultados se completó analizando los niveles de expresión de dos de los genes más representativos inducidos por hipoxia, *CA9* y *BNIP3*, en respuesta a los inhibidores de tankirasas disponibles en nuestro laboratorio. El objetivo sería determinar si la transcripción de dichos genes depende únicamente de la presencia de las tankirasas o de su propia actividad bioquímica. Nuevamente células HeLa fueron tratadas con los inhibidores XAV939 y G007-LK, para finalmente ensayar condiciones de normoxia e hipoxia 1% O₂. Los resultados mostraron una inducción de la expresión del mensajero de CA9 y BNIP3 tras las 4 horas de hipoxia, pero no se apreció ninguna disminución significativa tras el tratamiento con XAV939 ni G007-LK (**Figura 29A**). Finalmente, el objetivo del análisis inicial sería confirmado silenciando TNKS1/2 en una segunda línea celular humana, en este la línea de glioblastoma LN229, en condiciones de normoxia e hipoxia 1% O₂ y analizando los niveles de expresión de algunos de los genes de interés (*CA9*, *HK2*, *PFKFB4*, *BNIP3*, *DDIT4* y *COP5*). Los resultados obtenidos por RT-qPCR en esta segunda línea celular confirmaron los obtenidos previamente en la línea HeLa, apuntando a que tras el silenciamiento de ambas tankirasas se producía una disminución de los niveles de proteína de HIF-1 α , así como también se veía comprometida su actividad como factor de transcripción (**Figura 29B**).

A



B

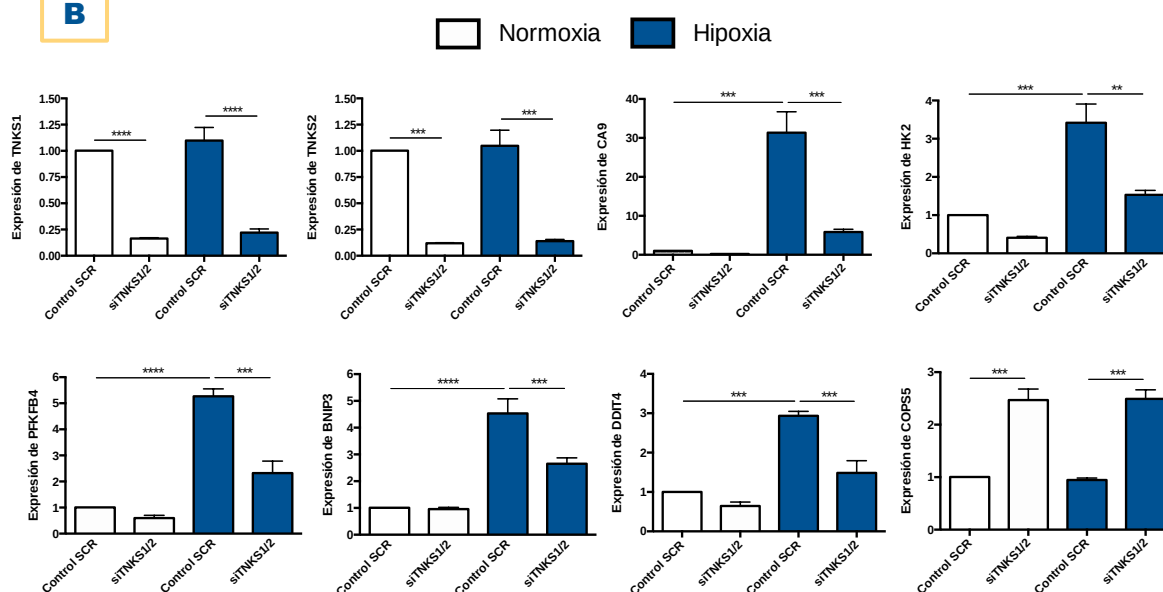


Figura 29. Efecto de la inhibición y del silenciamiento de TNKS1/2 en genes dependientes de HIF-1 α durante hipoxia. A. Análisis de la expresión del ARNm de CA9 y BNIP3 tras el uso de XA939 10 μ M y G007-LK 5 μ M durante 24 horas en normoxia e hipoxia en la línea HeLa. B. Análisis de la expresión del ARNm de TNKS1/2, CA9, HK2, PFKFB4, BNIP3, DDIT4 y COPS5 tras el doble silenciamiento de tankirasa durante 48 horas en la línea LN229. Los resultados se normalizaron respecto al gen 36B4. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ($\pm$ SEM).

4.5. Tankirasa y HIF-1 α interactúan en condiciones de normoxia e hipoxia

Tras confirmar el efecto diferencial entre la inhibición de la actividad y el silenciamiento de TNKS1/2 sobre la estabilidad y actividad de HIF-1 α , decidimos a continuación descifrar el mecanismo de acción de las proteínas TNKS1 y TNKS2 sobre HIF-1 α en respuesta a hipoxia. El

RESULTADOS

efecto de tankirasas sobre la estabilidad de HIF-1 α , podría deberse a un efecto directo a través de su interacción con HIF-1 α , o bien un efecto indirecto a través de proteínas con las que interaccionen en común, sin descartar otros posibles mecanismos. En primer lugar, quisimos determinar si ambas proteínas interaccionaban durante hipoxia y para ello llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de TNKS1/2 en condiciones de normoxia e hipoxia no siendo posible detectar la presencia de HIF-1 α formando un inmunocomplejo unido a tankirasas (**Figura 30A**). Sin embargo, cuando realizamos la inmunoprecipitación de HIF-1 α , esta vez tras el tratamiento con G007-LK en normoxia e hipoxia, sí que detectamos la presencia de TNKS1 y TNKS2 unido a HIF-1 α . En la condición de normoxia no detectamos la interacción mientras que en la condición de hipoxia sí se detectó una banda correspondiente a TNKS1. Además, tras la inhibición de ambas tankirasas detectamos un mayor nivel de TNKS1 y TNKS2 unido a HIF-1 α , tanto en normoxia como en hipoxia, a pesar de no detectar HIF-1 α en normoxia (**Figura 30B**). Esto podría deberse a que al usar los inhibidores de TNKS1/2, los niveles de ambas tankirasas se acumulan y eso podría fomentar su interacción y facilitar su detección en la inmunoprecipitación.

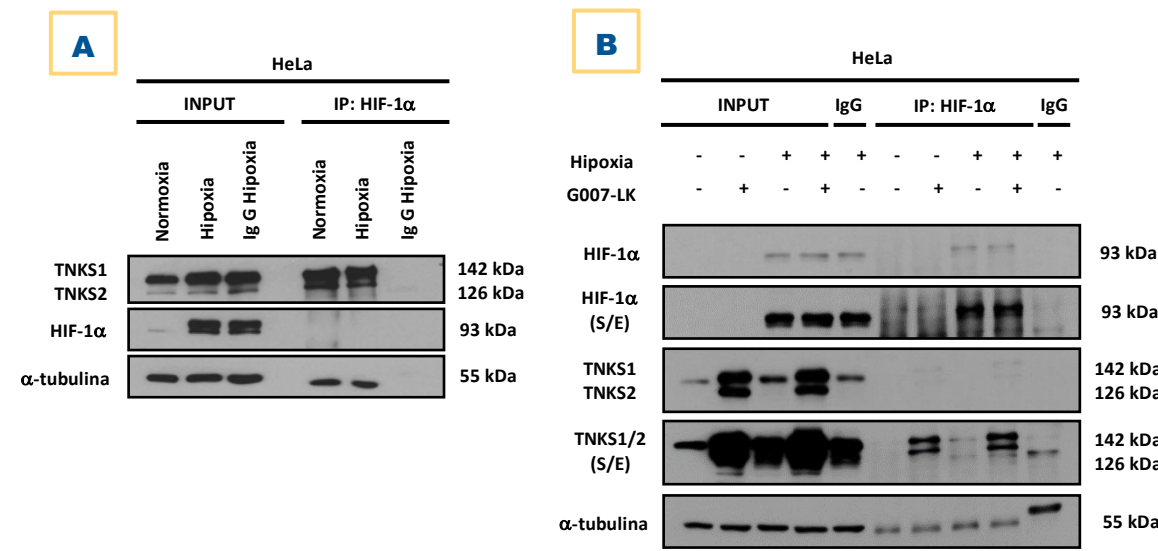


Figura 30. Estudio de la interacción entre tankirasas y HIF-1 α mediante inmunoprecipitación. A. Inmunoprecipitación de TNKS1/2 en normoxia e hipoxia (4 horas al 1% O₂). **B.** Inmunoprecipitación de HIF-1 α tras el uso de G007-LK 5 μ M durante 24 horas en condiciones de normoxia e hipoxia (4 horas 1% O₂). S/E: sobreexpuesto.

Dada esta discrepancia de resultados entre las dos inmunoprecipitaciones realizadas decidimos llevar a cabo un experimento de proteómica para detectar con mayor precisión las proteínas unidas a tankirasa. En este caso llevamos a cabo la inmunoprecipitación de ambas tankirasas tras el uso del inhibidor de tankirasa G007-LK en normoxia e hipoxia (4h al 1% de O₂). El análisis se realizó en el Servicio de Proteómica de la Universidad de Córdoba mediante una combinación de cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución. Con esta técnica obtuvimos una lista de proteínas que mostraba el número de péptidos que se habían identificado ordenados por su *Score Sequest HT*, que hace referencia a la suma de todos los valores que se le ha asignado a cada péptido aislado de una misma proteína con el algoritmo *Sequest HT*. Este parámetro estadístico tiene en cuenta el número de fragmentos que son comunes entre el péptido obtenido por espectrometría de masas y el péptidos de referencia consultado en la base de datos. En la lista de proteínas no encontramos ningún péptido correspondiente a HIF-1 α (**Figura 31**). Los péptidos correspondientes a TNKS1 y TNKS2 en todas las condiciones fueron detectados, habiendo un mayor número de péptidos en las condiciones en las que se usó el inhibidor G007-LK (30 péptidos correspondientes a TNKS1 y 15 péptidos correspondientes TNKS2 en condiciones basales, mientras que tras la inhibición se detectaron 50 péptidos de ambas tankirasas). Asimismo, detectamos algunos de los sustratos conocidos de ambas tankirasas como TAB182, que también recibe el nombre de proteína de unión a TNKS1; la enzima GMD o axina 1. En el caso de axina 1 sólo se detectaron unos 2 péptidos en ambas condiciones de inhibición con el G007-LK, pero no en las condiciones sin tratar. Otras proteínas interesantes que se detectaron fueron la peptidasa USP10, las subunidades de la prolil-4-hidroxilasa (P4HA y P4HB) y otros miembros de la familia PARP como PARP-1 y PARP-2 (**Figura 31**).

RESULTADOS

Proteómica → IP: TNKS1/2

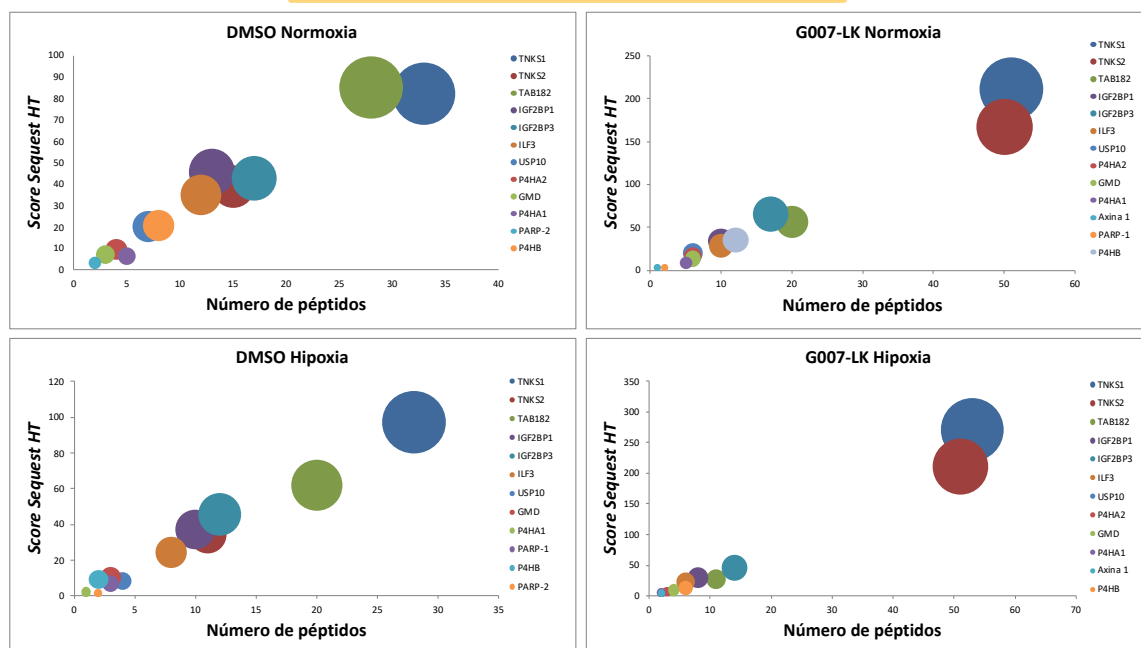


Figura 31. Análisis del perfil de proteínas en interacción con TNKS1/2 durante hipoxia. Gráfico de las principales proteínas que interaccionan con TNKS1/2 detectadas tras llevar a cabo una proteómica en condiciones basales y tras su inhibición con G007-LK 5 μ M durante 24 horas en normoxia e hipoxia (4 horas 1% O₂). Cada gráfico corresponde a una condición y muestra el número de péptidos detectados, así como su *Score Sequest HT*. Este experimento se llevó a cabo en la línea HeLa.

Al no obtener una información decisiva tras realizar la proteómica volvimos a recurrir a una nueva técnica para intentar comprobar la interacción entre tankirasas y HIF-1 α , de manera que realizamos un ensayo de ligación por proximidad (PLA). Esta técnica emplea dos fragmentos de una sonda (Plus y Minus) que reconocen anticuerpos de distintas especies. Dichos fragmentos por sí solos no emiten fluorescencia, pero mediante la acción de una ligasa y a condición de que estén a una distancia inferior a 40 nm, los fragmentos se ligarán y emitirán una señal fluorescente que se verá amplificada por acción de una polimerasa. Gracias a este ensayo se puede visualizar la posible interacción entre proteínas y además es una técnica muy sensible, por lo que podría servir para detectar interacciones muy débiles que no se pueden estudiar mediante otras técnicas como la inmunoprecipitación. En este caso sometimos las células sólo a normoxia e hipoxia y realizamos la técnica, analizando los resultados mediante microscopía confocal donde cada interacción se

observó como un punto de fluorescencia. Luego utilizamos el programa *ImageJ* para llevar a cabo el conteo de los puntos de 100 células por condición y los resultados indicaron que había aproximadamente 100 puntos por célula tanto en normoxia como hipoxia (**Figura 32A**). En cuanto a la distribución de la interacción, ésta se produce a lo largo de toda la célula (tanto en el citosol como en el núcleo), lo cual puede concordar con los resultados obtenidos en un subfraccionamiento citosol-núcleo, pues mostró la presencia de HIF-1 α y tankirases en ambos compartimentos celulares (**Figura 32B**). Como control positivo de la técnica estudiamos la interacción entre HIF-1 α y el coactivador p300 y detectamos la interacción principalmente en el núcleo, aunque en menor medida también se detectó en el citosol (**Figura 32A**). Como controles negativos llevamos a cabo la incubación de ambos anticuerpos por separado con las dos sondas de ligación y también ambos anticuerpos juntos, pero sólo con una de las sondas de ligación. En estos casos sólo obtuvimos 1 o 2 puntos aislados, por lo que se corroboró la especificidad de la técnica (**Figura 32A**). Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto que ambas proteínas interaccionan tanto en normoxia como en hipoxia y en los compartimentos citosólico y nuclear. Aunque la articulación y la dinámica de este complejo entre normoxia e hipoxia no la hemos podido determinar, indicaría un mecanismo nuevo de regulación en el que deben estar implicados nuevos factores que debemos definir en el futuro.

RESULTADOS

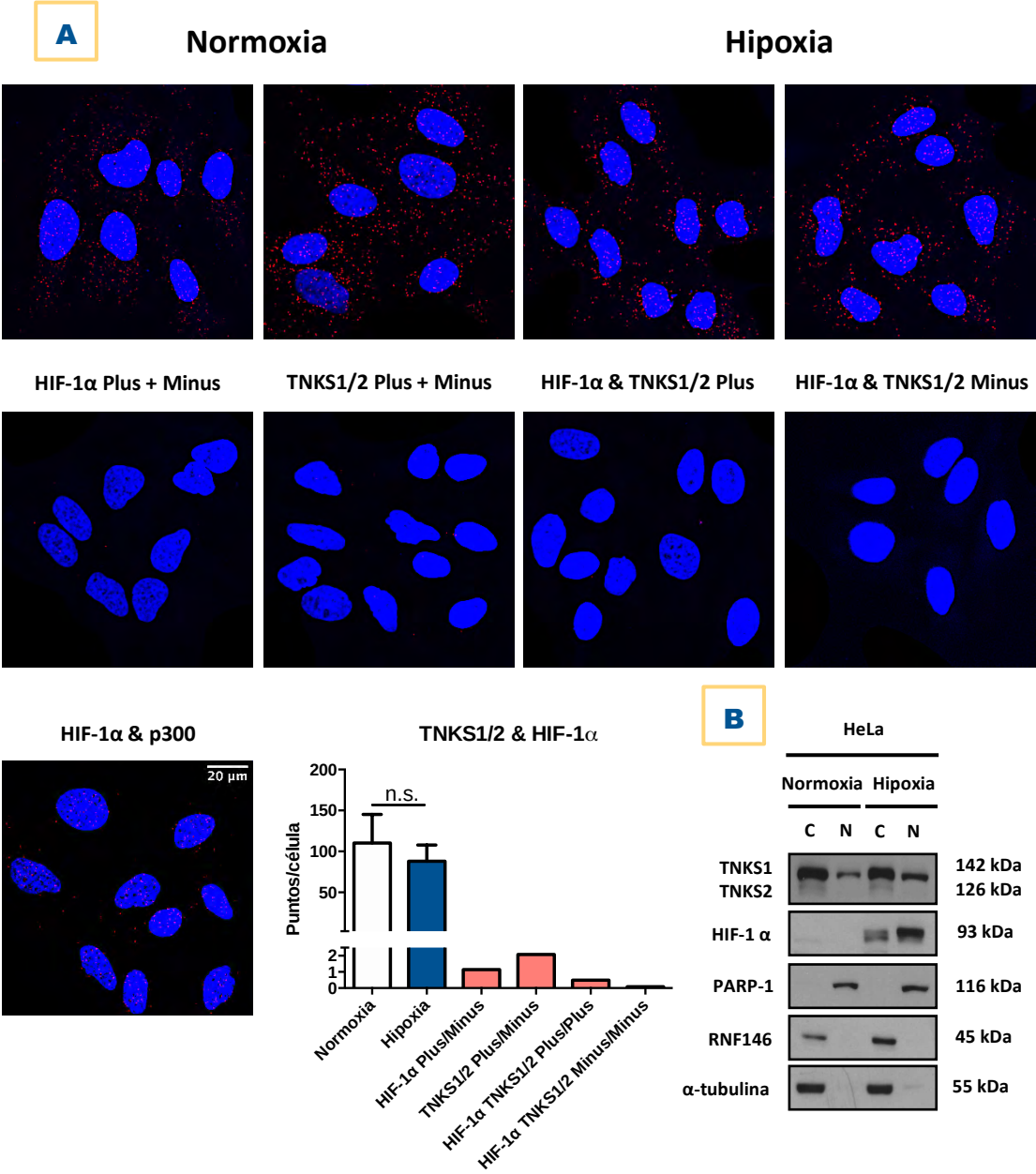


Figura 32. Ensayo de ligación por proximidad entre tankirasas y HIF-1α. **A.** Imágenes de microscopía confocal representativas del ensayo de ligación por proximidad entre TNKS1/2 y HIF-1α en condiciones de normoxia e hipoxia (4 horas al 1% O₂) en la línea HeLa. La cuantificación se expresa como la media de puntos pertenecientes a 100 células en 3 experimentos independientes (±SEM). Como control positivo se llevó a cabo el ensayo de ligación por proximidad entre HIF-1α y p300 y como controles negativos la incubación con ambos anticuerpos por separado y juntos con una de las sondas. La barra de escala corresponde a 20 μm. **B.** Subfraccionamiento citosol-núcleo para analizar la distribución de tankirasa y HIF-1α. Como controles del subfraccionamiento se usaron las proteínas α-tubulina para el citosol y PARP-1 para el núcleo. C: citosol; N: núcleo.

4.6. Ambas tankirasas contribuyen a mantener la estabilidad y actividad de HIF-1 α

Los resultados mostrados con anterioridad indicaban que las tankirasas podrían estar modulando al factor HIF-1 α durante hipoxia. Ambas tankirasas tienen en común la mayoría de sus funciones y sustratos, de manera que la falta de una de ellas podría ser compensada por la otra. No obstante, también se han descrito algunas funciones que requieren de la presencia de ambas tankirasas. Por lo tanto, nos propusimos descifrar si en el efecto observado sobre la estabilidad y actividad de HIF-1 α intervenían ambas tankirasas o si era dependiente exclusivamente de una de las dos. Para ello llevamos a cabo el silenciamiento génico transitorio de cada tankirasa en normoxia e hipoxia en dos líneas celulares (HeLa y LN229) y lo comparamos con el doble silenciamiento. Los niveles de proteína de TNKS1/2, indicaron que tanto el silenciamiento individual como el doble se había llevado a cabo correctamente (**Figura 33**). En cuanto a los niveles de expresión de HIF-1 α , los resultados mostraron la acumulación de HIF-1 α en la condición SCR durante hipoxia, aunque tras los silenciamientos detectamos diferencias entre las dos líneas celulares. En la línea celular HeLa se pudo apreciar cómo el silenciamiento individual de TNKS1 provocó una disminución en los niveles de HIF-1 α . Además, el silenciamiento individual de TNKS1 tuvo un impacto algo mayor sobre la estabilidad de HIF-1 α en comparación con el silenciamiento de TNKS2 (10 *folds* de diferencia), con el que también se vio una disminución en los niveles de HIF-1 α (**Figura 33**). Por el contrario, en la línea celular LN229 vimos el mismo efecto sobre HIF-1 α tras el silenciamiento individual de TNKS1 y TNKS2, que se correspondía con un efecto algo más leve que tras el silenciamiento individual en la línea HeLa. No obstante, tras el doble silenciamiento se observó una mayor caída de los niveles de HIF-1 α en ambas líneas celulares (**Figura 33**).

RESULTADOS

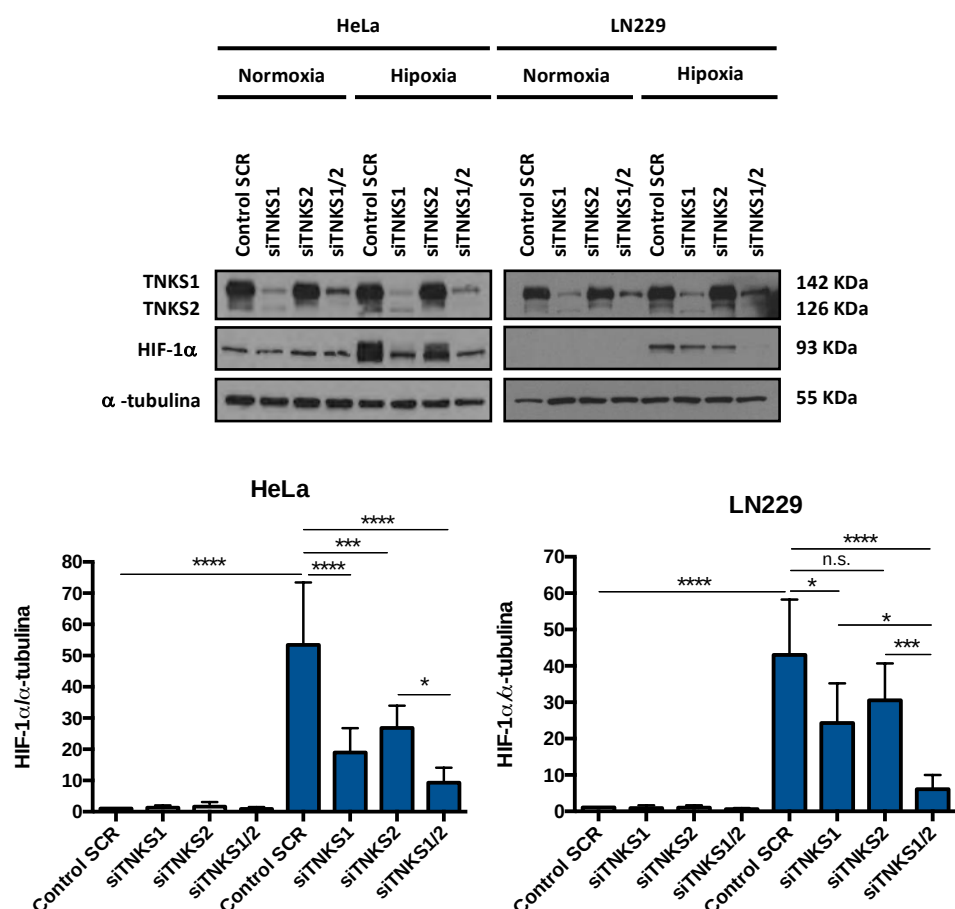


Figura 33. Efecto del silenciamiento individual de TNKS1 y TNKS2 en hipoxia. Análisis por *western blot* de la estabilidad de HIF-1α y los niveles de TNKS1/2 tras realizar el silenciamiento génico transitorio durante 48 horas en condiciones de normoxia e hipoxia (4 horas al 1% O₂) en las líneas tumorales HeLa y LN229. Para normalizar los resultados se utilizó la proteína α-tubulina. Los valores de la cuantificación corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes (±SEM).

La actividad de HIF-1α como factor de transcripción fue analizada nuevamente a través de la expresión de sus genes dependientes por RT-qPCR en la línea HeLa. Los genes elegidos fueron aquellos que tras el análisis del *array* de hipoxia habíamos concluido que su expresión había sido modificada por tankirasas a través de HIF-1α (*CA9*, *HK2*, *PDK1*, *PFKFB3*, *PFKFB4* y *BNIP3*). Todos ellos incrementaron sus niveles de expresión tras la exposición a hipoxia, aunque observamos un efecto diferente en función de que la expresión de tankirasa hubiera sido silenciada transitoriamente de forma individual para TNKS1 y TNKS2 o general para ambas proteínas (**Figura 34**). Por un lado, en el caso de los genes *CA9*, *PFKFB3* y *PFKFB4* (glicólisis) observamos

prácticamente el mismo efecto de disminución de la expresión tras el silenciamiento individual de TNKS1 y el doble silenciamiento. En el caso de *PFKFB3* y *PFKFB4* su expresión también se vio afectada tras el silenciamiento de TNKS2, aunque en menor medida que con el silenciamiento de TNKS1 (**Figura 34**). En el caso de HK2 (glucólisis), se observó la misma caída en su expresión tras el silenciamiento individual de TNKS1 y de TNKS2, siendo el doble silenciamiento el que provocó una mayor disminución (**Figura 34**). Por último, la expresión de los genes *PDK1* (glucólisis) y *BNIP3* (mitofagia) cayó de la misma forma al realizar tanto el silenciamiento individual como el doble silenciamiento de tankirasa (**Figura 34**). Con estos resultados concluimos que el silenciamiento individual de las tankirasa tuvo un efecto sobre la expresión de los genes mediados por HIF-1 α , aunque nuevamente el mayor efecto a nivel de todos los genes analizados se detectó tras el doble silenciamiento de TNKS1/2.

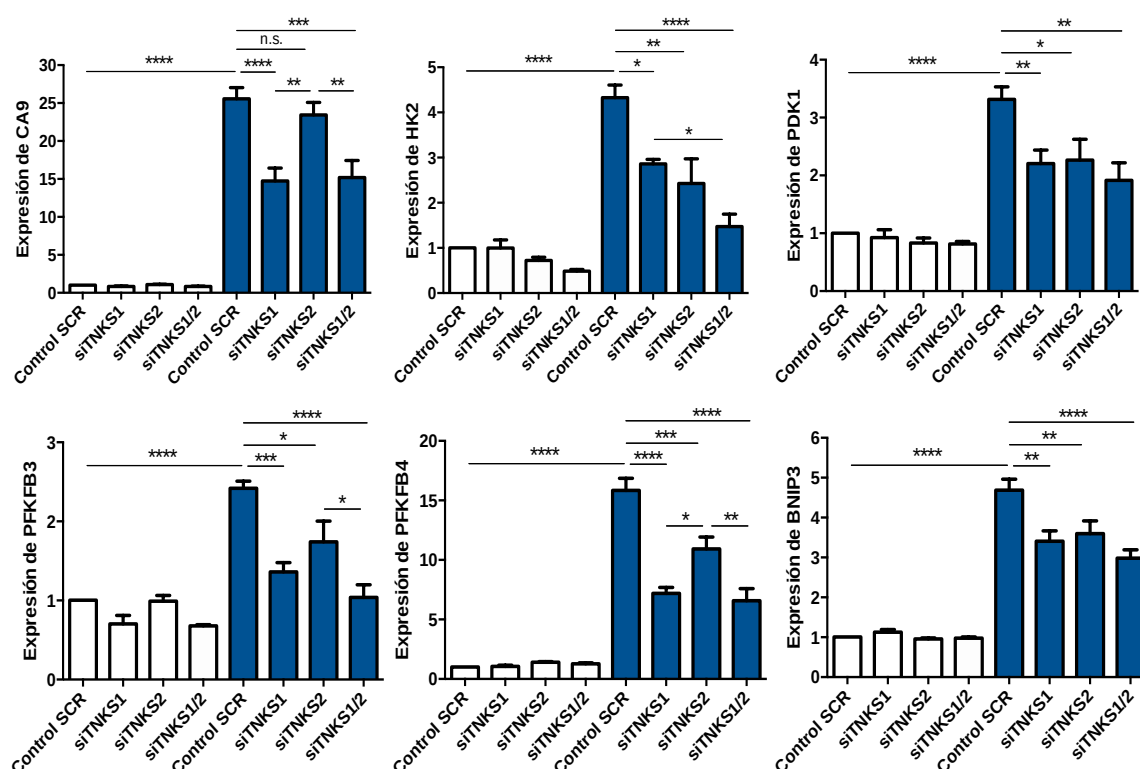


Figura 34. Efecto del silenciamiento individual de tankirasa sobre los genes dependientes de HIF-1 α .

Análisis de la expresión del ARNm de CA9, HK2, PDK1, PFKFB3, PFKFB4 y BNIP3 por RT-qPCR, tras el silenciamiento individual de TNKS1 y TNKS2 durante 48 horas en normoxia e hipoxia (4 horas al 1% de O₂) en la línea celular HeLa. Para normalizar los resultados se utilizó el gen *36B4*. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ($\pm$ SEM).

RESULTADOS

Tras comprobar el efecto del silenciamiento transitorio de tankirasa tanto a nivel de la estabilidad de HIF-1 α como de su actividad, pusimos en marcha la generación de una línea HeLa *knockout* (KO) para ambas tankirasas mediante la tecnología de *CRISPR-Cas9*. Lo ideal habría sido generar directamente el doble KO para TNKS1/2, pero a pesar de ser proteínas homólogas, cada tankirasa tiene su propio gen en distintos cromosomas y eso dificultó la generación del KO, ya que no se pudo utilizar un único ARNg para las dos tankirasas. Es por ello por lo que la obtención del doble KO tendría que ser secuencial, es decir, primero obtener un KO para TNKS1 y posteriormente sobre esa línea KO para TNKS1 obtener el KO para TNKS2. Una primera línea KO para TNKS1 fue generada en la línea HeLa utilizando una secuencia guía frente al exón 1 del gen de *TNKS* [306]. El ARNg se introdujo en el vector lentiviral *pL-CRISPR-EFS.GFP* con la maquinaria necesaria para que la nucleasa Cas9 funcionase y se generaron partículas lentivirales en la línea HEK-293T con las que se transdujo la línea HeLa. El plásmido también contenía la secuencia de la proteína GFP por lo que, tras obtener una remesa de células, fueron seleccionadas por citometría *Sorter* aquellas células que expresasen la proteína GFP, pues serían en principio las que habrían sido infectadas por las partículas lentivirales y en las que se habría producido la eliminación de TNKS1. La selección de clones se realizó en placas 96 pocillos siguiendo el método de sembrado de una célula por pocillo y aquellos clones que crecieron, se expandieron en placas de mayor diámetro con el fin de poder seleccionar un número significativo de clones candidatos a ser KOs de TNKS1. Se obtuvieron un total de 8 clones cuya presencia de TNKS1 fue comprobada por western Blot. Finalmente, dos de ellos fueron considerados KO auténticos para la proteína TNKS1 (clon 1 y clon 2) y uno de ellos se caracterizó como *knockdown* (KD) para TNKS1 (clon 5). Los niveles de TNKS2 no se vieron modificados y se mantuvieron como en la línea *wild-type* (Figura 35A, C).

Previo a continuar con la generación del doble KO de TNKS1/2 realizamos varias pruebas con los clones del KO de TNKS1. Primero llevamos a cabo experimentos en hipoxia para estudiar la estabilidad de HIF-1 α mediante *western blot*. En este caso también cuantificamos los resultados obtenidos y éstos indicaron que los dos clones del KO de TNKS1 tenían unos niveles de HIF-1 α

inferiores a los de la línea control en hipoxia (**Figura 35A**). Para analizar la actividad de HIF-1 α volvimos a medir por RT-qPCR algunos de sus genes dependientes (*CA9*, *HK2*, *PDK1*, *PFKFB3*, *PFKFB4* y *BNIP3*) y ambos clones mostraron una disminución significativa de la expresión de todos los genes analizados (**Figura 35B**). Por lo tanto, en ambos clones del KO de TNKS1 también estaban comprometidos tanto la estabilidad como la actividad de HIF-1 α , confirmando así los resultados obtenidos tras el silenciamiento génico transitorio con *siRNAs*.

Además, medimos los niveles de ARNm de TNKS1 y TNKS2 de los dos clones, apreciando una caída significativa del 90% en los niveles de TNKS1, mientras que no hubo cambios significativos en los niveles de TNKS2 (**Figura 35B**). Por último, en el caso del clon 5 *knockdown* para TNKS1 sólo analizamos los niveles de HIF-1 α por *western blot* y vimos que los niveles de expresión de éste también eran inferiores al compararlos con los de la línea *wild-type* (**Figura 35C**).

Una vez realizadas las comprobaciones, nos dispusimos a realizar el doble KO partiendo de los clones del KO de TNKS1. Sin embargo, los clones KO empezaron a dar problemas, pues crecían a un ritmo muy lento en comparación al tiempo de crecimiento de la línea *wild-type* y además se dividían de manera aberrante, dando lugar a sincitios con múltiples núcleos. Todo ello dificultó seguir y nos llevó a abandonar el proceso de obtención del doble KO de TNKS1/2. No obstante, consideramos de gran utilidad los resultados obtenidos en los clones de la línea KO para TNKS1, ya que van en consonancia con los obtenidos tras el silenciamiento génico transitorio en cuanto al efecto de la pérdida de tankirasa sobre la estabilidad y actividad del factor HIF-1 α .

RESULTADOS

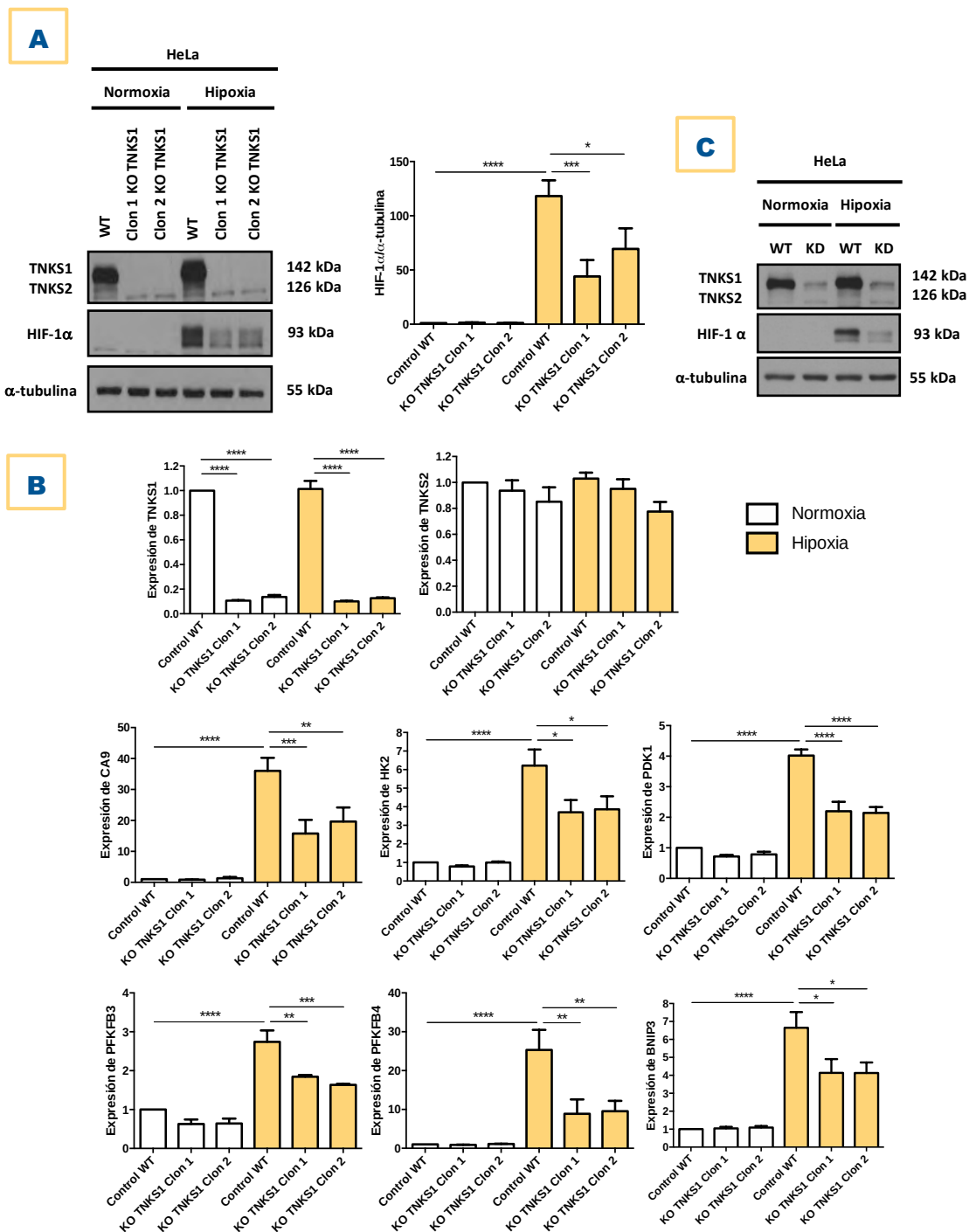


Figura 35. Generación de una línea *knockout* y *knockdown* para TNKS1. **A.** Análisis mediante *western blot* de los niveles de HIF-1 α y TNKS1/2 en los clones del KO de TNKS1 en normoxia e hipoxia (4 horas al 1% O₂). **B.** Análisis de la expresión del ARNm de CA9, HK2, PDK1, PFKFB3, PFKFB4 y BNIP3 por RT-qPCR en los clones del KO de TNKS1 en normoxia e hipoxia. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ($\pm$ SEM). **C.** Análisis mediante *western blot* de los niveles de HIF-1 α y TNKS1/2 en el KD de TNKS1 en normoxia e hipoxia. KO: *knockout*; KD: *knockdown*; WT: *wild-type*. Los resultados de RT-qPCR se normalizaron respecto al gen 36B4 y los de *western blot* respecto a la proteína α -tubulina.

4.7. Tankirasas regulan la transcripción del factor HIF-1 α

Para descifrar el mecanismo molecular por el cual las tankirasas modulan la expresión y estabilidad de HIF-1 α durante hipoxia, decidimos abordar este objetivo desde diferentes puntos de vista. A nivel de estabilidad de proteína, estudiamos la influencia de TNKS1/2 sobre el mecanismo de degradación y la síntesis de HIF-1 α durante hipoxia. Uno de los principales mecanismos descritos de las tankirasas a nivel de regulación proteica es la modificación postraducciona de proteínas dianas para su posterior degradación vía proteasoma. Tankirasa puede reconocer gran cantidad de proteínas a través de la interacción entre el dominio ankirina y el motivo de unión a tankirasa (TBM) presente en los sustratos (**Tabla 3**). Tras su reconocimiento, tankirasa sintetiza una cadena de PAR lineal que permite a la ubiquitina E3 ligasa RNF146 reconocer a los sustratos PARilados, los cuales serán modificados por cadenas de ubiquitina unidas entre sí por el residuo de lisina 48, para su posterior degradación en el proteasoma. Es por ello por lo que nos preguntamos si de algún modo la pérdida de TNKS1/2 estaba incrementando el ritmo de degradación de HIF-1 α en condiciones normales de O₂ o durante la carencia del mismo. Como la proteína RNF146 está muy involucrada en este mecanismo, estudiamos el efecto de su pérdida sobre los niveles de HIF-1 α mediante el silenciamiento génico transitorio de RNF146 en condiciones de normoxia e hipoxia en la línea celular HeLa. Para comprobar que el silenciamiento se había producido correctamente medimos los niveles de RNF146 y TNKS1/2 por *western blot*. Los niveles de RNF146 disminuyeron mientras que ambas tankirasas se acumularon como consecuencia de la pérdida de RNF146, lo cual impedía su degradación. Sin embargo, tras el silenciamiento de RNF146 los niveles de HIF-1 α no mostraron ningún cambio respecto a los niveles del control SCR en hipoxia, por lo que todo parecía indicar que RNF146 no estaba involucrada en el mecanismo (**Figura 36A**). Aún así seguimos analizando la vía proteasomal a través del uso de MG132, un inhibidor de la degradación proteasomal. Para ello realizamos el silenciamiento génico transitorio de TNKS1 en condiciones de normoxia e hipoxia en presencia y ausencia del inhibidor MG132. Primero llevamos a cabo el silenciamiento de TNKS1 y posteriormente se añadió el

RESULTADOS

inhibidor de la degradación proteasomal, dejándolo actuar durante 8 horas, de las cuales las 4 últimas fueron en hipoxia. Los resultados obtenidos por *western blot* indicaron que el silenciamiento se había llevado a cabo correctamente. Como control de la inhibición del proteasoma por MG132, se midieron los niveles de ubiquitinas unidas a la lisina 48 y detectamos un acúmulo de estas (**Figura 36B**). En cuanto a los niveles de HIF-1 α , pudimos observar un acúmulo durante hipoxia, disminuyendo tras el silenciamiento de TNKS1. El uso del MG132 condujo a una mayor acumulación en el control SCR durante hipoxia e incluso a detectar la presencia del factor de transcripción en normoxia. Sin embargo, la caída en los niveles de HIF-1 α no se vio afectada en la condición del silenciamiento para TNKS1, descartando que la ausencia de TNKS1 pueda inducir un mayor degradación proteasomal de HIF-1 α durante hipoxia (**Figura 36B**).

Existen otras vías alternativas de degradación y reciclaje de proteínas en la célula, caso de la ruta de autofagia. Está descrito que las tankirasas guardan relación estrecha con tipos específicos de autofagia, caso de la pexofagia [307]. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue estudiar la posible degradación autofago-lisosomal de HIF-1 α mediadas por la acción de TNKS1, en condiciones de normoxia e hipoxia. Para evaluar el flujo de autofagosomas inducido por la ausencia de TNKS1 durante hipoxia, las células fueron tratadas con el inhibidor Cloroquina (CQ). Este inhibidor impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma, por lo que bloquea la degradación a través de esta vía. Para comprobar que la inhibición se había llevado correctamente, medimos los niveles de LC3 (I y II), ya que el acúmulo de LC3 II es indicador de la retención de los autofagosomas que no se han podido fusionar con los lisosomas. Así pues, al observar el aumento de los niveles de LC3 II tras el uso de cloroquina en normoxia e hipoxia, confirmamos que la inhibición de la ruta se había llevado a cabo correctamente. TNKS1/2 fue silenciada correctamente por lo que se analizó la influencia de la ruta de autofagia en nuestro modelo. Los niveles de HIF-1 α no se vieron afectados al inhibir esta vía, lo cual parecía apuntar a que tampoco participaba en el mecanismo (**Figura 36C**).

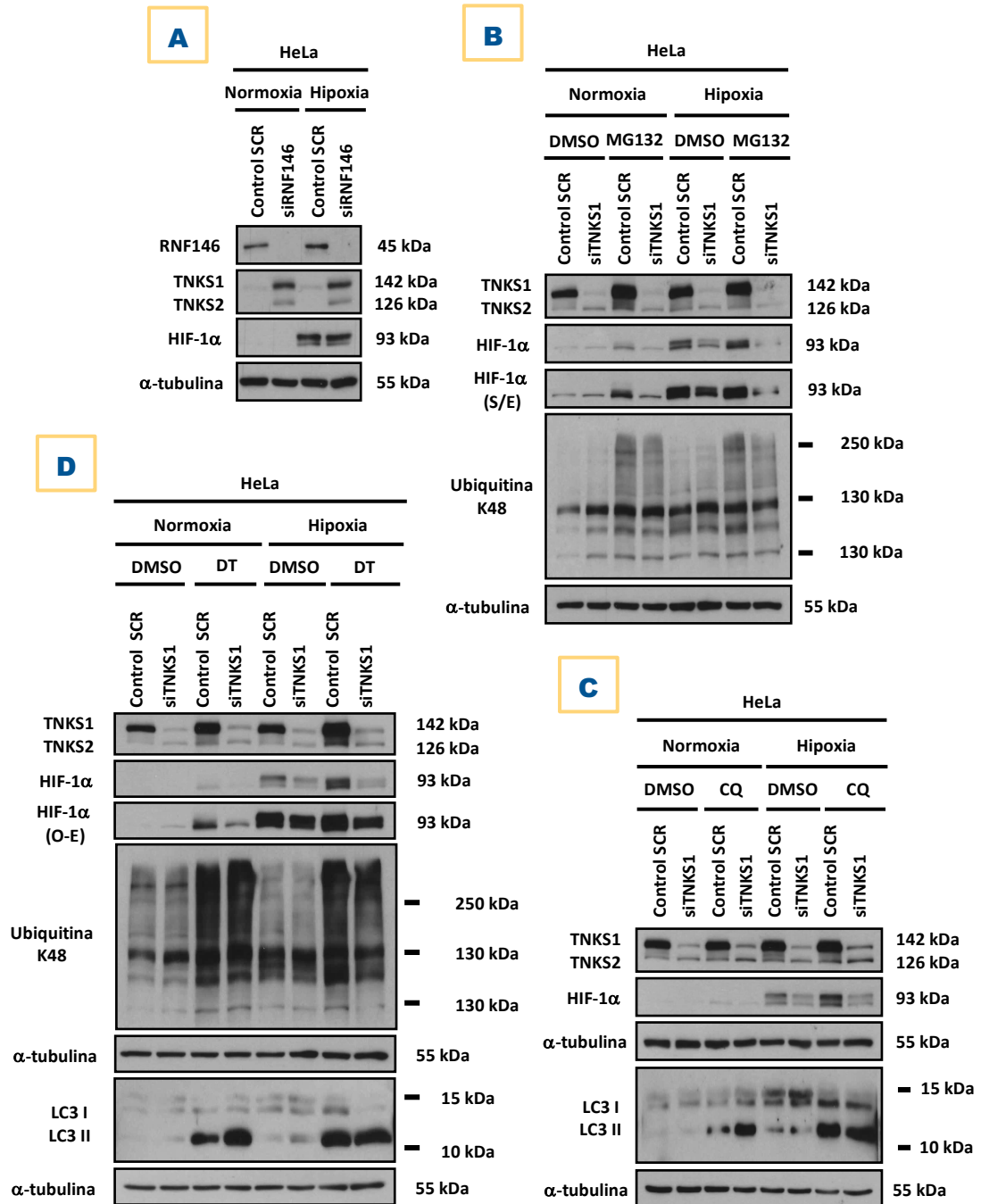


Figura 36. El silenciamiento de tankirasa no afecta a la degradación de HIF-1 α durante hipoxia. A.

Análisis por *western blot* de la estabilidad de HIF-1 α y los niveles de TNKS1/2 y RNF146 tras realizar el silenciamiento génico transitorio durante 48 horas de RNF146 en condiciones de normoxia e hipoxia (4 horas al 1% O₂). **B, C, D.** Análisis por *western blot* de la estabilidad de HIF-1 α y los niveles de TNKS1/2 al realizar el silenciamiento génico transitorio durante 48 horas de TNKS1 en condiciones de normoxia e hipoxia tras la inhibición de la ruta de degradación proteasomal con MG132 a 20 μ M durante 8 horas (**B**), autofago-lisosomal con cloroquina a 50 μ M durante 4 horas (**C**) y de ambas rutas (**D**). CQ: cloroquina; DT: doble tratamiento.

RESULTADOS

Por último, utilizamos los inhibidores de la ruta del proteasoma y la vía autofago-lisosomal de manera secuencial para descartar que la célula estuviese llevando a cabo algún mecanismo de adaptación y/o escape al bloqueo del proteasoma a través de la autofagia. De esta manera, primero se bloqueó el proteasoma y posteriormente la ruta autofago-lisosomal. La acumulación de los niveles de ubiquitinas unidas por la lisina 48 y LC3 II demostraron que se había producido la inhibición de las dos vías de degradación, pero la caída a nivel de proteína de HIF-1 α persistió, por lo que los resultados de este bloque apuntaron a que tankirasas no regulan HIF-1 α a través de estas rutas de degradación (**Figura 36D**).

Para analizar si la síntesis de HIF-1 α era el fenómeno alterado en situación de silenciamiento de TNKS1/2, decidimos estudiar de acuerdo a la literatura existente, la asociación del ARNm de HIF-1 α con los polisomas. Los ribosomas en el interior de la célula pueden encontrarse de manera aislada, es decir, en forma de monosomas (40S, 60S y 80S) o asociados entre sí formando lo que se conoce como polisomas. Los polisomas a su vez se dividen en polisomas de bajo peso molecular y polisomas de alto peso molecular. La idea de analizar el perfil de los polisomas se basa en la descripción de que un ARNm unido a polisomas de alto peso molecular tiene una mayor tasa de traducción y por lo tanto hay una mayor velocidad de síntesis de la proteína que codifica en comparación con un ARNm asociado a polisomas de bajo peso molecular.

Para llevar a cabo esta nueva batería de experimentos, silenciamos la expresión de ambas tankirasas en células HeLa en condiciones de hipoxia y analizamos el perfil del mensajero de HIF-1 α comparándolo con la condición control para ver si había alguna variación significativa. El lisado de cada muestra fue sometida a un protocolo de ultracentrifugación a través de un gradiente de sacarosa para obtener las distintas fracciones correspondientes a los monosomas y a los polisomas. El protocolo que seguimos para llevar a cabo esta técnica empleaba una máquina que era capaz de separar las fracciones a la vez que analizaba el perfil global de los ribosomas de la muestra a una longitud de onda de 260 nm. Como nosotros no tuvimos acceso a una máquina de

este tipo, tuvimos que emplear un sistema de recolección de fracciones manual para obtener 12 fracciones. Una vez que se obtuvieron, se analizó el perfil de los ribosomas analizando cada fracción en el nanodrop a 260 nm. El perfil de distribución del ARN total obtenido para nuestras muestras tenía diferencias con el perfil esperado, dada la variación que tuvimos que hacer en el método de obtención de las fracciones. Aún así el perfil del ARN a 260 nm tanto de las fracciones de la muestra control como de las fracciones de la muestra silenciada fueron muy similares, correspondiéndose las fracciones 1 y 2 con los monosomas y el resto (7-12) con los polisomas (**Figura 37A**). Una vez obtenidas las fracciones, se extrajo el ARN de cada una de ellas y se realizó la retrotranscripción para finalmente medir por RT-qPCR el porcentaje de cDNA correspondiente al ARNm de interés en cada fracción. En cuanto a los resultados, además de HIF-1 α analizamos el ARNm de 36B4 como control, ya que su perfil debería ser el mismo en ambas condiciones. Como era de esperar, el perfil de distribución de 36B4 en ambas condiciones fue prácticamente el mismo, detectando un primer pico en la fracción 3 y otro pico en la fracción 7, correspondientes a polisomas (**Figura 37B**). El perfil de distribución de HIF-1 α en la muestra en la que se silenció TNKS1/2 tampoco sufrió variaciones significativas respecto a la muestra control, detectándose la máxima asociación del mensajero entre las fracciones 9-11 para ambas muestras (**Figura 37B**). Por lo tanto, este resultado confirmó que la pérdida de tankirasa no estaba afectando a la síntesis de HIF-1 α .

Todos los ensayos anteriores demuestran que las tankirasas no modularían la estabilidad del factor HIF-1 α ni a través de su síntesis ni su propia degradación o reciclaje. El siguiente paso a seguir fue intentar descifrar si el mecanismo de regulación estaba localizado a nivel de estabilidad del mensajero en condiciones de hipoxia al 1% O₂.

RESULTADOS

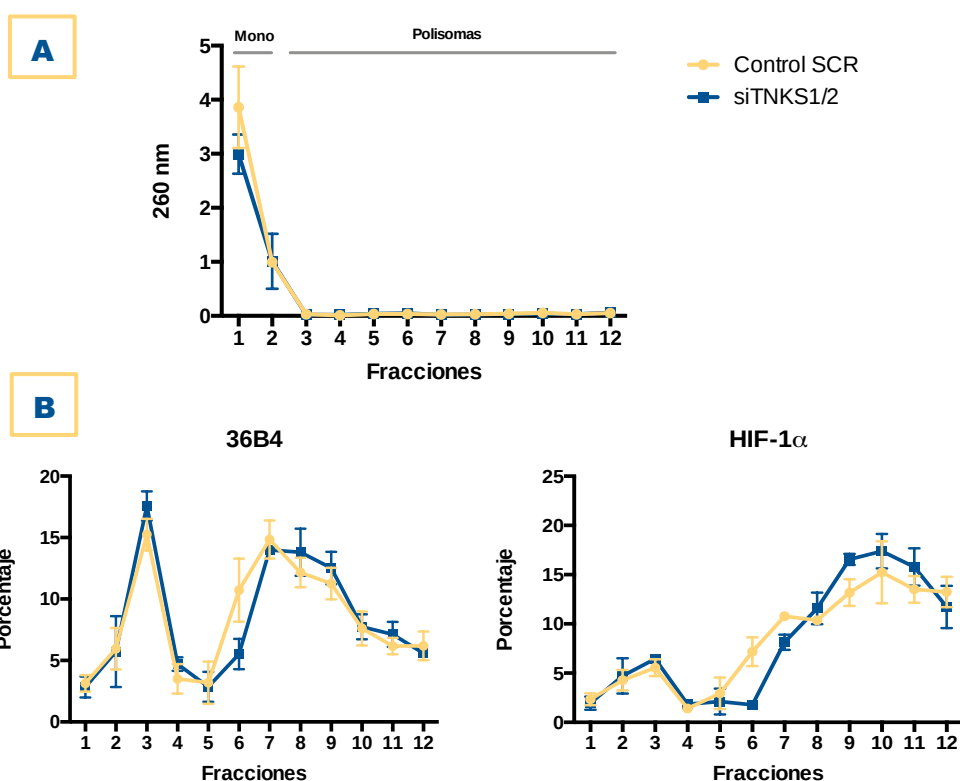


Figura 37. El silenciamiento de tankirasa no afecta a la síntesis de HIF-1α. **A.** Análisis del perfil global de ribosomas al medir cada una de las fracciones en el *nanodrop* a una longitud de onda de 260 nm. **B.** Análisis de la distribución del ARNm de 36B4 y HIF-1α en cada una de las 12 fracciones obtenidas tras el fraccionamiento de polisomas. Las muestras que se comparan se corresponden al Control SCR y al silenciamiento génico transitorio de TNKS1/2 en condiciones de hipoxia (4 horas al 1% O₂). Los valores corresponden a la media de 3 experimentos independientes (±SEM).

Para ello se pusieron a punto ensayos de vida media de mensajero para nuestras condiciones de estudio en la línea celular HeLa. Para poder medir la vida media del ARNm tuvimos que tratar las células con actinomicina D, fármaco que nos permite inhibir la transcripción a través de la unión al complejo de iniciación de la transcripción, inhibiendo así la elongación mediada por las ARN polimerasas. Sin embargo, la principal línea usada en esta tesis doctoral, HeLa, mostró una alta sensibilidad al tratamiento con actinomicina D, induciendo muerte celular apoptótica tras 8 horas de tratamiento. Es por ello por lo que tuvimos que realizar este experimento en la línea celular LN229. Tras 48 horas de haber realizado el silenciamiento génico de TNKS1/2 tratamos las células

LN229 con actinomicina D (5 $\mu\text{g/mL}$) y sometimos a hipoxia, recogiendo muestras para extraer ARN total a distintos tiempos de tratamiento (0h, 4h, 8h y 24h). Los resultados obtenidos por RT-qPCR no mostraron ningún cambio significativo en la vida media del ARNm de HIF-1 α tras el silenciamiento de tankirasa con respecto al control SCR de hipoxia (**Figura 38**).

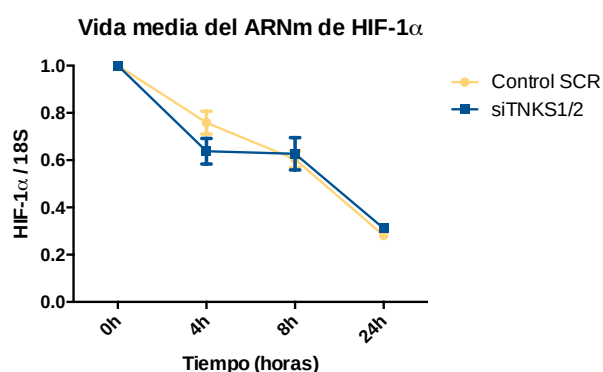


Figura 38. El silenciamiento de tankirasa no afecta a la vida media del ARNm de HIF-1 α . Análisis de la vida media del ARNm de HIF-1 α por RT-qPCR en la línea LN229 tras el silenciamiento génico transitorio de TNKS1/2 y el tratamiento con actinomicina D 5 $\mu\text{g/mL}$ durante 0h, 4h, 8h y 24h en condiciones de hipoxia (1% O₂). Para normalizar los resultados se utilizó el gen 18S. Los valores corresponden a la media de 3 experimentos independientes ($\pm$ SEM).

Este resultado, aunque negativo, ayudó a descartar otra de nuestras hipótesis sobre cómo tankirasa puede estar modulando los niveles de HIF-1 α . Hasta el momento habíamos estudiado distintas opciones sobre cómo la pérdida de tankirasa podría estar afectando a HIF-1 α a nivel de proteína y ARN, pues habíamos analizado la síntesis y degradación de la proteína y la vida media del ARNm. Lo que aún nos faltaba por analizar era si estaba ocurriendo algo a nivel del gen de HIF-1 α , por lo que decidimos estudiar la transcripción analizando los niveles del mensajero por RT-qPCR. Para ello simplemente realizamos el silenciamiento de ambas tankirasas en normoxia e hipoxia en las líneas HeLa y LN229 y los resultados mostraron una caída en los niveles de ARNm de HIF-1 α de entorno a un 40-50% tanto en normoxia como en hipoxia en ambas líneas celulares (**Figura 39A**). Como prueba de que este efecto era causado exclusivamente por la pérdida de TNKS1/2 también medimos los niveles de HIF-1 α tras la inhibición de tankirasa con XAV939 y

RESULTADOS

G007-LK, pero en este caso no obtuvimos ninguna modificación significativa de los niveles de ARNm (**Figura 39B**). Por lo tanto, este bloque de resultados parece indicar que el efecto que hemos observado tras la pérdida de tankirasa sobre los niveles proteína de HIF-1 α así como su actividad como factor de transcripción es debido a la disminución de la transcripción del factor.

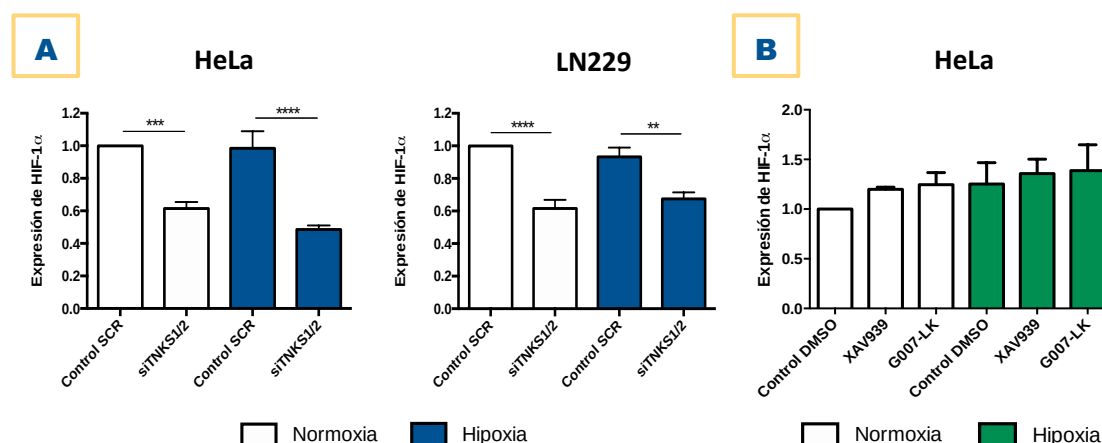


Figura 39. El silenciamiento de tankirasa, pero no su inhibición catalítica altera la transcripción de HIF-1 α . A, B. Análisis del ARNm de HIF-1 α por RT-qPCR tras el silenciamiento génico transitorio de TNKS1/2 durante 48 horas en las líneas celulares HeLa y LN229 (A) y tras la inhibición catalítica de tankirasa con XAV939 10 μ M y G007-LK 5 μ M durante 24 horas en condiciones de normoxia e hipoxia (4 horas al 1% O₂). Para normalizar los resultados se utilizó el gen *36B4*. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ($\pm$ SEM).

4.8. Papel de la inhibición no catalítica de tankirasa

Uno de los resultados más intrigantes e interesantes obtenidos en este estudio es la diferencia obtenida entre la inhibición y el silenciamiento de tankirasa sobre la estabilidad de HIF-1 α . Los inhibidores que habíamos empleado hasta el momento son inhibidores de la actividad catalítica de tankirasa, ya que actúan uniéndose al dominio catalítico PARP impidiendo que tankirasa pueda llevar a cabo la PARilación de diversos sustratos celulares. Como consecuencia de dicha inhibición se produce una acumulación de ambas tankirasa, pues como se ha explicado previamente, tankirasa regula su propia degradación. Tankirasa se autoPARila para luego ser reconocida por RNF146, quien finalmente marca a tankirasa para su degradación vía proteasomal. Por lo tanto,

pensamos que la diferencia de resultados podría deberse a que mientras que, tras el uso de los inhibidores, los niveles de tankirasa aumentan, al realizar el silenciamiento los niveles de tankirasa disminuyen. Esto podría estar relacionado con un aspecto que está cobrando auge como es el papel que puede jugar tankirasa independientemente de su actividad catalítica. Existen numerosos artículos que describen que las tankirasas pueden ejercer una función que no está relacionada con su actividad poli ADP-ribosa polimerasa, sino que más bien sería una función que recae en su dominio de interacción con los sustratos, el dominio ankirina [294,307]. Para este tipo de función, recurrir a la inhibición catalítica sería contraproducente, pues habría un aumento en los niveles de tankirasa y con ello se favorecería dicha actividad. De esta manera, varios grupos han comenzado con el desarrollo de inhibidores no catalíticos de tankirasa basándose en la interacción de tankirasa con sus sustratos [353–357]. En este sentido, hemos iniciado una colaboración con un grupo de la Universidad de Cambridge que ha desarrollado unos inhibidores del dominio ankirina de tankirasa basándose en la secuencia de péptidos de unión a tankirasa (TBP) de la proteína 3BP2, uno de los primeros sustratos de tankirasa en el que se descubrió dicha secuencia [298]. La aproximación que siguió el grupo de la Profesora Itzhaki fue unir esa secuencia de péptidos a una estructura consenso formada por repeticiones de tetratricopéptidos (CTPR). Esta secuencia consiste en una repetición en tándem de 34 aminoácidos identificada en una amplia variedad de proteínas y resulta ser una estructura muy estable. En este estudio han comprobado que el bucle que se forma tras la unión de dos CTPR puede admitir una secuencia de hasta 25 aminoácidos sin alterar la estructura nativa de los CTPR (**Figura 40A**), por lo que llevaron a cabo una puesta a punto donde probaron distintas combinaciones de CTPR y TBP (**Figura 40B**). Los resultados mostraron que una de las combinaciones que funcionaba mejor fue la de seis estructuras de CTPR con tres secuencias de TBP (3TBP-CTPR6), pues era capaz de interaccionar con tankirasa y además inhibir la ruta de Wnt/ β -catenina de acuerdo a los resultados obtenidos mediante un ensayo con luciferasa [354].

RESULTADOS

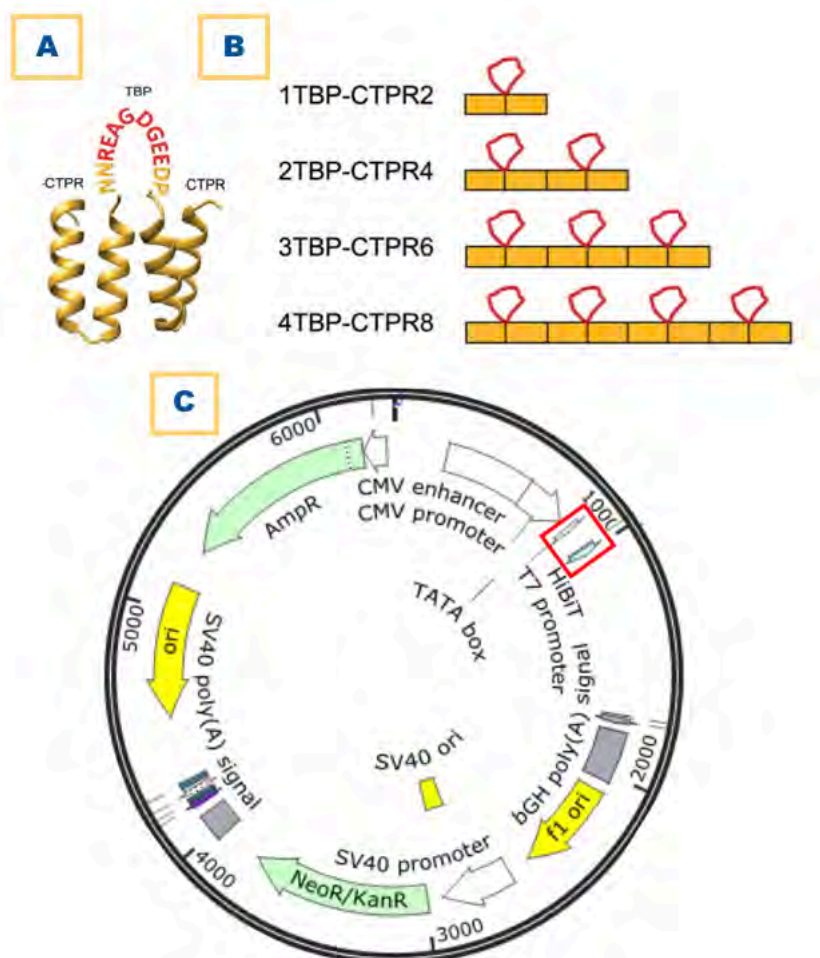


Figura 40. Estructura del inhibidor del dominio ANK de tankirasa. A. Esquema de la asociación del TBP de la proteína 3BP2 en el bucle que se forma tras la unión de dos proteínas CTPR. B. Imagen que contiene las distintas combinaciones de CTPR (amarillo) y TBM (rojo). C. Estructura del plásmido que contenía las secuencia del inhibidor 3TBP-CTPR6, así como los controles CTPR6 y 3RL-CTPR6. Las secuencias se incluyeron en la zona marcada en rojo. Imagen adaptada de Diamante A; 2020 [354].

Nuestro grupo recibió un vector plasmídico que contenía el inhibidor (3TBP-CTPR6) unido a hemaglutinina (HA), así como otros dos que servían como controles, pues uno contenía sólo la estructura del tetraticopéptido (CTPR6) mientras que el otro contenía la estructura del tetraticopéptido unida a una secuencia aleatoria (3RL-CTPR6), ambos unidos también a hemaglutinina (**Figura 40C**). Lo primero que hicimos tras obtener los plásmidos fue poner a punto la cantidad a emplear y el tiempo de incubación con el mismo en la línea celular HeLa. Decidimos elegir 4 cantidades de plásmido (0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg y 2 µg) y 24 y 48 horas de incubación tras la transfección, usando el agente JetPrime. A las 24 horas, pero sobre todo a las 48 detectamos una

gran cantidad de muerte celular en las condiciones que habían sido transfectadas con las cantidades más altas de plásmido. Para analizar los resultados, añadimos una condición de inhibición con G007-LK y su control con DMSO y medimos por *western blot* los niveles de TNKS1/2, RNF146, axina 1 y HA. Esta última para corroborar que la transfección se había producido y que los péptidos se habían sintetizado. Los niveles de 3TBP-CTPR6 en la célula fueron altos en todas las dosis y no se produjo un acúmulo de ambas tankirasas como sí se produjo al usar G007-LK (**Figura 41**). No obstante, los niveles de RNF146 y axina 1 apenas variaron entre las condiciones que recibieron el inhibidor y las condiciones controles (CTPR6 y 3RL-CTPR6). Lo que esperábamos observar era que ambas proteínas se acumulasen como ocurrió con el G007-LK, pero sólo detectamos un leve acúmulo en las condiciones que recibieron la dosis más pequeña del inhibidor (0,5 µg), tanto a las 24 como a las 48 horas al compararlos con sus respectivos controles (**Figura 41**).

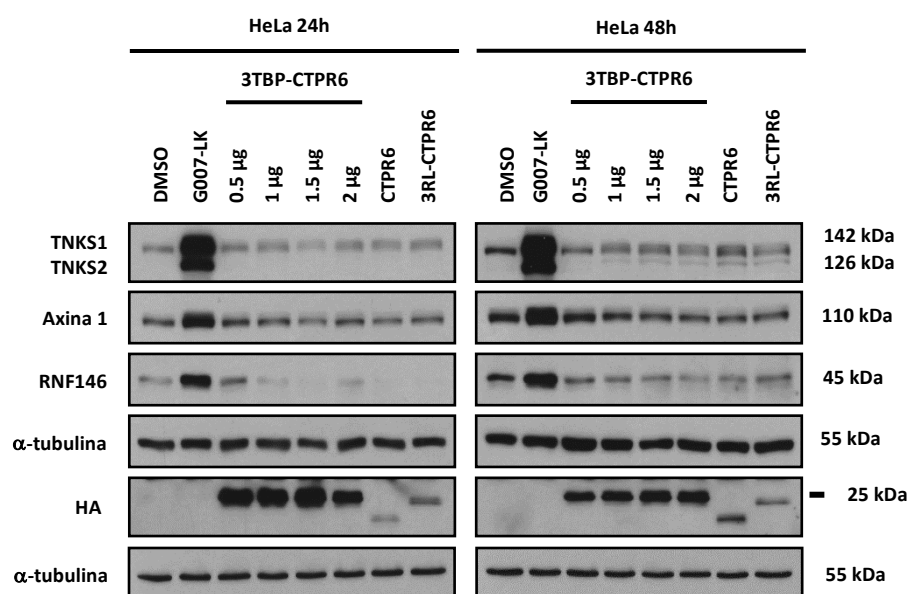


Figura 41. Puesta a punto de la concentración del plásmido 3TBP-CTPR6. Análisis por *western blot* de los niveles de TNKS1/2, axina 1, RNF146 y HA en la línea celular HeLa tras realizar la transfección con distintas cantidades del plásmido de 3TBP-CTPR6 (0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg y 2 µg) durante 24 y 48 horas. Como controles se transfectaron los plásmidos de CTPR6 y 3RL-CTPR6 (2 µg). También se incluyeron muestras del tratamiento con G007-LK 5 µM durante 24 horas y su respectivo control con DMSO. HA: hemaglutinina.

RESULTADOS

Dados los resultados y la toxicidad que provocaban las dosis más altas del plásmido, decidimos quedarnos con la cantidad de plásmido más pequeña que habíamos probado (0,5 µg) para hacer un curso del tiempo para dejar que el inhibidor actuase partiendo desde 4 horas tras el cambio de medio después de la transfección hasta 72 horas. Los resultados obtenidos por *western blot* mostraron que la transfección se había llevado a cabo con mayor éxito durante los tiempos cortos, pues a 48 y 72 horas los niveles de HA eran menores (**Figura 42**). Los niveles de TNKS1/2 no se acumularon al mismo nivel que tras el uso de G007-LK, aunque en las condiciones de 4 y 6 horas sí que hubo algo más de acumulación en comparación con el resto de las condiciones que recibieron el plásmido de 3TB-CTPR6 (**Figura 42**). Los niveles de RNF146 aumentaron, aunque de manera leve, tras la transfección con el plásmido del inhibidor no catalítico si lo comparamos con las dos condiciones control. Los niveles de axina 1 también aumentaron, pero sobre todo en los tiempos más cortos, siendo la de 4 y 6 horas la condición donde más se acumuló (**Figura 42**).

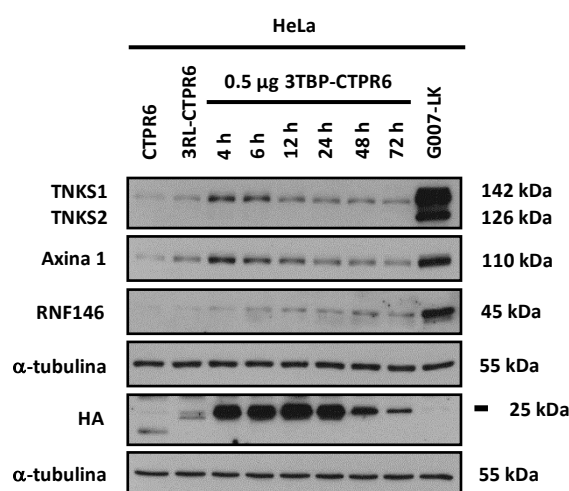


Figura 42. Puesta a punto del péptido 3TBP-CTPR6 sobre los niveles de TNKS1/2 a distintos tiempos.

Análisis por *western blot* de los niveles de TNKS1/2, axina 1, RNF146 y HA en la línea celular HeLa tras realizar la transfección con el plásmido de 3TBP-CTPR6 (0,5 µg) durante distintos tiempos (4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h). Como controles se transfectaron los plásmidos de CTPR6 y 3RL-CTPR6 (2 µg). También se incluyó una muestra del tratamiento con G007-LK 5 µM durante 24 horas. HA: hemaglutinina.

Entonces nos basamos en los resultados de RNF146 y axina 1 para elegir un tiempo corto de incubación con la cantidad de plásmido que ya habíamos elegido previamente (0,5 µg) para llevar

a cabo una prueba en condiciones de hipoxia. Tras la transfección del plásmido dejamos 4 y 6 horas para que el inhibidor actuase, de las cuales 4 horas fueron en hipoxia. Al analizar los resultados por *western blot* observamos que los péptidos se expresaban en nuestras células y que esta vez no había un acúmulo de TNKS1/2 en las condiciones con el plásmido de 3TBP-CTPR6 (**Figura 43**). En esta ocasión, además de medir los niveles de RNF146 y axina 1, tuvimos en cuenta los niveles de β -catenina activa. Esta forma de la proteína β -catenina no está fosforilada para su degradación, manteniendo su actividad. Los niveles de axina 1, β -catenina activa y RNF146 esta vez no variaron respecto a las condiciones transfectadas con los plásmidos controles mientras que en la condición con G007-LK sí que cambiaron respecto al control con DMSO (**Figura 43**). Finalmente, los niveles de HIF-1 α tampoco disminuyeron, sino que parece incluso que aumentaron con el uso de este inhibidor no catalítico (**Figura 43**), por lo que descartamos su uso para posteriores experimentos hasta confirmar que realmente estuvieran llevando a cabo su función de inhibir el dominio ANK de tankirasa.

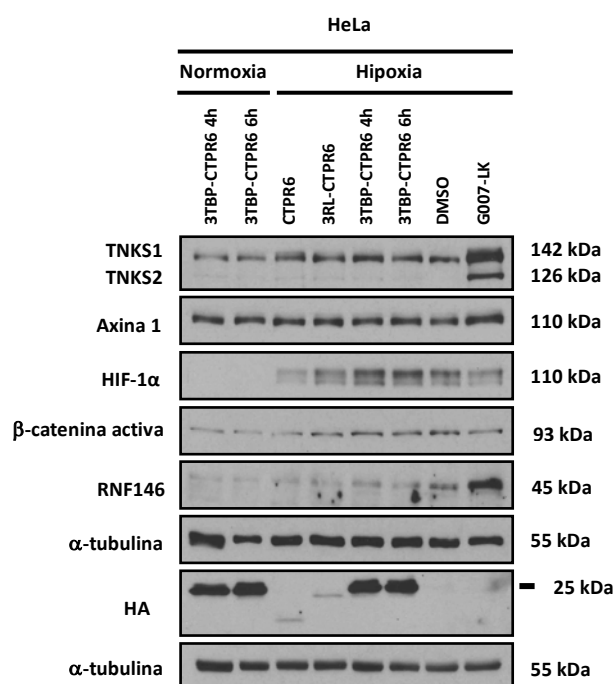


Figura 43. Prueba del inhibidor no catalítico de TNKS1/2 en hipoxia. Análisis por *western blot* de los niveles de TNKS1/2, axina 1, β -catenina activa, RNF146 y HA tras realizar la transfección con el plásmido de 3TBP-CTPR6 (0,5 μ g) durante 4h y 6h en normoxia e hipoxia (4h al 1% O₂). Como controles se usaron los plásmidos de CTPR6 y 3RL-CTPR6 (2 μ g). Se incluyó una muestra del tratamiento con G007-LK 5 μ M durante 24 horas y su respectivo control con DMSO. HA: hemaglutinina.

RESULTADOS

4.9. La pérdida de TNKS1/2 disminuye la expresión de proteínas relacionadas con la glicólisis a través del factor HIF-1 α durante hipoxia

Tal y como hemos demostrado en esta tesis mediante la realización y análisis de un *array* de expresión que contenía los genes más representativos de la ruta de señalización de hipoxia, tras el silenciamiento de TNKS1/2 se alteraba la expresión de 9 genes relacionados con el metabolismo, siendo 7 de ellos genes relacionados con la glicólisis (*CA9*, *HK2*, *PDK1*, *PFKFB3*, *PFKFB4*, *PFKP* y *SLC16A3*) y 2 con la autofagia (*BNIP3* y *DDIT4*). Uno de los factores que más favorecen la progresión tumoral en los tumores sólidos es su plasticidad metabólica. En condiciones normales, la fuente principal de energía de las células es la fosforilación oxidativa, que tiene lugar en la mitocondria y que como su propio nombre indica es dependiente de oxígeno. Sin embargo, los nichos tumorales que están sometidos a hipoxia no pueden recurrir a ese mecanismo para obtener energía, de manera que las células tienen que recurrir a otra fuente de energía para sobrevivir y proliferar. En estos casos, el metabolismo celular suele recaer principalmente en la glicólisis anaerobia (Efecto *Warburg*). Tal como hemos visto en el apartado 4.4, hay 7 genes glicolíticos cuya expresión se había alterado, por lo que decidimos profundizar y estudiar cómo estaba la glicólisis en nuestras células tras la pérdida de ambas tankirasas.

Lo primero que hicimos fue llevar a cabo el silenciamiento, en este caso de TNKS1 y de TNKS1/2 en las líneas celulares HeLa y LN229 en condiciones de normoxia e hipoxia. Hasta el momento habíamos sometido a las células únicamente a 4 horas de hipoxia, pero cómo ahora queríamos estudiar un efecto más a largo plazo, decidimos someter a las células a 24 horas de hipoxia. El hecho de que las células tengan que permanecer en hipoxia nos impidió estudiar la glicólisis en el Seahorse y por ello decidimos analizar los niveles de expresión de las proteínas implicadas en la glicólisis y además medir los niveles de lactato del medio extracelular. La glicólisis anaerobia tiene como producto final lactato, el cual es secretado al exterior de la célula como mecanismo para regular los niveles de acidificación del medio intracelular. Entre los 7 genes relacionados el

metabolismo de la glucosa había 5 enzimas que participaban directamente en el proceso de glicólisis. Por un lado, están las enzimas HK2, PFKFB3, PFKFB4 y PFKP, que son enzimas que participan en los primeros pasos de la glicólisis. Las dos proteínas restantes, CA9 y MCT4 (cuyo gen es *SLC16A3*), no son enzimas que intervengan directamente en el proceso de glicólisis, pero sí que participan en la ruta, porque CA9 es una enzima que se encarga de catalizar la hidratación reversible de dióxido de carbono en bicarbonato y un protón regulando así la acidificación del medio intracelular, mientras que MCT4 es un transportador que expulsa lactato al exterior de la célula.

De entre todas las proteínas implicadas en glicólisis que estaban afectadas tras el silenciamiento de TNKS1/2 seleccionamos CA9, HK2, PFKFB4 y PFKP para estudiar sus niveles de expresión mediante *western blot* y además añadimos BNIP3 dado su papel en la mitofagia. En este caso también decidimos cuantificar los resultados para tener en cuenta mejor las diferencias observadas entre condiciones y líneas celulares. Los niveles de ambas tankirasas corroboraron que los silenciamientos se habían producido. Tras 24 horas de hipoxia se detectó en ambas líneas una disminución de los niveles de HIF-1 α tras el silenciamiento individual de TNKS1 (el efecto fue nuevamente mayor en la línea HeLa) y el doble silenciamiento de TNKS1/2, siendo mayor la caída en la condición del doble silenciamiento (**Figura 44**). Los niveles de PFKP no aumentaron significativamente tras el tratamiento de hipoxia en la línea HeLa, algo que ya habíamos visto en el *array*, pues detectamos que su expresión estuvo modulada por tankirasa independientemente de la hipoxia (**Figura 44**). Por el contrario, en la línea LN229 sí que detectamos una inducción de la expresión de PFKP tras el tratamiento con hipoxia. En cuanto al efecto de los silenciamientos, aunque a simple vista pudimos ver diferencias, los resultados de la cuantificación mostraron un descenso significativo sólo tras el silenciamiento en condiciones de hipoxia en ambas líneas, no habiendo diferencias entre el silenciamiento individual y el doble (**Figura 44**). Tampoco se observaron diferencias en los niveles de PFKFB4 al comparar el silenciamiento de TNKS1 con el de TNKS1/2, detectándose en ambas condiciones la misma disminución significativa respecto al

RESULTADOS

control en hipoxia (en el que se apreciaba una inducción) (**Figura 44**). En este caso el silenciamiento de TNKS1 en la línea LN229 no salió significativa, pero prácticamente fue igual que en el silenciamiento de TNKS1/2. Los niveles de HK2 y CA9 también mostraron un aumento en su expresión tras el tratamiento con hipoxia, aunque los silenciamientos afectaron de distinta manera. Los niveles de HK2 disminuyeron de manera significativa en ambas líneas celulares tras realizar el doble silenciamiento (**Figura 44**). Los niveles de CA9 en la línea HeLa disminuyeron significativamente tras el silenciamiento de TNKS1 y también de TNKS1/2 y aunque a simple vista se apreciaron diferencias entre el silenciamiento simple y el silenciamiento doble, estas diferencias no fueron significativas (**Figura 44**). En la línea LN229 se detectó una leve disminución de CA9 tras el silenciamiento de TNKS1 (aunque no significativa en la cuantificación) y un mayor efecto tras el silenciamiento de ambas tankirasas. (**Figura 44**) Por último, también analizamos los niveles de BNIP3, una proteína capaz de inducir mitofagia y los resultados mostraron una inducción tras someter a las células a hipoxia. En la línea HeLa observamos la misma reducción en los niveles de expresión de la proteína tanto con el silenciamiento simple como con el doble, mientras que en la línea LN229 el mayor efecto fue detectado tras el doble silenciamiento de TNKS1/2 (**Figura 44**).

Dadas las diferencias observadas en los niveles de expresión de algunas proteínas al comparar el silenciamiento simple y doble de tankirasa decidimos medir los niveles de lactato extracelular únicamente tras el doble silenciamiento de TNKS1/2, pues consideramos que sería la condición en la que veríamos un efecto mayor. Debido al uso de varias líneas celulares y condiciones de estudio, se seleccionaron para la cuantificación de lactato extracelular las condiciones de control normoxia e hipoxia y el doble silenciamiento en hipoxia. Los niveles de lactato en el medio extracelular aumentaron en un 50% y un 30% tras 24 horas de hipoxia en la línea HeLa y LN229, respectivamente. Sin embargo, tras el silenciamiento de ambas tankirasas se produjo una reducción significativa del 20% en los niveles de lactato en ambas líneas, lo cual podría ser indicativo de que la glicólisis estuviera comprometida (**Figura 45**).

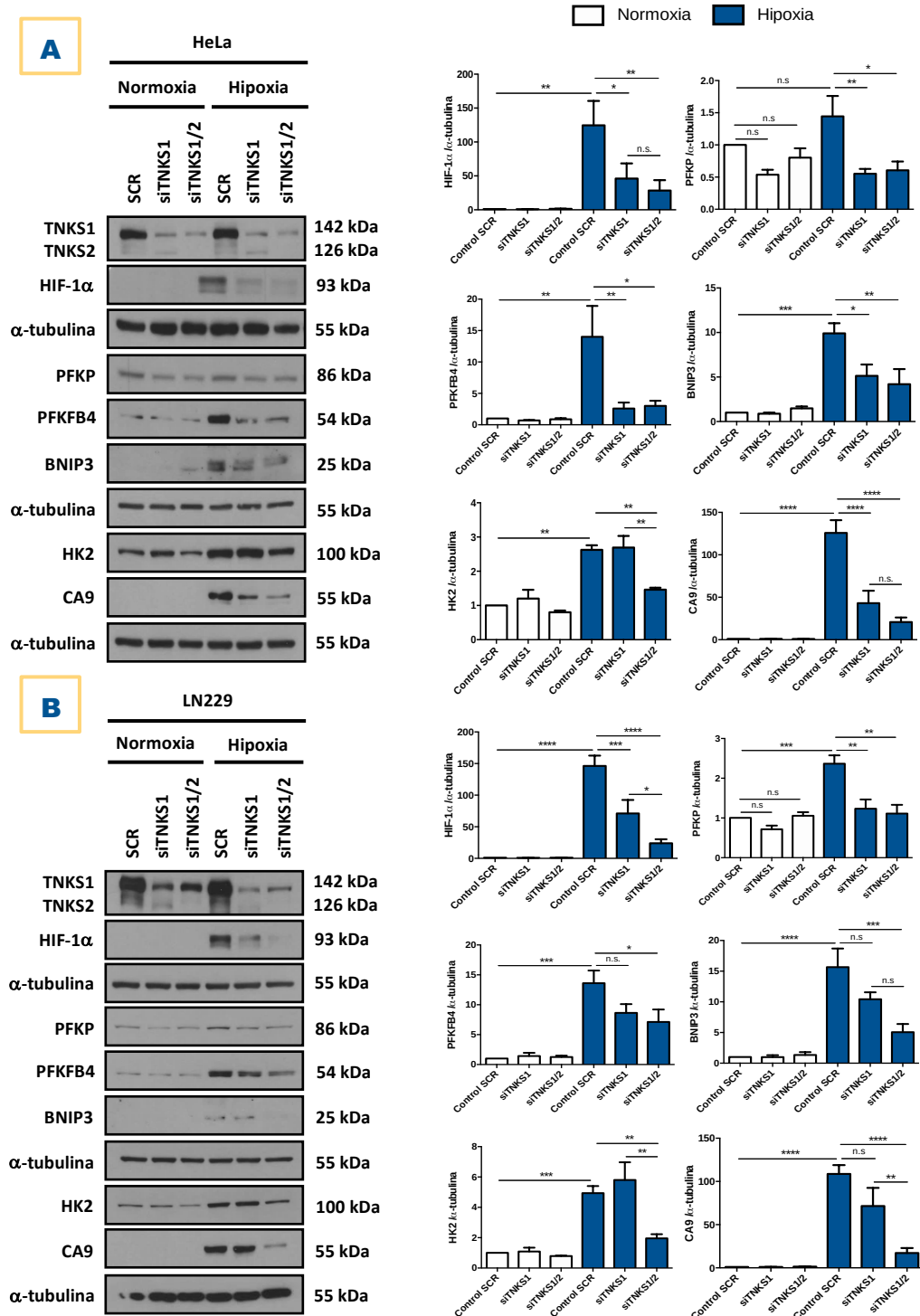


Figura 44. Estudio del silenciamiento de tankirasa sobre la estabilidad de proteínas implicadas en glicólisis y autofagia. A, B. Análisis por *western blot* de los niveles de TNKS1/2, HIF-1α y proteínas relacionadas con la glicólisis (PFKP, PFKFB4, HK2 y CA9) y la autofagia (BNIP3) en la línea celular HeLa (A) y LN229 (B) tras el silenciamiento génico transitorio de TNKS1 y TNKS1/2 en condiciones de normoxia e hipoxia (24h al 1% O₂). Los valores de la cuantificación se corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes (±SEM). Los resultados se normalizaron respecto a la proteína α-tubulina.

RESULTADOS

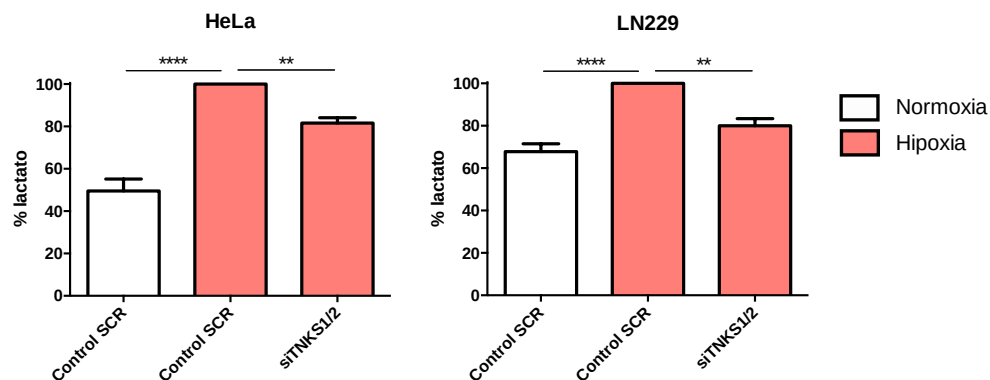


Figura 45. Estudio del silenciamiento de TNKS1/2 sobre los niveles de lactato extracelular en hipoxia.

Análisis mediante ensayo de colorimetría de los niveles de lactato extracelular en la línea celular HeLa y LN229 tras el silenciamiento génico transitorio de TNKS1/2 en hipoxia (24h al 1% O₂). Los valores de la cuantificación se corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ($\pm$ SEM). Los resultados se normalizaron respecto a la cantidad de proteína total, obtenida mediante el método de Lowry.

En resumen, los datos obtenidos indican que la pérdida de TNKS1 y TNKS2 conlleva una disminución de la transcripción de los niveles de HIF-1 α . Esto provoca una reducción en los niveles de proteína de HIF-1 α , lo cual compromete su actividad como factor de transcripción, afectando a la inducción de genes que participan en el metabolismo de la glucosa y la autofagia y comprometiendo la glicólisis anaerobia

Capítulo 2: Papel de las tankirasas en la formación de mimetismo vasculogénico

4.10. Análisis de la relación entre tankirasas y VE-cadherina

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio habían demostrado el papel relevante de VE-cadherina en el fenómeno de VM en células de melanoma uveal y cutáneo [229,231], así que lo primero que hicimos fue estudiar la relación entre la expresión de tankirasas y VE-cadherina. Para ello recurrimos nuevamente a la web *CBioportal*, aunque en lugar de elegir un estudio que recogiese distintos tipos de tumores, esta vez escogimos un estudio con 448 muestras de melanoma cutáneo y otro estudio con 80 muestras de melanoma uveal. Nos centramos en este tipo de tumores porque son los modelos donde previamente se había descubierto la implicación de VE-cadherina en el VM. Los gráficos de punto obtenidos para ambos tipos de melanoma mostraron una relación estadísticamente significativa únicamente entre VE-cadherina (cuyo gen es *CDH5*) y *TNKS1*, siendo dicha relación inversamente proporcional en ambos casos de acuerdo al coeficiente de Spearman (*Spearman* de -0,12 y q-valor de 0,0250 en el caso de melanoma cutáneo y *Spearman* de -0,33 y q-valor de 0,0467 en melanoma uveal) (**Figura 46A**). Las muestras de este estudio también contenían un bajo porcentaje de mutaciones para ambos genes.

A continuación, tratamos la línea celular de melanoma uveal VM⁺ MUM2B, con el inhibidor de tankirasas G007-LK y realizamos un subfraccionamiento citosol-núcleo. En la condición control con DMSO detectamos que VE-cadherina estaba mayoritariamente en el compartimento nuclear, pero tras el tratamiento con G007-LK los niveles de VE-cadherina disminuyeron drásticamente (**Figura 46B**). Por lo tanto, estos resultados sí que iban en consonancia con los obtenidos en *CBioportal*, pues al inhibir *TNKS1/2*, los niveles de ambas aumentaron, mientras que los de VE-cadherina disminuyeron.

RESULTADOS

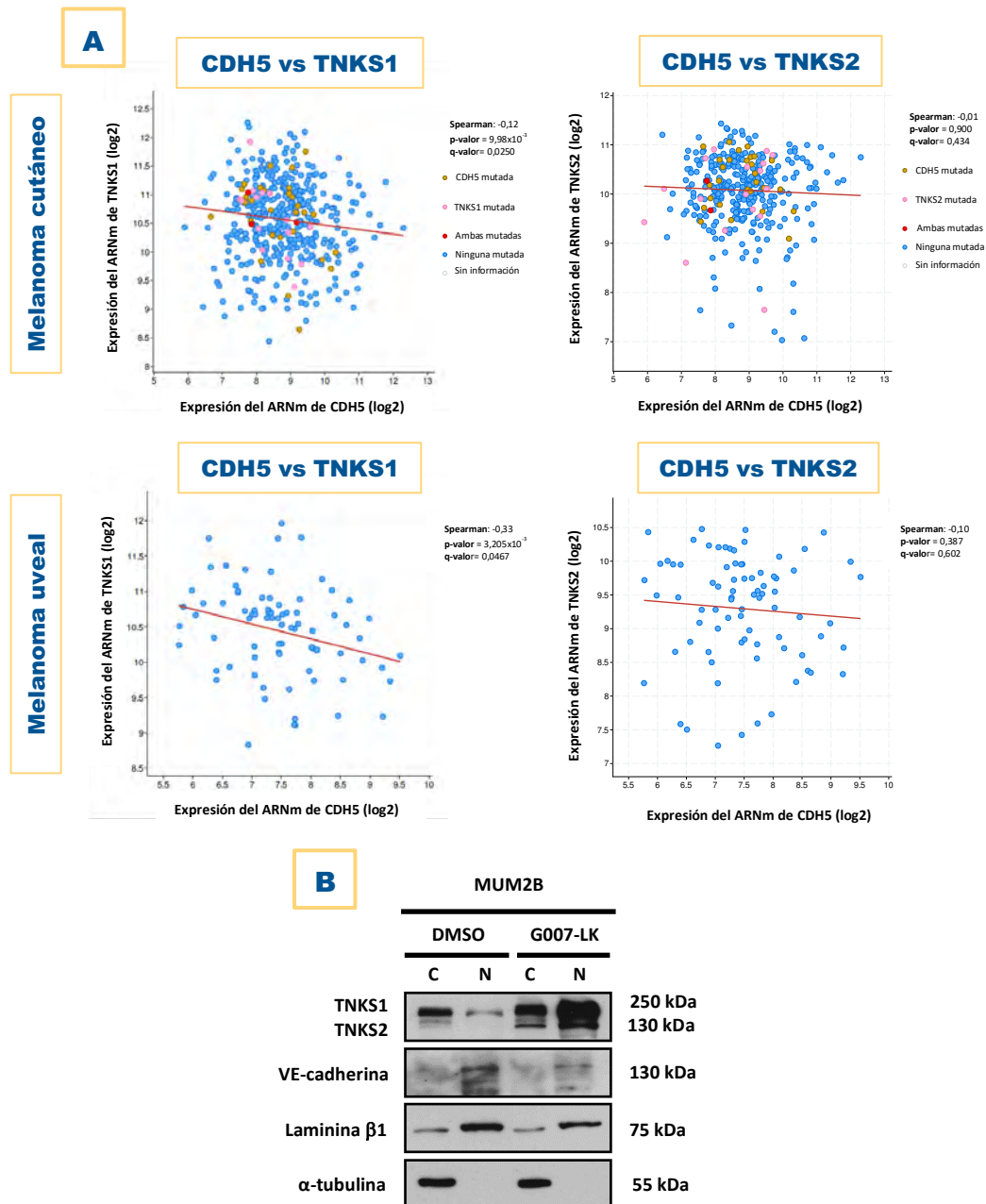
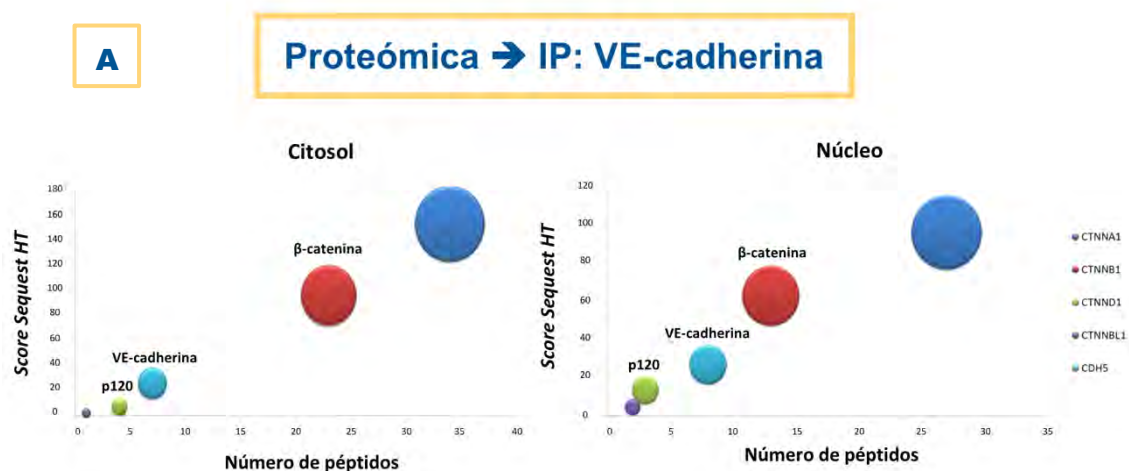


Figura 46. Relación entre VE-cadherina y tankirasas. **A.** Gráficos de dispersión que muestran la relación entre la expresión del ARNm de VE-cadherina (*CDH5*) y *TNKS1* y *TNKS2* según el coeficiente de *Spearman* en dos estudios en los que se incluyen muestras de melanoma cutáneo (arriba) y melanoma uveal (abajo). La información se obtuvo a través de dos estudios de la *TCGA PanCancer Atlas* a los que se accedieron a través de la web *CBioportal*. **B.** Subfraccionamiento citosol-núcleo para analizar la distribución y la relación entre tankirasas y VE-cadherina tras el uso de G007-LK 5 μ M durante 24h. Como controles del subfraccionamiento se usaron las proteínas α -tubulina para el citosol y laminina β 1 para el núcleo. C: citosol; N: núcleo.

Dado el efecto que observamos en los niveles de VE-cadherina tras la inhibición de las tankirasas, quisimos comprobar si ambas proteínas interaccionaban para saber si existía una relación directa o si dicho efecto estaba mediado por un tercer miembro. Como previamente habíamos tenido problemas con la inmunoprecipitación de TNKS1/2, esta vez llevamos a cabo una proteómica tras la inmunoprecipitación de VE-cadherina en un subfraccionamiento citosol-núcleo con el fin de ver si detectábamos alguna de las tankirasas. Desafortunadamente ninguna de las tankirasas estaba en la lista de proteínas que interaccionaban con VE-cadherina en ninguno de los dos compartimentos celulares, aunque sí que hubo un resultado que nos llamó la atención. Tanto en el citosol como en el núcleo se detectaron la presencia de un gran número de péptidos correspondientes a varios miembros de la familia de las cateninas, una familia de proteínas involucradas en el proceso de adhesión celular mediado por cadherinas. Concretamente se identificaron péptidos correspondientes a α -catenina (CTNNA1), β -catenina (CTNNB1) y δ -catenina (CTNND1) (Figura 47A). En nuestro laboratorio ya se había descrito previamente la importancia de la interacción entre VE-cadherina y δ -catenina, también llamado p120, y su papel en el mimetismo vasculogénico, aunque hasta el momento nadie había estudiado el papel que β -catenina podría estar jugando en el VM mediado por VE-cadherina. Lo primero que hicimos fue realizar una inmunoprecipitación de VE-cadherina para confirmar la interacción directa entre ambas proteínas en la línea celular MUM2B (Figura 47B).



RESULTADOS

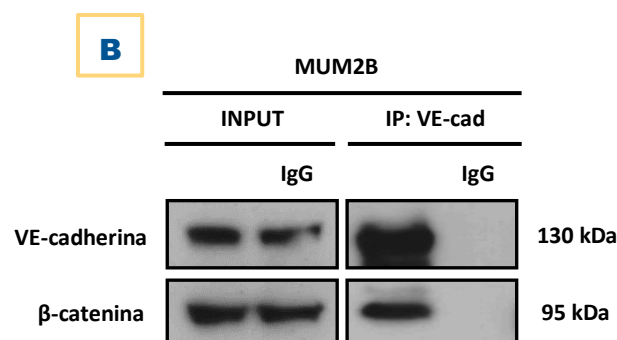


Figura 47. Análisis de las proteínas que interaccionan con VE-cadherina. A. Gráfico en el que se representan los miembros de la familia de cateninas que interaccionan con VE-cadherina en el citosol y en el núcleo tras llevar a cabo una proteómica. Cada gráfico corresponde a una condición e indica el número de péptidos detectados, así como su *Score Sequest HT*. Este experimento se llevó a cabo en la línea MUM2B. B. Inmunoprecipitación de VE-cadherina tras realizar un subfraccionamiento citosol-núcleo en la línea MUM2B.

Este resultado junto con el hecho de que los inhibidores de tankirasa se han usado como inhibidores de la ruta de Wnt/ β -catenina, nos hizo pensar que quizás el efecto observado previamente al inhibir tankirasas no estaba mediado directamente por ellas, sino que podría ser un efecto indirecto mediado por β -catenina. Tankirasa regula la degradación de axina 1, uno de los miembros del complejo de degradación de β -catenina, por lo que al usar un inhibidor de tankirasas estamos evitando que se degrade axina 1 y con ello favoreciendo la degradación de β -catenina. Entonces decidimos estudiar los niveles de β -catenina total y β -catenina activa junto con los de VE-cadherina total y su forma fosforilada en la tirosina 658 (Y658), en la línea de melanoma uveal MUM2B. Los niveles de VE-cadherina fosforilada en la tirosina 658 los medimos también porque estudios previos en nuestro laboratorio confirmaron que dicha fosforilación es crucial para su papel en la formación de VM. En este caso además de usar la línea MUM2B, usamos la línea MUM2C, que proviene del mismo paciente que la línea MUM2B, aunque se diferencian en que la línea MUM2B es altamente agresiva, expresa VE-cadherina y además es capaz de realizar VM, mientras que la línea MUM2C es menos agresiva, no expresa VE-cadherina y no tiene la capacidad de realizar VM. Los resultados obtenidos mediante *western blot* confirmaron las diferencias entre

la línea MUM2B y MUM2C en cuanto a niveles de VE-cadherina total y VE-cadherina fosforilada en la Y658, aunque no se detectaron diferencias en los niveles de β -catenina total ni β -catenina activa (**Figura 48A**). Sin embargo, al realizar un subfraccionamiento citosol-núcleo y comparar las dos líneas celulares sí que detectamos diferencias, puesto que la línea MUM2B expresaba β -catenina activa sólo en el compartimento nuclear, mientras que la línea MUM2C expresaba mayoritariamente en el núcleo, pero también en el citosol (**Figura 48B**). La línea MUM2B también expresaba VE-cadherina total y su forma fosforilada en la Y658 mayoritariamente en el núcleo. La diferencia observada entre la línea MUM2B capaz de realizar VM y la línea MUM2C en cuanto a la distribución de los niveles de β -catenina activa nos hizo pensar que la interacción con VE-cadherina se produce a nivel nuclear y que podría ser clave para modular la expresión de genes de la ruta Wnt/ β -catenina. Por ello se llevaron a cabo tanto inmunoprecipitaciones de VE-cadherina como de β -catenina en la línea MUM2B que fueron determinantes para confirmar la formación de un complejo entre β -catenina y el factor de transcripción TCF4 con VE-cadherina (**datos no incluidos**).

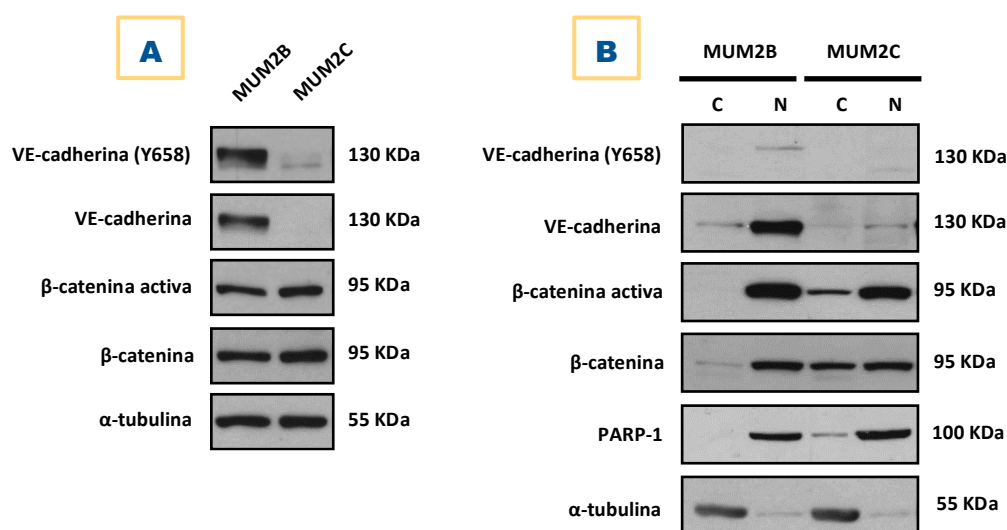


Figura 48. Análisis de la distribución de VE-cadherina y β -catenina en líneas de melanoma uveal A, B.

Análisis mediante *western blot* de los niveles de VE-cadherina total, VE-cadherina fosforilada (Y658), β -catenina total y β -catenina activa en muestras pertenecientes a un extracto total (**A**) y a un subfraccionamiento citosol-núcleo (**B**) en las líneas MUM2B y MUM2C. Como controles del subfraccionamiento se usaron las proteínas α -tubulina para el citosol y PARP-1 para el núcleo. C: citosol; N: núcleo.

RESULTADOS

La confirmación del complejo VE-cadherina con β -catenina/TCF4 sirvió para afirmar nuestra teoría de que el efecto que habíamos observado en los niveles de VE-cadherina tras la inhibición de tankirasas estaba mediado por β -catenina. Por ello decidimos realizar un silenciamiento génico transitorio de la misma junto con un subfraccionamiento citosol-núcleo y tanto los niveles de VE-cadherina, como los de su forma fosforilada en la Y658 volvieron a disminuir prácticamente hasta desaparecer tras el silenciamiento de β -catenina, lo cual se correspondía con que esperábamos obtener (Figura 49).

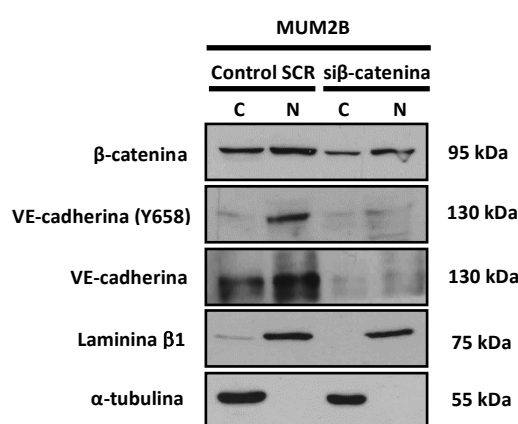


Figura 49. Análisis de los niveles de VE-cadherina tras el silenciamiento de β -catenina. A. Análisis mediante *western blot* de los niveles de VE-cadherina total, VE-cadherina fosforilada (Y658) y β -catenina total tras el silenciamiento génico transitorio de β -catenina en un subfraccionamiento citosol-núcleo realizado en la línea MUM2B. Como controles del subfraccionamiento se usaron las proteínas α -tubulina para el citosol y laminina β 1 para el núcleo. C: citosol; N: núcleo.

4.11. La inhibición de tankirasas disminuye la formación de mimetismo vasculogénico a través de la ruta Wnt

Dado que los inhibidores de tankirasa causaron una pérdida de los niveles tanto de VE-cadherina total como de su forma fosforilada, quisimos dar un paso más y evaluar su uso en la capacidad de formación de mimetismo vasculogénico. Para ello realizamos experimentos de angiogénesis *in vitro* sembrando la línea MUM2B en una matriz tridimensional y tratando con dos inhibidores de tankirasa, XAV939 y G007-LK. La formación de mimetismo vasculogénico fue analizada a través de la formación de redes en forma de tubos a lo largo de la matriz 3D, observándose canales que

estaban conectados entre sí dejando huecos o *loops* característicos. Por lo tanto, estudiamos y cuantificamos el número de *loops* en cada condición gracias al programa *Wintube* y los resultados obtenidos indicaron que la inhibición de tankirasa efectivamente afectó a la capacidad de la línea MUM2B para realizar VM. Concretamente el inhibidor XAV939 fue utilizado a dos concentraciones distintas (2,5 y 5 μM) y ambas dosis redujeron el número de *loops* en un 40% y 50%, respectivamente mientras que el inhibidor G007-LK se usó únicamente a 5 μM y redujo el número de *loops* en un 80% (**Figura 50**)

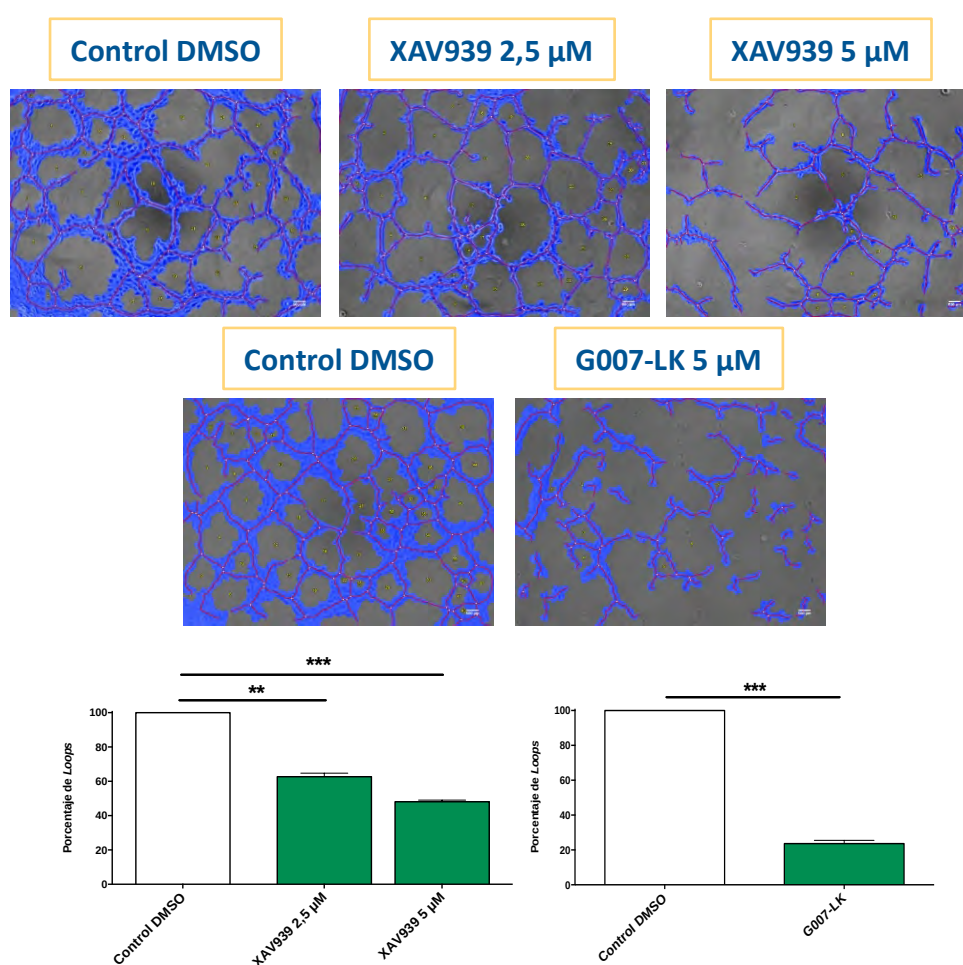


Figura 50. Análisis del efecto de los inhibidores de tankirasa sobre la formación de mimetismo vasculogénico. Imágenes representativas de microscopía óptica tomadas con el objetivo 10X al realizar un experimento de angiogénesis *in vitro* en la línea MUM2B. Tras sembrar las células en una matriz 3D, fueron tratadas con XAV939 2,5 μM y 5 μM o con G007-LK 5 μM durante 24 horas. Posteriormente se evaluó la capacidad de formación de mimetismo vasculogénico mediante la cuantificación de *loops* con el programa *Wintube*. Los valores de la cuantificación se corresponden a la media de 3 fotos tomadas en 3 experimentos independientes ($\pm\text{SEM}$).

RESULTADOS

Hasta el momento habíamos visto que la inhibición de tankirasa provocaba una disminución de los niveles de VE-cadherina, lo cual se tradujo en una pérdida de la capacidad de realizar VM. Para confirmar nuevamente que el efecto observado en la formación de VM al inhibir tankirasas estaba mediado por β -catenina, llevamos a cabo el silenciamiento génico en la línea MUM2B y a continuación realizamos el experimento de angiogénesis *in vitro*. Los resultados de la cuantificación de *loops* mostraron una reducción en la formación de VM, puesto que el número de *loops* de las células que habían sido silenciadas para β -catenina había disminuido en un 40% respecto a las células control **Figura 51A**). Por último, también llevamos a cabo el silenciamiento de TWIST1, un factor de transcripción que está regulado por el complejo de β -catenina/TCF4 y de nuevo pudimos apreciar una reducción del 40% en el número de *loops* tras su silenciamiento, poniendo de manifiesto su implicación en el mecanismo mediado por VE-cadherina/ β -catenina/TCF4 (**Figura 51A**). Los silenciamientos de β -catenina y TWIST1 fueron comprobados mediante western blot y RT-qPCR respectivamente (**Figura 51B, C**).

De esta manera, concluimos que el complejo que forma VE-cadherina junto con β -catenina y TCF4 está involucrado en la formación de VM a través de la estabilidad de VE-cadherina y de la inducción de genes de la ruta Wnt/ β -catenina como TWIST1. Por lo tanto, el uso de inhibidores de las tankirasas puede ser una aproximación adecuada para evitar la formación de VM.

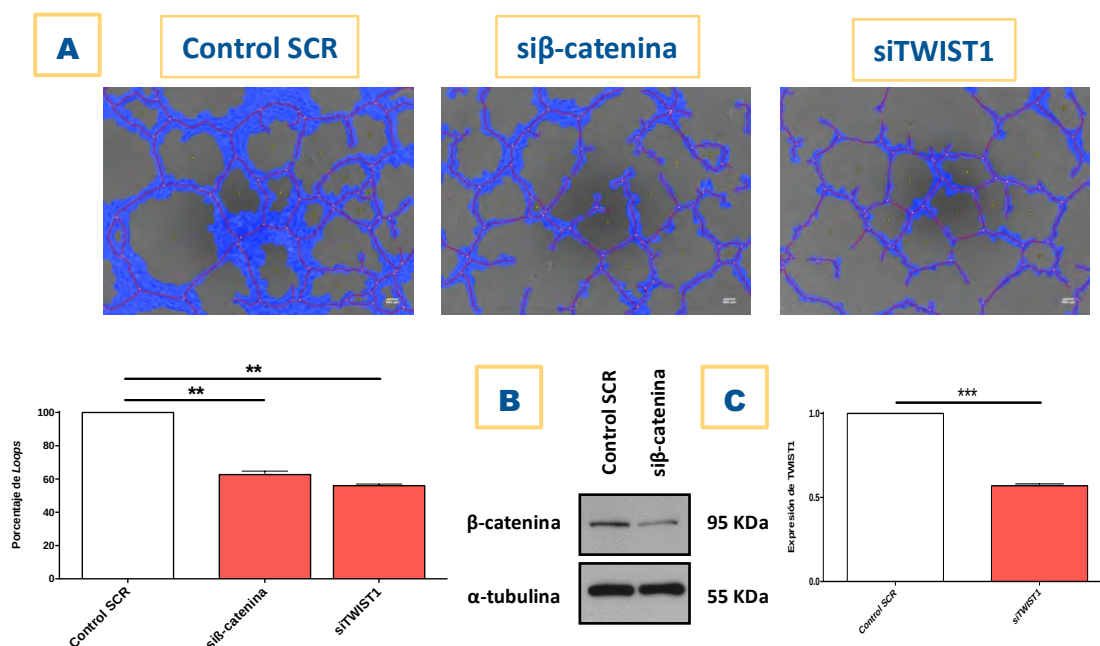


Figura 51. Análisis del efecto del silenciamiento de β -catenina y TWIST1 sobre la formación de mimetismo vasculogénico. **A.** Imágenes representativas de microscopía óptica tomadas con el objetivo 10X tras realizar un experimento de angiogénesis *in vitro* en la línea MUM2B. Primero se llevó a cabo el silenciamiento génico transitorio de β -catenina y TWIST1 durante 48 horas y posteriormente se sembraron las células en una matriz 3D. La capacidad de formación de mimetismo vasculogénico se evaluó mediante la cuantificación de *loops* con el programa *Wintube*. **B.** Análisis mediante *western blot* de los niveles de β -catenina tras el silenciamiento génico transitorio. **C.** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de TWIST1 tras el silenciamiento génico transitorio. Los valores de la cuantificación se corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ($\pm$ SEM).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El hecho de que el cáncer sea la principal causa de muerte en todo el mundo y que además se estime que su incidencia avance de manera exponencial con el paso de los años [4], hace que sea más que necesaria la búsqueda de tratamientos eficaces para combatirlo. En el caso de los tumores sólidos, dos de los hechos clave por los que se caracteriza el microambiente tumoral es por la presencia de zonas sometidas a hipoxia y por los distintos mecanismos a través de los cuales el tumor consigue inducir la vascularización como por ejemplo el mimetismo vasculogénico [130,204]. Teniendo en cuenta el estado del conocimiento actual sobre la biología de los tumores sólidos, es imperativo explorar y comprender a fondo nuevos mecanismos de regulación de la hipoxia y el VM, ya que ambas condiciones son factores determinantes en el desarrollo, progresión y resistencia terapéutica de los tumores y su conocimiento nos brinda la oportunidad de desarrollar abordajes terapéuticos más efectivos y precisos contra el cáncer.

La familia de proteínas PARP interviene en multitud de rutas de señalización y adaptación celular tales como reparación del ADN, transcripción, diferenciación o control de procesos de muerte celular. Estas proteínas modifican un amplio abanico de dianas moleculares a través de un proceso conocido como PARilación [250,251]. Al miembro principal de la familia PARP, PARP1, se le atribuye el 90% de la PARilación necesaria para mantener la homeostasis celular, además de estar muy alterada su expresión y función en diversos tipos de tumores. Esto ha llevado a que a día de hoy existan 4 inhibidores químicos aprobados por la FDA para el tratamiento de tumores de mama, ovario y próstata [254]. Nuestro laboratorio desde hace ya más de una década se ha centrado en el estudio de la proteína PARP1 en numerosos procesos relacionados con el cáncer, llegando a descubrir que puede jugar un papel clave en el proceso de adaptación a la hipoxia, así como en el mimetismo vasculogénico y la normalización vascular en varios modelos tumorales [122,249]. En vistas del papel que juega el proceso de PARilación mediado por tankirasas en la

DISCUSIÓN

degradación selectiva de proteínas PARiladas, decidimos estudiar la posible implicación de TNKS1 y TNKS2 en ambos procesos.

A) Papel de las tankirasas en la adaptación tumoral a la hipoxia

En el contexto del cáncer, se ha descrito que las tankirasas pueden tener una función mayoritariamente protumorigénica. A través de un estudio de *CBioportal* analizamos el porcentaje de alteraciones de ambas tankirasas en 33 tipos de tumores distintos y los resultados mostraron un bajo porcentaje de alteraciones en los genes de ambas tankirasas. Este resultado podría deberse a que las alteraciones de tankirasa en el ámbito tumoral se producen principalmente a nivel de proteína y no a nivel de sus respectivos genes. De hecho, se ha descrito que las tankirasas suelen encontrarse sobreexpresadas en varios tipos de tumores como por ejemplo ocurre en el cáncer de pulmón, colon, mama, hígado y glioblastoma [272].

El crecimiento descontrolado del cáncer hace que se generen zonas hipóxicas a las que no llega suficiente O_2 ni nutrientes [55]. La adaptación de las células tumorales a la hipoxia viene determinada principalmente por la familia de factores de transcripción HIF, principalmente HIF-1 α [57,58]. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la PARilación por parte de PARP1 podía regular la estabilidad de HIF-1 α , de manera que tanto su inhibición como su eliminación daban lugar a una pérdida de los niveles del factor de transcripción [122]. Entonces, dada la importancia que está adquiriendo la PARilación por parte de TNKS1/2, decidimos estudiar su papel sobre la estabilidad y actividad transcripcional de HIF-1 α durante hipoxia.

Con el fin de ver el efecto de las alteraciones de tankirasa 1 y 2 en cáncer, consultamos un estudio de *CBioportal* en el que se incluían muestras de todo tipo de tumores para analizar la expresión entre ambas tankirasas y los distintos miembros de la familia HIF. El análisis indicó que mientras la expresión de ambas tankirasas mantiene una correlación positiva con HIF-1 α y HIF-1 β , existe una correlación negativa con HIF-2 α . En el caso de HIF-3 α , este mantiene también una correlación

negativa con ambas tankirasas, aunque sólo fue significativa en el caso de TNKS2. A día de hoy HIF-3 α es la única isoforma que parece estar sujeta al proceso de *splicing* alternativo, habiéndose descrito hasta 6 variantes distintas [73]. Por lo tanto, que HIF-3 α fuese el único miembro cuya expresión no fuese significativa con ambas tankirasas podría ser debido a la gran variedad de transcritos que presenta la isoforma. En cuanto a las diferencias entre HIF-1 α y HIF-2 α , ambas isoformas están estrechamente relacionadas, pues ambas median la activación de genes a través del reconocimiento de los elementos de respuesta a hipoxia (HRE). No obstante, aunque tienen gran cantidad de genes en común, también se ha demostrado que regulan ciertos genes de manera exclusiva. HIF-1 α induce la expresión de genes que permiten la adaptación metabólica, mientras que HIF-2 α regula la transcripción de genes que median la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular. El desarrollo de ratones *KO* para ambos miembros ha confirmado que tienen papeles no redundantes y que la inactivación de cada uno da lugar a distintos fenotipos [75,77]. Además, se ha demostrado que pueden ser regulados por distintos intermediarios [62,121,374,375]. Por lo tanto, las diferencias en cuanto a la correlación de expresión de ambas subunidades alfa con las tankirasas podrían deberse a su expresión y/o función diferencial.

Tras el estudio *in silico*, decidimos testar el efecto que pudiera tener tanto la inhibición catalítica como el silenciamiento génico transitorio de ambas tankirasas durante evento de carencia de O₂. Para la inhibición de las tankirasas utilizamos dos inhibidores catalíticos, XAV939 y G007-LK que actúan sobre el sitio nicotinamida y al sitio adenosina de la zona donadora del dominio PARP de ambas tankirasas. Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición de tankirasa no ejerció ningún efecto sobre los niveles de proteína de HIF-1 α . No obstante, cuando llevamos a cabo el silenciamiento transitorio de ambas tankirasas en condiciones de normoxia e hipoxia sí que notamos un cambio, pues tras la pérdida de ambas tankirasas los niveles de HIF-1 α disminuyeron. Tanto la inhibición como el silenciamiento fueron llevados a cabo en varias líneas tumorales con el fin de comprobar que no era algo que ocurría sólo en una línea celular, sino que se podía aplicar

DISCUSIÓN

a distintos modelos de cáncer. Asimismo, estudiamos el efecto sobre los otros miembros que mantenían una correlación con ambas tankirasas, aunque tras el silenciamiento transitorio no detectamos cambios determinantes en los niveles de HIF-2 α ni HIF-1 β . Como factores de transcripción, la familia HIF regula una gran cantidad de genes relacionados con metabolismo, supervivencia, apoptosis, angiogénesis y proliferación para garantizar la adaptación de la célula al ambiente hipóxico [90,91]. Gracias a un *array* de la ruta de señalización de respuesta a hipoxia detectamos que había 12 genes cuya expresión se había visto modificada, de los cuales 5 eran genes que parecían estar regulados por tankirasa independientemente de la hipoxia (*COP55*, *MAP3K1*, *PFKP*, *SLC16A3* y *TXNIP*) y 7 parecían estar regulados por tankirasa durante hipoxia (*BNIP3*, *CA9*, *DDIT4*, *HK2*, *PDK1*, *PFKFB3* y *PFKFB4*). Por lo tanto, asumimos que la expresión de estos 7 genes se había visto modificada por tankirasa a través del factor HIF-1 α .

Hasta el momento habíamos observado que al llevar a cabo el doble silenciamiento de ambas tankirasas se producía la disminución de los niveles de proteína de HIF-1 α , pero no de otros miembros de la familia HIF en varios modelos tumorales. Esta disminución iba acompañada de la reducción en la expresión de 7 genes regulados por el factor de transcripción. No obstante, nos preguntamos por qué aun habiendo una caída considerable de los niveles de HIF-1 α , sólo se había modificado la expresión de 7 genes. Se ha visto que la mayoría de los genes son inducidos tanto por HIF-1 como por HIF-2, por lo que en caso de que faltase HIF-1 α , HIF-2 α podría seguir llevando a cabo la inducción de los genes de interés comunes. Sin embargo, también se ha demostrado que cada subunidad es responsable de la inducción exclusiva de ciertos grupos de genes [75,77,78]. En el caso de HIF-1 α se ha observado que regula la expresión de enzimas glicolíticos y 5 de los 7 genes de interés codifican proteínas que intervienen en el metabolismo de la glucosa (*CA9*, *HK2*, *PDK1*, *PFKFB3* y *PFKFB4*). Los otros dos genes codifican proteínas que también tienen una función metabólica, aunque pertenecen a la ruta de la autofagia (*BNIP3* y *DDIT4*). En el caso de estas dos proteínas, también se ha demostrado que son reguladas exclusivamente por HIF-1 α [77,121]. Por lo tanto, esto explicaría por qué a pesar de la caída de HIF-1 α sólo se alteraba la expresión de 7

genes. Tras el silenciamiento de TNKS1/2 los niveles de HIF-2 α no disminuyeron, por lo que todos los genes que son regulados por ambas subunidades podrían ser inducidos por HIF-2 α en ausencia de HIF-1 α , pero no los genes que son regulados exclusivamente por HIF-1 α . Además, otro hecho a tener en cuenta es que no todos los genes fueron inducidos tras 4 horas de hipoxia. HIF-1/2 no inducen todos los genes por igual al mismo nivel, sino que hay genes que se inducen antes que otros [91,376]. En nuestro caso, tras 4 horas de hipoxia sólo se indujo la expresión de 21 genes en la línea HeLa, por lo que quizás si hubiésemos sometido a las células a una hipoxia más prolongada habríamos detectado cambios en otros genes regulados por HIF-1 α que no sufrieron inducción por el corto tiempo de hipoxia como por ejemplo otras enzimas glicolíticas.

En un principio comenzamos estudiando el efecto conjunto de ambas tankirasas, aunque también quisimos comprobar la contribución de cada una de ellas por separado sobre el efecto observado en HIF-1 α . Los resultados obtenidos indicaron que tanto TNKS1 como TNKS2 contribuyen al efecto observado sobre la estabilidad y actividad del factor HIF-1 α . No obstante, mientras que en la línea HeLa parece que la contribución de TNKS1 es mayor que la de TNKS2, en la línea LN229 parecen que ambas tankirasas contribuyen de la misma forma. Estas diferencias observadas podrían ser debido a que se tratan de dos modelos de cáncer distintos que presentan diferentes niveles de TNKS1 y TNKS2. Para poder responder a esta pregunta deberíamos incluir un tercer modelo y observar si los silenciamientos individuales siguen una tendencia similar a la de la línea HeLa o más bien como la línea LN229. A pesar de estas diferencias en cuanto a los modelos, este bloque de resultados parece apuntar a que ambas son necesarias en el mecanismo de regulación de HIF-1 α . TNKS1 y TNKS2 comparten la mayoría de las funciones, así como los sustratos sobre los que actúan, de manera que se ha visto que en caso de que faltase alguna de las dos, su actividad podría ser compensada por la otra. No obstante, también se ha comprobado que ambas son necesarias para llevar a cabo ciertas funciones como por ejemplo la formación del uso mitótico o la cohesión de los telómeros [306]. En nuestro caso, al llevar a cabo los silenciamientos individuales sí que hemos apreciado un efecto sobre HIF-1 α , por lo que esto indicaría que ambas tankirasas son

DISCUSIÓN

necesarias para mantener esta función. Además, en las dos líneas celulares testadas el mayor efecto fue detectado al realizar el doble silenciamiento de tankirasa, lo cual parece indicar que hay un efecto de cooperación entre TNKS1 y TNKS2 y que por lo tanto sería mejor eliminar ambas.

En el caso de la línea HeLa, las diferencias sobre los distintos genes podrían deberse a las diferencias detectadas en los niveles de proteína de HIF-1 α . Con el silenciamiento individual de TNKS1 y TNKS2 los niveles de HIF-1 α caían, aunque en el caso de TNKS2 la caída era menor, es decir, que seguía quedando una mayor cantidad de HIF-1 α respecto al silenciamiento de TNKS1. Esto nos llevó a pensar que esa leve diferencia podría ser la causante de que algunos genes no disminuyeran su expresión tras silenciar TNKS2, puesto que los niveles de HIF-1 α eran suficientes para seguir induciendo la expresión de genes como *CA9*, *PFKFB4* o *HK2*, pero no *PDK1* y *BNIP3*, cuya expresión cayó en todos los casos por igual.

Los resultados del silenciamiento génico transitorio fueron confirmados en una línea HeLa *KO* y *KD* para TNKS1, aunque no pudimos generar un doble *KO* de TNKS1/2 debido a que los clones *KO* crecían demasiado lentos y se dividían de manera aberrante generando sincitios con múltiples núcleos. Estos problemas no fueron percibidos en el *KD* de TNKS1, ya que su crecimiento fue normal. Se ha demostrado que tankirasa participa en la segregación de la zona telomérica de las cromátidas hermanas y en la formación del huso mitótico [337–339]. De esta manera, la ausencia total, pero no parcial de TNKS1 podría dar lugar a la segregación aberrante de los cromosomas y otros problemas en la mitosis. Esto podría ser uno de los motivos por los cuales los dos clones *KO* tenían problemas para crecer y el clon *KD* no.

Mecanismo de interacción de tankirasas y la estabilidad y actividad transcripcional de HIF-1 α

El hecho de que existiese un efecto sobre HIF-1 α mediado por tankirasas nos hizo querer profundizar en su posible interacción con el fin de conocer el mecanismo. Por ello llevamos a cabo tanto la inmunoprecipitación de ambas tankirasas como la de HIF-1 α . Tras inmunoprecipitar tankirasas no pudimos detectar HIF-1 α , aunque al inmunoprecipitar HIF-1 α sí que pudimos

detectar TNKS1 en hipoxia. Además, vimos que al inhibir la actividad catalítica de tankirasas dicha interacción aumentaba de manera considerable tanto en normoxia como en hipoxia, llegando a detectar ambas tankirasas. El hecho de que la interacción aumentase en este caso lo relacionamos con el aumento de la cantidad de TNKS1/2 que se produce tras la inhibición. Sin embargo, esta diferencia de resultados nos llevó a realizar una aproximación más precisa con el fin de confirmar la interacción de tankirasas con HIF-1 α . Llevamos a cabo un análisis proteómico de las proteínas que interaccionan con TNKS1/2 tras su inmunoprecipitación, aunque nuevamente no fuimos capaces de detectar la presencia de HIF-1 α . Ante este problema, recurrimos a la profesora Smith (NYU, USA), una de nuestras colaboradoras y expertas en tankirasas, para que nos aconsejara. Ella nos comentó que es muy complicado detectar los sustratos de tankirasa tras haber inmunoprecipitado únicamente la proteína endógena y que por ello lo que se suele hacer es sobreexpresarla mediante la transfección con un plásmido como han hecho en otros trabajos [307]. De hecho, en la proteómica de tankirasa sólo detectamos alguno de los sustratos conocidos como GMD, TAB182 y axina 1, pero no detectamos la presencia de otros como RNF146, TRF1, PTEN, 3BP2, por lo que eso explicaría por qué tampoco pudimos detectar HIF-1 α .

Así pues, realizamos un ensayo de ligación por proximidad. Esta es una técnica más sensible que la inmunoprecipitación, ya que permite detectar y cuantificar aquellas interacciones que son muy débiles o difíciles de detectar [377]. Los resultados obtenidos confirmaron la interacción entre las tankirasas y HIF-1 α en normoxia e hipoxia tanto en el compartimento citosólico como nuclear. Este hecho nos causó bastante curiosidad pues HIF-1 α en condiciones de normoxia es degradado constantemente en el proteasoma, aunque sabemos que eso no significa que no se pueda detectar algo de HIF-1 α en normoxia. Dicho resultado nos hizo plantearnos si la interacción de HIF-1 α con las tankirasas podría ser necesaria para su estabilidad y/o degradación a través de una vía independiente a la mediada por las PHDs y VHL. De hecho, no sería el primer caso, pues hasta el momento se ha descrito que algunas proteínas como p53 y PTEN pueden mediar la degradación

DISCUSIÓN

de HIF-1 α en el proteasoma a través de la ubiquitina ligasa MDM2. La chaperona HSC70 también puede promover la degradación de HIF-1 α vía lisosomal [378].

Dado que habíamos demostrado su interacción tanto en normoxia como en hipoxia comenzamos estudiando el posible mecanismo a nivel de proteína. Primero nos centramos en la degradación, ya que uno de los mecanismos más estudiados en relación a las tankirasas es el de PARdU o ubiquitinación dependiente de PARilación. Tankirasa PARila a sus sustratos y posteriormente la ubiquitina E3 ligasa RNF146 actúa reconociendo los sustratos PARilados para marcarlos con una cadena de ubiquitinas y así desencadenar su degradación en el proteasoma [316]. Sin embargo, los resultados apuntaron a que las tankirasas no regulan HIF-1 α a través de la degradación proteasomal. Como alternativa y dada la implicación de las tankirasas en la autofagia de los peroxisomas [307], estudiamos la ruta de degradación autofago-lisosomal, pero también descartamos esta vía como posible mecanismo. A nivel de proteína también estudiamos el proceso de síntesis de HIF-1 α . Existen múltiples proteínas como YB-1, ATR, TTP y CPEB1/2 que pueden regular el proceso de traducción de HIF-1 α mediante su asociación al extremo 5' UTR o 3' UTR del ARNm del mismo [375]. También se ha demostrado el papel que los ARN no codificantes también pueden jugar en la síntesis de HIF-1 α como por ejemplo los micro ARNs (miRNA) miR-17-92, miR-199a, miR-519 [379] o el ARN largo no codificante (lncRNA) HITT [380]. Para estudiar si las tankirasas estaban implicadas en la síntesis de proteína de HIF-1 α estudiamos la asociación de su ARNm con los polisomas. Sin embargo, no detectamos cambios significativos en el perfil de distribución del ARNm de HIF-1 α tras el doble silenciamiento de las tankirasas, así que descartamos la hipótesis de que la pérdida de tankirasas estuviera comprometiendo su síntesis.

El hecho de que las tankirasas no estuvieran mediando ni la degradación ni la síntesis de HIF-1 α nos llevó a buscar nuevos posibles mecanismos que explicasen la interacción de ambas proteínas tanto en normoxia como en hipoxia. En un principio pensamos que las tankirasas podrían regular la degradación de HIF-1 α , aunque los resultados relacionados con la degradación a través del

proteasoma y la ruta autofago-lisosomal indicaron que no se estaba produciendo a este nivel. No obstante, posteriormente hemos pensado que podría tratarse de alguna ruta alternativa que no hemos estudiado. A pesar de que el mecanismo principal de degradación de HIF-1 α sea a través del proteasoma, cada vez son más los estudios en los que se describen nuevos mecanismos de degradación de este factor de transcripción. Recientemente se ha descrito que HIF-1 α puede degradarse a través del proceso de autofagia mediada por chaperonas tanto en normoxia como en hipoxia [381]. Otro estudio reveló que la hidrolasa Cezanne regulaba la estabilidad de HIF-1 α , de manera que la falta de dicha proteína promovía la degradación del factor de transcripción a través de una vía independiente a la del proteasoma. Si bien es cierto que a pesar de no descifrar el mecanismo exacto, los autores lanzaron la hipótesis de que la degradación podría ser a través de la autofagia mediada por chaperonas [382]. En este trabajo, sólo se ha contemplado la macroautofagia, un tipo de autofagia en el que se produce la formación de autofagosomas. Aun así, existen otros casos como la microautofagia o la autofagia mediada por chaperonas en las que no se requiere la formación de estas vesículas [383], de manera que las tankirasa podrían estar mediando la degradación de HIF-1 α a través de uno de estos mecanismos.

Finalmente, descubrimos que el efecto que las tankirasa ejercen sobre los niveles de proteína de HIF-1 α y su actividad como factor de transcripción estaban mediados, al menos en gran parte, a través de la regulación de su transcripción. Ante este resultado nos planteamos dos posibles hipótesis. La primera es que fuese la propia tankirasa la que regulase directamente la transcripción de HIF-1 α y la segunda sería que tankirasa mediase la transcripción de manera indirecta a través de alguno de sus múltiples sustratos, conocidos o no. A día de hoy no existe ningún trabajo publicado en el que se describa que las tankirasa puedan actuar como factores de transcripción, así que en principio pensamos que podría ser más probable la segunda hipótesis. De hecho, el papel que ejercen las tankirasa sobre β -catenina y los genes dependientes de la ruta Wnt no está mediado por la interacción directa entre ambas proteínas, sino que se trata de un efecto indirecto que se produce a través de la proteína axina 1 (sustrato de tankirasa) [312]. Es cierto que al realizar

DISCUSIÓN

el array de genes regulados durante hipoxia detectamos que la expresión de 5 genes con funciones muy diversas (*COP55*, *MAP3K1*, *PFKP*, *SLC16A3* y *TXNIP*) se veía modificada por las tankirasas independientemente de la hipoxia. Por lo tanto, esto podría significar que alguno de los sustratos de TNKS1/2 es un factor de transcripción o regula a su vez a un factor de transcripción responsable de los cambios en la transcripción de HIF-1 α , así como de los otros genes mencionados.

Todos estos resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que existen dos posibles mecanismos que relacionan las tankirasas con el factor de transcripción HIF-1 α . Por un lado, hemos demostrado que HIF-1 α interacciona con ambas tankirasas tanto en normoxia como en hipoxia, aunque a día de hoy no hemos logrado descifrar el sentido funcional de dicha interacción. No obstante, hemos encontrado un posible candidato a TBM presente en extremo N-terminal de HIF-1 α (RNLLQG) que habría que validar. Por otro lado, hemos descrito el efecto que conlleva la pérdida de ambas tankirasas, así como la contribución de cada una de ellas en varios modelos tumorales sobre la estabilidad y actividad transcripcional de HIF-1 α . Tras contemplar varias hipótesis, finalmente hemos concluido que la pérdida de las tankirasas, pero no su inhibición, provoca una disminución de la transcripción de HIF-1 α , tanto en normoxia como en hipoxia. Como consecuencias de este efecto, las células contienen unos niveles de HIF-1 α inferiores en comparación a los de las células que sí tienen tankirasas, lo cual dificulta que éste pueda llevar a cabo su función como factor de transcripción cuando la célula se somete a condiciones de hipoxia. Ante la falta de HIF-1 α , HIF-2 α puede actuar regulando aquellos genes que tiene en común con HIF-1 α . Sin embargo, no puede regular aquellos genes cuya inducción se ha descrito que depende exclusivamente de HIF-1 α como por ejemplo las proteínas que intervienen en la glicólisis y la autofagia [77]. Es por ello por lo que, en nuestro modelo la ausencia de tankirasas también conlleva una disminución de los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa (*CA9*, *HK2*, *PDK1*, *PFKFB3* y *PFKFB4*) y la mitofagia (*BNIP3*).

Efecto diferencial del silenciamiento y la inhibición de tankirasas

Un resultado especialmente complejo y desafiante es el de la diferencia de efectos que hay entre la inhibición catalítica y el silenciamiento de tankirasas. La mayoría de los efectos descritos en los que participan las tankirasas parecen estar relacionados con su actividad catalítica, de manera que los resultados de la inhibición y el silenciamiento suelen ir en consonancia [312,315]. En nuestro caso esto no ha sido así, pero pensamos que podría ser porque se trata de una función de tankirasa que es independiente del dominio catalítico PARP. Recientemente se ha descrito que tankirasa a través de su dominio ANK puede ejercer funciones independientemente de su actividad catalítica [272] y aunque no hemos podido descifrar si es un efecto mediado directamente por tankirasas o es un efecto indirecto mediado por un tercer miembro, todo parece apuntar a que podría tratarse de un mecanismo que no requiere de su actividad PARiladora. Un ejemplo de esto es la función de anclaje que ejerce tankirasa en el proceso de pexofagia [307]. TNKS1/2 actúan como proteínas de anclaje mediando la interacción entre PEX14 (peroxisoma) y ATG9A (autofagosomas) para inducir el proceso de pexofagia (**Figura 18D**). En este caso, la inhibición catalítica tampoco produjo el mismo efecto que el silenciamiento génico transitorio de ambas tankirasas.

Es por ello por lo que decidimos probar un nuevo inhibidor del dominio ANK que bloquea la interacción de tankirasas con el TBM de sus sustratos (3TBP-CTPR6) [354]. Las distintas pruebas preliminares llevadas a cabo mostraron que el inhibidor se encontraba en el interior de las células y que, además los niveles de TNKS1/2 no se acumularon de la misma forma que al utilizar el inhibidor catalítico G007-LK. Sin embargo, los efectos observados sobre las proteínas sustratos de tankirasas fueron muy débiles al compararlos con el efecto de la inhibición catalítica, por lo que nos preguntamos si el inhibidor verdaderamente estaba funcionando. Los resultados obtenidos al incorporar el tratamiento de hipoxia no fueron los esperados, ya que los niveles de HIF-1 α no disminuyeron tras el uso del inhibidor 3TBP-CTPR6. Además, en este caso tampoco vimos ningún acúmulo ni de axina 1 ni de RNF146 tras el uso del inhibidor, a pesar de detectar la presencia del

DISCUSIÓN

péptido en el interior de la célula. Esto nos hizo pensar varias opciones y es que quizás el inhibidor 3TBP-CTPR6 no estaba uniéndose correctamente a TNKS1/2. Frente a esta opción valoramos llevar a cabo una inmunoprecipitación del inhibidor a través de la molécula de hemaglutinina a la que está unido y comprobar si existe la unión a TNKS1/2. Otra posibilidad que contemplamos es que el inhibidor sí estuviera funcionando, pero que el efecto de tankirasas sobre HIF-1 α no estuviera mediado por el dominio ANK, sino a través del dominio SAM. Esta hipótesis explicaría por qué al usar el inhibidor del dominio ANK no obtuvimos un efecto sobre los niveles de HIF-1 α , pero no que los sustratos de tankirasa (RNF146 y axina 1) no se acumulasen a pesar de la inhibición del dominio ANK. Así pues, decidimos descartar su uso hasta poder asegurarnos de que el inhibidor estaba funcionando realmente. Además, para confirmar esta hipótesis vamos a realizar experimentos de mapeo de la interacción de dominios mediante la técnica de *GST-pull down*.

Por último, tras describir la relación entre tankirasas y la transcripción de HIF-1 α , decidimos centrarnos en la aplicación funcional de nuestro modelo. Ya habíamos demostrado que al llevar a cabo el doble silenciamiento de las tankirasas se producía una disminución en la expresión de genes relacionados con la glicólisis (*CA9*, *HK2*, *PDK1*, *PFKFB3* y *PFKFB4*) y la autofagia (*BNIP3* y *DDIT4*) debido a que la transcripción de HIF-1 α estaba comprometida. Como la mayoría de los genes alterados participaban en la glicólisis, decidimos comprobar si dicha ruta se veía afectada tras la pérdida de tankirasas. Hasta el momento habíamos obviado dos genes (*PFKP* y *SLC16A3*) relacionados con la glicólisis, cuya expresión parecía estar regulada por tankirasa independientemente de la presencia de hipoxia. No obstante, como nos quisimos centrar en la ruta glicolítica, decidimos incluirlos en el estudio. Los resultados mostraron que hubo una disminución en los niveles de proteína de CA9, HK2, PFKP, PFKFB4 y BNIP3 tras la pérdida de TNKS1 o de ambas tankirasas en la línea HeLa y LN229. En cuanto al efecto del silenciamiento individual de TNKS1 y doble en hipoxia, nuevamente detectamos el mayor efecto para la mayoría de las proteínas tras el silenciamiento de TNKS1/2, lo cual apoya nuestra hipótesis de la cooperación entre TNKS1 y TNKS2 en el efecto descrito sobre HIF-1 α .

De los 7 genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, 5 son enzimas que participan directamente en el proceso de glicólisis (**Figura 52**). La hexoquinasa 2 (HK2) es la primera enzima de la glicólisis y se encarga de transformar la glucosa en glucosa-6-fosfato [384]. La PFKP o fosfofructoquinasa plaquetaria es una de las isoenzimas de la enzima PFK-1. Esta enzima controla principalmente el flujo glicolítico a través de la transformación de fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-bisfosfato [385]. Sin embargo, se encuentra principalmente inactiva, por lo que requiere de activadores alostéricos para su modulación. El principal activador alostérico es la fructosa-2,6-bisfosfato, molécula que se obtiene gracias a las enzimas PFKFB3/4 a partir de fructosa-6-fosfato. Estas enzimas, a diferencia de las mencionadas previamente, tienen tanto actividad quinasa como fosfatasa, por lo que pueden regular la cantidad de fructosa-2,6-bisfosfato presente en la célula para así fomentar la glicólisis [386]. En condiciones de normoxia, el producto final de la glicólisis suele ser acetil-CoA, que servirá para producir energía a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. La obtención de acetil-CoA está mediada por la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH). Sin embargo, ante la falta de oxígeno la célula pone en marcha varios mecanismos para no recurrir a la fosforilación oxidativa como por ejemplo disminuir la formación de acetil-CoA. En lugar de este intermediario se fomenta la producción de lactato a través de la enzima LDH-A para obtener energía [387]. Asimismo, se induce la expresión de la enzima PDK1, cuya función es inhibir la PDH y con ello la producción de acetil-CoA [388] (**Figura 52**). Ante la elevada producción de lactato e iones H^+ , el medio intracelular tiende a acidificarse, por lo que la célula también pone en marcha mecanismos para evitar la alteración del pH como la expresión de transportadores de lactato como MCT4 (gen *SLC16A3*) e iones como la enzima CA9 o anhidrasa carbónica 9 [167,169]. Esta enzima cataliza de manera reversible la hidratación de CO_2 , dando lugar a bicarbonato e iones H^+ y se ha demostrado que contribuye al mantenimiento del pH intracelular y en el caso del cáncer, puede favorecer la progresión tumoral [389]. En el caso de BNIP3, se ha descrito que ante una situación de hipoxia la célula induce su expresión como mecanismo para disminuir la fosforilación oxidativa a través de la eliminación de las mitocondrias por la vía autofágica [166].

DISCUSIÓN

Estos resultados obtenidos en dos líneas tumorales distintas nos confirmaron que la pérdida de tankirasas compromete la expresión de varias proteínas necesarias para realizar la glicólisis. Por ello nos dispusimos a analizar la glicólisis a través de los niveles de lactato en el medio extracelular. Uno de los cambios mejor descritos en la célula tumoral es el efecto *Warburg*, a través del cual la principal fuente de energía celular deja de ser la fosforilación oxidativa y pasa a ser la glicólisis anaerobia, caracterizada por el aumento en la producción de lactato, el cual es expulsado al exterior de la célula para mantener el pH intracelular [390]. Los niveles de lactato extracelular se vieron reducidos en un 20% en las líneas HeLa y LN229 al silenciar ambas tankirasas en hipoxia, indicando que la glicólisis podría estar comprometida tras la pérdida de TNKS1/2.

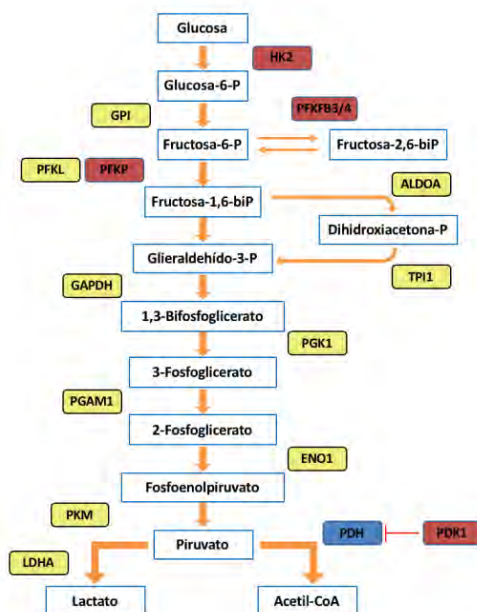


Figura 52. Enzimas que intervienen en la ruta glicolítica. Imagen en la que se representa el proceso de glicólisis, así como las enzimas que intervienen en él y los distintos sustratos. Las enzimas que están en rojo son aquellas cuya expresión se vio reducida tras el doble silenciamiento de TNKS1/2.

Todos los resultados obtenidos en este capítulo de la tesis parecen indicar que tanto TNKS1 como TNKS2 pueden modular la transcripción del factor HIF-1 α . Aún nos quedaría por concluir si es un efecto directo o indirecto, pero lo que está claro es que estamos ante la descripción de un nuevo mecanismo por el que las tankirasas regulan la adaptación de las células tumorales a la hipoxia mediada por HIF-1 α . Por lo tanto, este mecanismo abre una nueva ruta de estudio de tankirasas

que podría ser de gran ayuda a la hora de buscar nuevos tratamientos frente a la hipoxia. La pérdida de las tankirases da lugar a una disminución drástica de la inducción de ciertos genes que están regulados exclusivamente por HIF-1 α como es el caso de las enzimas clave en el proceso de glicólisis (HK2 y PFKFB3/4), el mantenimiento del pH intracelular (CA9) y la mitofagia (BNIP3) (**Figura 53**). La inhibición de la glicólisis podría ser de gran ayuda como tratamiento frente al cáncer, puesto que el efecto *Warburg* es uno de los pilares fundamentales del metabolismo de las células tumorales y con ello se podría evitar su adaptación a la hipoxia sin afectar a las células normales, cuyo fuente metabólica recae principalmente en la fosforilación oxidativa [390,391]. Además, queremos seguir indagando otras implicaciones de estas proteínas, ya que por ejemplo existen estudios que relaciona a la proteína PFKFB3 con el metabolismo de las células endoteliales y el proceso de angiogénesis [392,393]. También se ha publicado recientemente otro estudio en el que se analiza la correlación de CA9 y PFKFB4 y su implicación en la inducción de EMT y la migración celular [394]. Por lo tanto, la descripción de este mecanismo adjudica una nueva función a estos miembros de la familia PARP a la vez que amplía el conocimiento sobre la señalización en hipoxia.

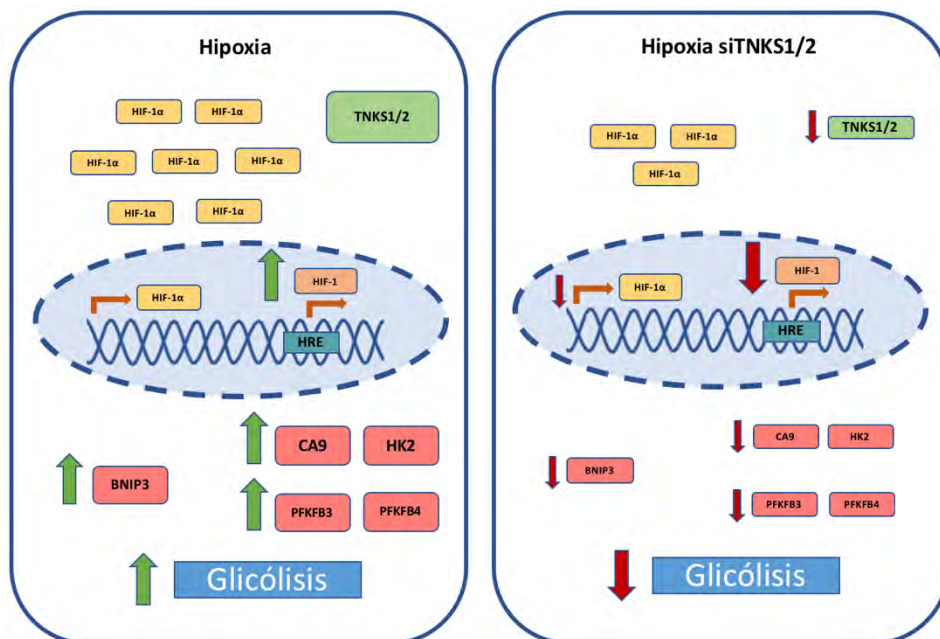


Figura 53. Tankirases regula múltiples proteínas implicadas en la glicólisis a través de HIF-1 α . La falta de TNKS1/2 conlleva una disminución de la transcripción de HIF-1 α , lo cual provoca a su vez que disminuya su actividad como factor de transcripción induciendo genes que fomentan la glicólisis en las células bajo condiciones de hipoxia.

DISCUSIÓN

B) Papel de las tankirasas en la formación de mimetismo vasculogénico

Los tumores, ante la falta de una vascularización que permita la correcta distribución de O_2 y nutrientes, ponen en marcha múltiples mecanismos para suplir la alta demanda metabólica [194]. De entre los diferentes mecanismos de vascularización tumoral descritos, en el mimetismo vasculogénico (VM) nos encontramos con una situación peculiar. A diferencia de otros procesos angiogénicos, las células endoteliales no participan en el VM, sino que son las propias células tumorales las que llevan a cabo la formación de canales o pseudovasos capaces de administrar nutrientes y O_2 . El fenómeno de VM fue descrito por primera vez en células de melanoma y posteriormente en tumores de colon, pulmón, hígado, próstata, cabeza y cuello, mama, glioblastoma, mieloma múltiple y sarcoma de Ewing [193]. Su presencia se ha asociado con un incremento de la progresión tumoral [204], por lo que es necesaria la búsqueda de tratamientos que impidan su formación.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio revelaron la importancia de la proteína VE-cadherina y la fosforilación del residuo de Y658 en la formación de mimetismo vasculogénico en células de melanoma uveal y cutáneo, así como el efecto de la inhibición PARP en el proceso de reclutamiento de pericitos y normalización vascular [229,249]. Esta cadherina, en las células tumorales de melanoma ha resultado tener un comportamiento diferente al de las células endoteliales. En las células VM⁺, VE-cadherina se encuentra fosforilada de manera constitutiva por la quinasa FAK y dicha fosforilación promueve su translocación al núcleo y la formación de un complejo junto a p120. Este complejo lleva a cabo el secuestro del represor *kaiso*, promoviendo así el proceso de VM a través de la inducción de los genes reprimidos por *kaiso* (*WNT11* y *CCND1*) [229].

Dada la relevancia de VE-cadherina, decidimos analizar la relación entre su expresión y la de las tankirasas a través de un estudio de *CBioportal* que contenía muestras de pacientes de melanoma

uveal y cutáneo. Los gráficos obtenidos mostraron que existía una correlación negativa y significativa entre la expresión de VE-cadherina (CDH5) y TNKS1 en ambos tipos de melanoma. Dada la correlación de VE-cadherina y TNKS1, decidimos estudiar el efecto de la inhibición catalítica sobre la expresión de VE-cadherina. Tras el uso de G007-LK en la línea de melanoma uveal MUM2B, los niveles de proteína de VE-cadherina disminuyeron de manera drástica. En este caso sí que detectamos un efecto tras la inhibición de tankirasas. Lo siguiente que hicimos fue llevar a cabo un estudio proteómico tras la inmunoprecipitación de VE-cadherina con el fin de determinar el interactoma de VE-cadherina en células capaces de inducir VM y comprobar si interaccionaba con tankirasas. Los resultados indicaron que no existe una relación directa entre ambas proteínas, aunque sí que detectamos la presencia de β -catenina y δ -catenina (p120). En nuestro laboratorio se había descrito previamente la importancia de la interacción entre VE-cadherina y p120 para la formación de VM. Como no detectamos TNKS1/2 como proteínas directamente asociadas a VE-cadherina, eso nos hizo pensar que el efecto observado sobre VE-cadherina estaba mediado de manera indirecta por otra proteína. Por ello buscamos otros candidatos entre las proteínas detectadas en la proteómica y la mejor opción que encontramos que podía relacionar tankirasa con VE-cadherina fue β -catenina.

El hecho de que los inhibidores de tankirasa se usen actualmente como inhibidores de la ruta Wnt/ β -catenina [347] nos hizo plantearnos si el efecto observado en VE-cadherina tras el uso del inhibidor de tankirasa G007-LK podría estar mediado por β -catenina. Tankirasa regula la degradación de la proteína axina 1 a través del mecanismo de PARdU (**Figura 18A**). Axina 1 forma parte del complejo de degradación de β -catenina, de manera que cuando tankirasa es inhibida, no puede llevar a cabo la PARilación de axina 1 y esta no es degradada en el proteasoma. Por lo tanto, la acumulación de axina 1 conlleva un aumento en la degradación de β -catenina [312].

Se ha demostrado que la interacción entre VE-cadherina y β -catenina en las células endoteliales es determinante para el mantenimiento de la integridad de la barrera vascular. La unión entre

DISCUSIÓN

ambas proteínas mantiene la estabilidad de las uniones adherentes entre las células endoteliales, de manera que cuando se bloquea dicha interacción se puede producir una pérdida de la integridad vascular, dando lugar a la extravasación de células y fluidos fuera del sistema vascular [395]. Sin embargo, hasta el momento no se había estudiado el papel de esta interacción en la formación de mimetismo vasculogénico. Por ello comparamos los niveles de β -catenina y de su forma activa en una línea de melanoma uveal VM⁺ (MUM2B) con los de una línea VM⁻ (MUM2C). Estas líneas no sólo difieren en su capacidad para realizar VM, sino también en la expresión de VE-cadherina ya que sólo la línea MUM2B expresa este marcador. Los niveles totales tanto de β -catenina total como de β -catenina activa fueron similares en ambas líneas. No obstante, al realizar un subfraccionamiento citosol-núcleo observamos que mientras que la línea MUM2C expresa β -catenina activa tanto en el citoplasma como en el núcleo, la línea MUM2B sólo la expresa en el núcleo. La presencia de β -catenina activa únicamente en el núcleo, nos hizo considerar que su interacción con VE-cadherina en nuestro modelo, a diferencia de las células endoteliales, se producía a nivel nuclear y que esta interacción podría estar modulando la expresión de genes dependientes de la ruta Wnt/ β -catenina. Para ello se realizaron inmunoprecipitaciones que confirmaron la formación de un complejo de VE-cadherina con β -catenina y el factor de transcripción TCF4. El factor TCF4 es un regulador clave de la ruta Wnt/ β -catenina [396], aunque hasta el momento tampoco se había descrito su interacción con VE-cadherina.

Finalmente, llevamos a cabo el silenciamiento génico de β -catenina con el fin de corroborar nuestra hipótesis de que el efecto observado al inhibir tankirasas estaba mediado a través de dicha proteína. La pérdida parcial de β -catenina se tradujo en una disminución de los niveles tanto de VE-cadherina total como de su forma fosforilada en el residuo de Y658. Los resultados obtenidos hasta ahora parecían indicar que existe un complejo formado por VE-cadherina, β -catenina y el factor de transcripción TCF4 que podría ser relevante para la formación de VM. La estabilidad de VE-cadherina también se ve afectada por este complejo, puesto que la disminución de los niveles

de β -catenina, ya sea a través de la inhibición de tankirasas o mediante su silenciamiento génico, provocaron que los niveles de VE-cadherina se redujeran de manera considerable. En nuestro laboratorio ya se había descubierto que la interacción entre VE-cadherina con la catenina p120 era esencial, no solo para la formación de VM sino también para proteger la integridad de VE-cadherina. Para que se produzca dicha interacción, es necesario que VE-cadherina esté fosforilada en su residuo de Y658. En las células de melanoma, a diferencia de las células endoteliales, la quinasa FAK responsable de mediar la fosforilación del residuo de Y658 se encuentra activa de manera permanente. Es por ello por lo que la inhibición de FAK bloquea la formación del complejo VE-cadherina/p120 promoviendo así la degradación de VE-cadherina vía autofagia [229,231]. Así pues, pensamos que la pérdida de β -catenina también puede promover la degradación de VE-cadherina probablemente a través de esta vía de degradación.

Con el fin de estudiar la implicación del complejo VE-cadherina/ β -catenina/TCF4 en la formación de VM, llevamos a cabo varias aproximaciones para inhibir su formación en la línea VM⁺ MUM2B. Tanto la inhibición de las tankirasas, como el silenciamiento de β -catenina y de TWIST1, uno de los genes regulados por β -catenina y TCF4 redujeron de manera significativa el número de *loops*, indicando que la formación de VM estaba comprometida. Por lo tanto, en este segundo capítulo de la tesis hemos demostrado la existencia de un nuevo mecanismo de VM mediado por el complejo formado por VE-cadherina, β -catenina y el factor de transcripción TCF4 que se produce a nivel nuclear. Este complejo induce la formación de VM a través de la regulación de genes de la ruta Wnt/ β -catenina como TWIST1. Además, corrobora la relevancia de VE-cadherina en el proceso de VM, ya sea por su interacción con p120/*Kaiso* o β -catenina/TCF4 (**Figura 54**). En ambos casos, la disrupción del complejo conlleva la degradación de VE-cadherina, de manera que podría ser una buena diana terapéutica para evitar la formación de VM.

En este caso, las tankirasas no han resultado tener un papel directo sobre el mecanismo descubierto, sino que actúan a través de la degradación de β -catenina mediada por axina 1. β -

DISCUSIÓN

catenina juega un papel relevante en la malignización del cáncer colorrectal y pulmonar, de manera que se han llevado a cabo numerosos estudios para probar el efecto de los inhibidores de tankirasa como posible tratamiento en modelos de cáncer de colon y pulmón tanto *in vitro* como *in vivo* (Tabla 4) [272]. No obstante, hemos descubierto una nueva aplicación de los inhibidores de tankirasa para evitar la formación de VM en melanoma uveal, que convendría estudiar y confirmar en otros modelos tumorales capaces de formar VM.

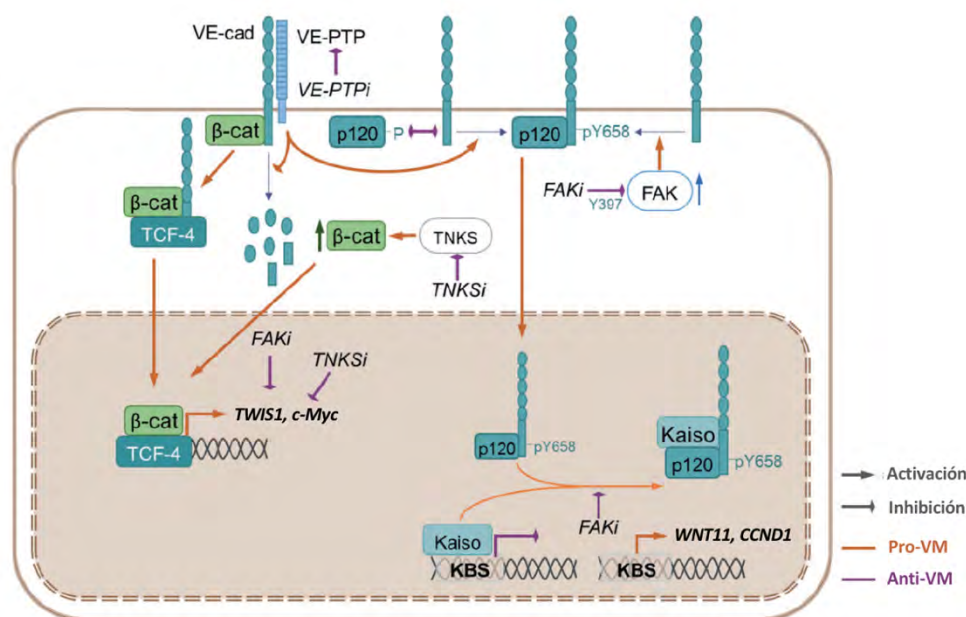


Figura 54. Mecanismos de mimetismo vasculogénico mediados por VE-cadherina. VE-cadherina promueve la formación de mimetismo vasculogénico a través de varios mecanismos que median la inducción de múltiples genes. Por un lado, forma un complejo con la catenina p120 y Kaiso para promover la expresión de genes reprimidos por Kaiso (*WNT11*, *CCND1*) y también forma un complejo con β-catenina/TCF4 para inducir la expresión de genes de la ruta Wnt (*c-Myc* y *TWIST1*).

En conjunto, los resultados de este trabajo apoyan el creciente interés que las tankirasas han estado adquiriendo durante los últimos años en el contexto del cáncer. Este grupo de proteínas puede llegar a jugar un papel importante en varios aspectos relevantes del microambiente tumoral tales como la adaptación a la hipoxia o la formación de mimetismo vasculogénico. Por ello creemos que es necesario seguir investigando con el fin de elucidar todas las interacciones estructurales y funcionales que permitan definir el papel biológico y patológico de las tankirasas en el desarrollo tumoral y abrir nuevas oportunidades terapéuticas que contrarresten la ventaja adaptativa que supone para el tumor desarrollarse en un ambiente hipóxico.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

- 1) Both tankyrases present a low rate of genetic alterations in cancer.
- 2) The inhibition of tankyrases with XAV939 and G007-LK does not alter the stability or activity as transcription factor of HIF-1 α in multiple tumor cell lines such as HeLa, MUM2B, LN229 and U87MG.
- 3) The double silencing of TNKS1/2 reduces the levels of HIF-1 α protein, but not HIF-2 α or HIF-1 β , in the same tumor cell lines mentioned above.
- 4) The double silencing of TNKS1/2 also downregulates the expression of multiple HIF-1 α - dependent genes involved in metabolism including *CA9*, *HK2*, *PDK1*, *PFKFB3/4*, *BNIP3* and *DDIT4*.
- 5) Tankyrase 1 and 2 interact with HIF-1 α under normoxic and hypoxic conditions.
- 6) Tankyrases regulate HIF-1 α stability and activity, at least in part, through the modulation of its mRNA levels
- 7) The double silencing of both tankyrases decreases the levels of multiple glycolytic proteins including CA9, HK2, PFKFB4 and PFKFP through HIF-1 α disabling. This effect results in a reduction in the levels of extracellular lactate in HeLa and LN229 cell lines.
- 8) Tankyrase inhibition with G007-LK diminishes the levels of VE-cadherin, affecting the ability to form vasculogenic mimicry in uveal melanoma cells.
- 9) TNKS1/2 have a role in vasculogenic mimicry through the modulation of β -catenin protein levels.
- 10) β -catenin forms a complex with TCF4 and VE-cadherin that increases the formation of vasculogenic mimicry through the modulation of Wnt dependent genes such as TWIST1.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Ambas tankirasas presentan una baja tasa de alteraciones genéticas en cáncer.
- 2) La inhibición de las tankirasas con XAV939 y G007-LK no altera la estabilidad ni la actividad como factor de transcripción de HIF-1 α en las líneas celulares tumorales HeLa, MUM2B, LN229 y U87MG.
- 3) El doble silenciamiento de TNKS1/2 reduce los niveles de la proteína HIF-1 α , pero no de HIF-2 α o HIF-1 β , en las mismas líneas celulares tumorales mencionadas previamente.
- 4) El doble silenciamiento de TNKS1/2 también disminuye la expresión de múltiples genes dependientes de HIF-1 α implicados en el metabolismo, incluyendo CA9, HK2, PDK1, PFKFB3/4, BNIP3 y DDIT4.
- 5) Tankirasa 1 y 2 interactúan con HIF-1 α en condiciones de normoxia e hipoxia.
- 6) Las tankirasas regulan la estabilidad y actividad de HIF-1 α , al menos en parte, mediante la modulación de sus niveles de ARNm.
- 7) El doble silenciamiento de ambas tankirasas reduce los niveles de múltiples proteínas glicolíticas incluyendo CA9, HK2, PFKFB4 y PFKFB3 a través de HIF-1 α . Este efecto se traduce en una reducción de los niveles de lactato extracelular en las líneas celulares HeLa y LN229.
- 8) La inhibición de tankirasas con G007-LK disminuye los niveles de VE-cadherina, afectando a la capacidad de formar mimetismo vasculogénico en células de melanoma uveal.
- 9) TNKS1/2 tienen un papel en el mimetismo vasculogénico a través de la modulación de los niveles de proteína β -catenina.
- 10) β -catenina forma un complejo con TCF4 y VE-cadherina que aumenta la formación de mimetismo vasculogénico a través de la modulación de genes dependientes de Wnt como TWIST1.

ABREVIATURAS

7. ABREVIATURAS

β2M. β2 microglobulina	ATR. <i>Ataxia telangiectasia and Rad-3 related protein</i>
3BP2. Proteína 2 de unión al dominio SH	b-HLH/PAS. hélice-bucle-hélice/Per-Arnt-Sim
ABCB. Proteína de unión al ATP	BAL. Linfoma agresivo de células B
ADN. Ácido desoxirribonucleico	BHLHB3. <i>Basic helix-loop-helix family</i>
ADP. Adenosina difosfato	BNIP3. Proteína 3 que interacciona con BCL2
ADPr. ADP-ribosa	BRCA. <i>Breast cancer</i>
AKT. PKB o proteína quinasa B	BSA. Albúmina de suero bovino
AMOT. Angiomotina	CA9. Anhidrasa carbónica 9
AMPK. Proteína quinasa activada de AMP	CAF. Fibroblasto asociado al cáncer (<i>Cancer Associated Fibroblast</i>)
ANGPT. Angiopoyetina	Cas9. <i>CRISPR asociated protein 9</i>
ANGPTL4. <i>Angiopoyentin-like 4</i>	CBP. <i>CREB-binding protein</i>
ANK. Ankirina	CCN2. Factor de crecimiento de tejido conectivo
ANOVA. Análisis de la varianza	CCND1. Ciclina D1
ARC. Clúster de repetición de ankirina (<i>Ankyrin repeat cluster</i>)	CD. Clúster de diferenciación
ARD. Dominio regulador α-hélice	CDK1. Quinasa dependiente de ciclina 1
ARN. Ácido ribonucleico	COP55. <i>COP9 signalosome subunit 5</i>
ARNm. ARN mensajero	CPEB. <i>Cytoplasmic polyadenylation element binding protein</i>
ARTD. <i>ADP ribosyl transferases diphtheria toxin-like</i>	CHX. Cicloheximida
ATCC. <i>American Type Culture Collection</i>	CK1. Caseína quinasa
ATG9. Proteína 9 relacionada con la autofagia	C-Myc. <i>C-myelocytomatosis oncogene product</i>
ATM. Ataxia telangiectasia mutada	COX. Ciclooxygenasa
ATP. Adenosina trifosfato	

ABREVIATURAS

CPAP. Proteína asociada al centrosoma

CRISPR. Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*).

Ct. Ciclo umbral

CTC. Célula tumoral circulante

CTPR. Repetición de proteínas con diseño consensuado de tetratricopéptido

CUL2. *Cullin 2*

CXCR. Receptor de quimioquinas

DDIT4. *DNA Damage Inducible Transcript 4*

DEC. Dominio extracelular dependiente de calcio

DEPC. Dietilpirocarbonato

DMEM. *Dubdeco's Modified Eagle's Medium*

DMSO. Dimetilsulfóxido

DTM. Dominio transmembrana

ECM. Matriz extracelular (*Extracellular matrix*)

EMT. Transición epitelio-mesénquima

EphA. Receptor hepatocelular humano productor de eritropoyetina

EPO. Eritropoyetina

FAK. Quinasa de adhesión focal

FBS. Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FDA. Administración de alimentos y medicamentos (*Food and Drug Administration*)

FIH. Factor inhibidor de HIF (*Hypoxia-inducible-Factor Inhibitor*)

Gag. Antígeno específico de grupo

GFP. Proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)

GLUT. Transportador de glucosa

GMD. GDP-manosa 4,6-deshidratasa

GSK3 β . Glicógeno sintasa quinasa 3 beta

HA. Hemaglutinina

HAF. Factor asociado a hipoxia

HDAC1. Histona desacetilasa 1

HER2. Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HIF. Factor inducible por hipoxia (*Hypoxia Inducible Factor*)

HITT. *HIF-1 α inhibitor at translation level*

HK2. Hexoquinasa 2

HPS. Histidina, prolina y serina

HRE. Elementos de respuesta a hipoxia

HSC70. *Heat Shock Cognate 70*

Hsp. Proteína de choque térmico

ID. Dominio inhibidor

IF4A1. Factor de iniciación de la traducción eucariota 4A1

IGF. Proteína de crecimiento similar a la insulina

IGFBP. Proteína de unión a IGF

IgG. Inmunoglobulina G

iNOS. Oxido nítrico sintasa inducible

IP. Inmunoprecipitación

IPAS. Proteína inhibidora del dominios PAS

KD. *Knockdown*

KO. *Knockout*

LAMC. Subunidad de la laminina gamma

LB. *Lysogeny Broth*

LC3. *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*

LDH. Lactato deshidrogenasa

LKB1. Quinasa hepática B1

LncRNA. ARN largo no codificante

LOX. Lisil oxidasa

MAPK. Proteína quinasa activada por mitógenos

MAR. Mono-ADP-ribosa

Mcl-1. *Myeloid leukemia cell 1*

MCT4. Transportador de monocarboxilato 4

MDM2. *Mouse double minute 2*

MERIT40. Mediador de la interacción de Rap80 y la diana de 40 kD

MET. HGF, factor de crecimiento de hepatocitos

MET. Transición mesénquima-epitelio

miRNA. Micro ARN

MMP. Metaloproteinasa de la matriz

MO25. Proteína murina 25

MXI1. Proteína 1 que interactúa con MAX

NAD. Nicotinamida adenina dinucleótido

NELFE. Miembro E del complejo del factor de elongación negativo

NHE1. Intercambiador sodio/hidrógeno 1

NODAL. Factor de diferenciación de crecimiento nodal

Notch. *Neurogenic locus notch homolog 4*

NP-40. *Nonident 40*

NuMA. Aparato mitótico nuclear

OCT-4. *Octamer-binding transcription factor 4*

ODD. Dominio de degradación dependiente de oxígeno

OMS. Organización Mundial de la Salud

P4HA. Prolil hidroxilasa de colágeno

PAR. Poli-ADP-ribosa

PARdU. Ubiquitinación dependiente de PAR

PARP. Poli-ADP-ribosa polimerasa (*Poly-ADP-ribose Polymerase*)

PAS. Ácido peryódico de Schiff

PBS. Tampón de fosfato salino (*Phosphate-buffered saline*)

PCAF. Factor asociado a p300/CBP

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

PD-L1. Ligando 1 de muerte programada

PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDH. Piruvato deshidrogenasa

PDK1. Piruvato deshidrogenasa quinasa

PECAM. Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas

PEX14. Factor 14 de biogénesis peroxisomal

PFKFB3/4. 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3/4

PFKP. Fosfofructoquinasa plaquetaria

ABREVIATURAS

PGF. Factor de crecimiento placentario

PHD. Prolil-hidroxilasa

PI3K. Fosfainositido 3 quinasa

PKA. Proteína quinasa A

PKM. Piruvato quinasa

PLA. Ensayo de ligación por proximidad

PNK. Polinucleotido quinasa

Pol. Polimerasa

PTEN. *Phosphatase and tensin homolog*

RBP. Proteína de unión al ARN (*RNA-Binding Protein*)

RBX1. *Ring Box 1*

Rev. Regulador de virión.

RL. Bucle aleatorio (*Random loop*)

RNF146. *Ring Finger Protein 146*

Rpm. Revoluciones por minuto

RPMi. *Roswell Park Memorial Institute*

RT-qPCR. PCR cuantitativa en tiempo real

S1PR1. Receptor 1 de esfingosina fosfato 1

SA1. Antígeno estromal 1

SAM. Motivo alfa estéril (*Sterile Alpha Motive*)

SCR. Scrambled

SDS-PAGE. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SEM. Error estándar

siRNA. ARN pequeño de interferencia

SIRT1. Sirtuina 1

SLC16A3. Miembro 3 de la familia de transportadores de solutos 16

SOC. *Super optimal Broth*

SOX2. *SRY-box 2*

SP1. Proteína de especificidad 1

STRAD. Adaptador alfa relacionado con STE20

TAD. Dominio de transactivación

TAM. Macrófago asociado al tumor (*Tumor-Associated Macrophage*)

Tat. Transactivador de la transcripción

TBM. Motivo de unión a tankirasa

TBP. Péptido de unión a tankirasa

TCF4. Factor de transcripción 4

TCGA. *The Cancer Genome Atlas*

TCTCE. Ambiente célula tumoral-célula tumoral (*Tumor cell-tumor cell environment*)

TE. Ambiente tumoral (*Tumor environment*)

TF. Transferrina

TFPI1. Inhibidor de la vía del factor tisular

TGF. Factor de crecimiento transformante

TIE. Tirosina quinasa con dominios similares a inmunoglobulina y a EGF

TIN2. Factor 2 nuclear de interacción asociado a telómeros

TME. Microambiente tumoral (*Tumor microenvironment*)

TNF. Factor de necrosis tumoral

TNKS. Tankirasa, tankirasa 1 (TNKS1)

TOE. Ambiente tumoral a nivel de organismo

TRF1. Factor de unión a repeticiones teloméricas

TWIST1. Proteína 1 relacionada con la torsión

TXNIP. Proteína que interactúa con la tiorredoxina

VCAM. Proteína de adhesión de células vasculares

VE-PTP. Proteína tirosina fosfatasa de endotelio vascular

VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR. Receptor de VEGF

VHL. *Von Hippel Lindau*

VIM. Vimentina

VM. Mimetismo vasculogénico (*Vasculogenic mimicry*)

VSV-G. Glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular

Wnt. *Wingless-integrated*

XRCC1. Proteína 1 del complejo cruzado de reparación de rayos X

YAP. *Yes-associated protein 1*

YB-1. *Y box binding protein 1*

ZEB1. *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bai L, Wang S. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. Vol. 65, Annual Review of Medicine. Annual Reviews Inc.; 2014. p. 139–55.
2. Odes EJ, Randolph-Quinney PS, Steyn M, Throckmorton Z, Smilg JS, Zipfel B, et al. Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans cave, South Africa. *S Afr J Sci.* 2016;112(7–8).
3. Haridy Y, Witzmann F, Asbach P, Schoch RR, Fröbisch N, Rothschild BM. Triassic Cancer - Osteosarcoma in a 240-Million-Year-Old Stem-Turtle. Vol. 5, *JAMA Oncology.* 2019.
4. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Vol. 419, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020.
5. Arneth B. Tumor microenvironment. Vol. 56, *Medicina (Lithuania).* MDPI AG; 2020.
6. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Heal.* 2020;8(2).
7. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Vol. 100, *Cell.* 2000.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell.* 2011. p. 646–74.
9. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, *Cancer Discovery.* American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31–46.
10. Obenauf AC, Massagué J. Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis. Vol. 1, *Trends in Cancer.* 2015.
11. Eddy RJ, Weidmann MD, Sharma VP, Condeelis JS. Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. Vol. 27, *Trends in Cell Biology.* 2017.
12. Stoletov K, Bond D, Hebron K, Raha S, Zijlstra A, Lewis JD. Metastasis as a therapeutic target in prostate cancer: a conceptual framework. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2(1).
13. Gosho M, Nagashima K, Sato Y. Study Designs and statistical analyses for biomarker research. Vol. 12, *Sensors (Switzerland).* 2012.
14. Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: The role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. Vol. 11, *Nature Reviews Cancer.* 2011.
15. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(1–2).
16. Guan X. Cancer metastases: Challenges and opportunities. Vol. 5, *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2015.
17. Stoletov K, Beatty PH, Lewis JD. Novel therapeutic targets for cancer metastasis. Vol. 20, *Expert Review of Anticancer Therapy.* Taylor and Francis Ltd; 2020. p. 97–109.
18. Leong HS, Robertson AE, Stoletov K, Leith SJ, Chin CA, Chien AE, et al. Invadopodia Are

BIBLIOGRAFÍA

- Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell Rep.* 2014;8(5).
19. Paget S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *Lancet.* 1889;133(3421).
20. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. Vol. 9, *Nature Reviews Cancer.* 2009.
21. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. Vol. 168, *Cell.* 2017.
22. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. Vol. 70, *Cancer Research.* 2010.
23. Strilic B, Offermanns S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. Vol. 32, *Cancer Cell.* 2017.
24. Jin MZ, Jin WL. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy.* Springer Nature; 2020.
25. Spill F, Reynolds DS, Kamm RD, Zaman MH. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. Vol. 40, *Current Opinion in Biotechnology.* 2016.
26. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Vol. 19, *Nature Medicine.* 2013.
27. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Vol. 454, *Nature.* 2008.
28. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Vol. 140, *Cell.* 2010.
29. Del Prete A, Schioppa T, Tiberio L, Stabile H, Sozzani S. Leukocyte trafficking in tumor microenvironment. Vol. 35, *Current Opinion in Pharmacology.* 2017.
30. Lebleu VS. Imaging the tumor microenvironment. Vol. 21, *Cancer Journal (United States).* 2015.
31. Korneev K V., Atretkhany KSN, Drutskaya MS, Grivennikov SI, Kuprash D V., Nedospasov SA. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. Vol. 89, *Cytokine.* 2017.
32. Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences.* 2018.
33. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. Vol. 209, *Journal of Endocrinology.* 2011.
34. Watnick RS. The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(12).
35. Hofer HR, Tuan RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. Vol. 7, *Stem Cell Research and Therapy.* 2016.

36. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. Vol. 18, *Breast Cancer Research*. 2016.
37. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. Vol. 27, *Cancer Cell*. 2015.
38. Takeuchi S, Baghdadi M, Tsuchikawa T, Wada H, Nakamura T, Abe H, et al. Chemotherapy-derived inflammatory responses accelerate the formation of immunosuppressive myeloid cells in the tissue microenvironment of human pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2015;75(13).
39. Zheng H, Bae Y, Kasimir-Bauer S, Tang R, Chen J, Ren G, et al. Therapeutic Antibody Targeting Tumor- and Osteoblastic Niche-Derived Jagged1 Sensitizes Bone Metastasis to Chemotherapy. *Cancer Cell*. 2017;32(6).
40. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: Mechanisms of resistance and recurrence. Vol. 15, *Nature Reviews Cancer*. 2015.
41. Laoui D, van Overmeire E, de Baetselier P, van Ginderachter JA, Raes G. Functional relationship between tumor-associated macrophages and macrophage colony-stimulating factor as contributors to cancer progression. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. 2014.
42. Shen M, Kang Y. Complex interplay between tumor microenvironment and cancer therapy. Vol. 12, *Frontiers of Medicine*. Higher Education Press; 2018. p. 426–39.
43. Roberts EW, Deonaraine A, Jones JO, Denton AE, Feig C, Lyons SK, et al. Depletion of stromal cells expressing fibroblast activation protein- α from skeletal muscle and bone marrow results in cachexia and anemia. *J Exp Med*. 2013;210(6).
44. Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. Vol. 5, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2017.
45. Mizutani Y, Kobayashi H, Iida T, Asai N, Masamune A, Hara A, et al. Meflin-positive cancer-associated fibroblasts inhibit pancreatic carcinogenesis. *Cancer Res*. 2019;79(20).
46. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*. 2014;25(6).
47. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. Vol. 19, *Nature Reviews Immunology*. 2019.
48. Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: Bench to bedside to biomarkers. In: *Journal of Clinical Oncology*. 2013.
49. Sanmamed MF, Chen L. A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization. Vol. 175, *Cell*. 2018.
50. Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem CJ, Gorjestani S, et al. PI3K γ 3 is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature*. 2016;539(7629).

BIBLIOGRAFÍA

51. Su S, Chen J, Yao H, Liu J, Yu S, Lao L, et al. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell*. 2018;172(4).
52. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. Vol. 221, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2021.
53. Laplane L, Duluc D, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. The Multiple Layers of the Tumor Environment. Vol. 4, *Trends in Cancer*. 2018.
54. Laplane L, Duluc D, Bikfalvi A, Larmonier N, Pradeu T. Beyond the tumour microenvironment. Vol. 145, *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 2611–8.
55. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in tumors: Pathogenesis-related classification, characterization of hypoxia subtypes, and associated biological and clinical implications. *Adv Exp Med Biol*. 2014;812:19–24.
56. Hulikova A, Swietach P. Rapid CO₂ permeation across biological membranes: Implications for CO₂ venting from tissue. *FASEB J*. 2014;28(7).
57. Nakayama K, Kataoka N. Regulation of gene expression under hypoxic conditions. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.
58. Corrado C, Fontana S. Hypoxia and HIF signaling: One axis with divergent effects. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–17.
59. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9.
60. Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. Vol. 138, *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc.; 2016. p. 1058–66.
61. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(9).
62. Albadari N, Deng S, Li W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. Vol. 14, *Expert Opinion on Drug Discovery*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 667–82.
63. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12).
64. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1996;271(30).
65. Jiang B-H, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-inducible Factor 1 α . *J Biol Chem*. 1997;272(31).
66. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; Definition of regulatory domains within the α subunit. *J Biol Chem*. 1997;272(17).
67. Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hankinson O, Ratcliffe PJ. The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxie induction of gene

- expression: Studies in arnt-deficient cells. *J Biol Chem.* 1996;271(25).
68. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997;11(1).
69. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9).
70. Flamme I, Fröhlich T, Von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev.* 1997;63(1).
71. Gu Y-Z, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular Characterization and Chromosomal Localization of a Third Class Hypoxia Inducible Factor Subunit, HIF3a [Internet]. Vol. 7, *Gene Expression*. 1998. Available from: <http://dot>.
72. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α in human kidney: Suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 α . *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287(4).
73. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EHL, Kondo Y, Hara S, et al. Multiple splice variants of the human HIF-3 α locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem.* 2003;278(13).
74. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 2003;17(2).
75. Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: Working alone or together in hypoxia? Vol. 117, *Journal of Clinical Investigation*. 2007. p. 862–5.
76. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. Vol. 29, *Molecules and cells*. 2010. p. 435–42.
77. Downes NL, Laham-Karam N, Kaikkonen MU, Ylä-Herttuala S. Differential but Complementary HIF1 α and HIF2 α Transcriptional Regulation. *Mol Ther.* 2018 Jul 5;26(7):1735–45.
78. Hoefflin R, Harlander S, Schäfer S, Metzger P, Kuo F, Schönenberger D, et al. HIF-1 α and HIF-2 α differently regulate tumour development and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nat Commun.* 2020 Dec 1;11(1).
79. Heidbreder M, Fröhlich F, Jöhren O, Dendorfer A, Qadri F, Dominiak P. Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *FASEB J.* 2003;17(11).
80. Li QF, Wang XR, Yang YW, Lin H. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 α expression in lung epithelial cells: Characterization and comparison with HIF-1 α . *Cell Res.* 2006;16(6).
81. Pasanen A, Heikkilä M, Rautavuoma K, Hirsilä M, Kivirikko KI, Myllyharju J. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Jul;42(7):1189–200.

BIBLIOGRAFÍA

82. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 2001;414(6863).
83. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *J Biol Chem*. 2002;277(36).
84. Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, Todisco S, Iacobazzi V. Cancer cell metabolism in hypoxia: Role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
85. Maxwell PH, Wlesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733).
86. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* (80-). 2001;292(5516).
87. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*. 2001;20(18).
88. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 2002;16(12).
89. Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. Vol. 109, *Cancer Science*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 560–71.
90. Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*. 2011;117(23).
91. Slemc L, Kunej T. Transcription factor HIF1A: downstream targets, associated pathways, polymorphic hypoxia response element (HRE) sites, and initiative for standardization of reporting in scientific literature. *Tumor Biol*. 2016;37(11).
92. Dzhaliilova DS, Makarova O V. HIF-Dependent Mechanisms of Relationship between Hypoxia Tolerance and Tumor Development. Vol. 86, *Biochemistry (Moscow)*. 2021.
93. Yoo YG, Kong G, Lee MO. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1 α protein by recruiting histone deacetylase 1. *EMBO J*. 2006;25(6).
94. Zhu S, Deng S, He C, Liu M, Chen H, Zeng Z, et al. Reciprocal loop of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and metastasis-associated protein 2 (MTA2) contributes to the progression of pancreatic carcinoma by suppressing E-cadherin transcription. *J Pathol*. 2018;245(3).
95. Geng H, Liu Q, Xue C, David LL, Beer TM, Thomas G V., et al. HIF1 α protein stability is increased by acetylation at lysine 709. *J Biol Chem*. 2012;287(42).
96. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 Modulates Cellular Responses to Hypoxia by Deacetylating Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Mol Cell*. 2010;38(6).

97. Dioum EM, Chen R, Alexander MS, Zhang Q, Hogg RT, Gerard RD, et al. Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 2 α Signaling by the Stress-Responsive Deacetylase Sirtuin 1. *Science* (80-). 2009;324(5932).
98. Chen R, Xu M, Hogg RT, Li J, Little B, Gerard RD, et al. The acetylase/deacetylase couple CREB-binding protein/sirtuin 1 controls hypoxia-inducible factor 2 signaling. *J Biol Chem*. 2012;287(36).
99. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem*. 2003;278(16).
100. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem*. 2006;281(44).
101. Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*. 2002;277(26).
102. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*. 2004;383(3).
103. Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, Devine L, Wu F, Venkatraman V, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Sci Signal*. 2016;9(430).
104. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by atm-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Mol Cell*. 2010;40(4).
105. Warfel NA, Dolloff NG, Dicker DT, Malysz J, El-Deiry WS. CDK1 stabilizes HIF-1 α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell Cycle*. 2013;12(23).
106. Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen Synthase Kinase 3 Phosphorylates Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Mediates Its Destabilization in a VHL-Independent Manner. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9).
107. Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W. Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1 α . *J Biol Chem*. 2010;285(50).
108. Pangou E, Befani C, Mylonis I, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, et al. HIF-2 α phosphorylation by CK1 δ promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia. *J Cell Sci*. 2016;129(22).
109. Kourti M, Ikonomou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniosoglou S, et al. CK1 δ restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1 α /ARNT complex formation. *Cell Signal*. 2015;27(6).
110. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci*. 2010;123(17).
111. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. Vol. 15, *Genes and Development*. 2001.

BIBLIOGRAFÍA

112. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung Y Do, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2002;277(41).
113. Agani F, Semenza GL. Mersalyl is a novel inducer of vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity. *Mol Pharmacol.* 1998;54(5).
114. Feldser D, Agani F, Iyer N V., Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999;59(16).
115. Mohlin S, Hamidian A, Von Stedingk K, Bridges E, Wigerup C, Bexell D, et al. PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2015;75(21).
116. Katschinski DM, Le L, Heinrich D, Wagner KF, Hofer T, Schindler SG, et al. Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1 α is dependent on heat shock protein-90 activity. *J Biol Chem.* 2002;277(11).
117. Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK, Wenger RH. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 α stabilization. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4–6).
118. Liu Y V., Semenza GL. RACK1 vs. HSP90: Competition for HIF-1 α degradation vs. stabilization. Vol. 6, *Cell Cycle.* 2007.
119. Luo W, Zhong J, Chang R, Hu H, Pandey A, Semenza GL. Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α but not HIF-2 α . *J Biol Chem.* 2010;285(6).
120. Koh MY, Darnay BG, Powis G. Hypoxia-Associated Factor, a Novel E3-Ubiquitin Ligase, Binds and Ubiquitinates Hypoxia-Inducible Factor 1 α , Leading to Its Oxygen-Independent Degradation. *Mol Cell Biol.* 2008;28(23).
121. Koh MY, Lemos R, Liu X, Powis G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 2011;71(11).
122. Martí JM, Garcia-Díaz A, Delgado-Bellido D, O'Valle F, González-Flores A, Carlevaris O, et al. Selective modulation by PARP-1 of HIF-1 α -recruitment to chromatin during hypoxia is required for tumor adaptation to hypoxic conditions. *Redox Biol.* 2021;41.
123. Carreau A, Hafny-Rahbi B El, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med.* 2011;15(6).
124. McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours - Implications for treatment response. Vol. 87, *British Journal of Radiology.* British Institute of Radiology; 2014.
125. Winslow RM. Oxygen: The poison is in the dose. Vol. 53, *Transfusion.* 2013.
126. Leach RM, Treacher DF. ABC of oxygen: Oxygen transport---2. Tissue hypoxia. *BMJ.* 1998;317(7169).

127. Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. Vol. 93, Journal of the National Cancer Institute. 2001.
128. Cassavaugh J, Lounsbury KM. Hypoxia-mediated biological control. Vol. 112, Journal of Cellular Biochemistry. 2011.
129. Herman IM, Nussenbaum F. Tumor angiogenesis: Insights and innovations. Journal of Oncology. 2010.
130. Schito L, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. Vol. 2, Trends in Cancer. Cell Press; 2016. p. 758–70.
131. Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brüne B. Tumor hypoxia and cancer progression. Vol. 237, Cancer Letters. 2006.
132. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. Cancer Res. 1999;59(22).
133. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. J Biol Chem. 2002;277(26).
134. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: Involvement of HIF-1 in tumor progression. Cancer Res. 1997;57(23).
135. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. Nat Med. 1998;4(3).
136. Scappaticci FA. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. Vol. 20, Journal of Clinical Oncology. 2002.
137. Sherwood LM, Parris EE, Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. N Engl J Med. 1971;285(21).
138. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. Vol. 86, Cardiovascular Research. 2010.
139. Lv X, Li J, Zhang C, Hu T, Li S, He S, et al. The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. Vol. 4, Genes and Diseases. 2017.
140. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Vol. 29, Oncogene. 2010.
141. St. Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. Science (80-). 2000;289(5482).
142. Kunz M, Ibrahim SM. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. Vol. 2, Molecular Cancer. 2003.
143. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. Vol. 10, Nature Reviews Drug Discovery. 2011.
144. Noman MZ, Messai Y, Carré T, Akalay I, Méron M, Janji B, et al. Microenvironmental hypoxia orchestrating the cell stroma cross talk, tumor progression and antitumor

BIBLIOGRAFÍA

- response. Vol. 31, Critical Reviews in Immunology. 2011.
145. Li Y, Patel SP, Roszik J, Qin Y. Hypoxia-driven immunosuppressive metabolites in the tumor microenvironment: New approaches for combinational immunotherapy. Vol. 9, Frontiers in Immunology. 2018.
 146. Noman MZ, Hasmim M, Messai Y, Terry S, Kieda C, Janji B, et al. Hypoxia: A key player in antitumor immune response. A review in the theme: Cellular responses to hypoxia. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2015;309(9).
 147. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;12.
 148. Werno C, Menrad H, Weigert A, Dehne N, Goerdts S, Schledzewski K, et al. Knockout of HIF-1 α in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. *Carcinogenesis*. 2010;31(10).
 149. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: The relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep*. 2005;14(2).
 150. Du R, Lu K V., Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, et al. HIF1 α Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion. *Cancer Cell*. 2008;13(3).
 151. Chen WT, Hung WC, Kang WY, Huang YC, Su YC, Yang CH, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in urothelial carcinoma in conjunction with tumor-associated-macrophage infiltration, hypoxia-inducible factor-1 α expression, and tumor angiogenesis. *APMIS*. 2009;117(3).
 152. Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2013;288(15).
 153. Parodi M, Raggi F, Cangelosi D, Manzini C, Balsamo M, Blengio F, et al. Hypoxia modifies the transcriptome of human NK cells, modulates their immunoregulatory profile, and influences NK cell subset migration. *Front Immunol*. 2018;9(OCT).
 154. Balsamo M, Manzini C, Pietra G, Raggi F, Blengio F, Mingari MC, et al. Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC. *Eur J Immunol*. 2013;43(10).
 155. Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-Derived Lactate Modifies Antitumor Immune Response: Effect on Myeloid-Derived Suppressor Cells and NK Cells. *J Immunol*. 2013;191(3).
 156. Fernández JP, Luddy KA, Harmon C, O'Farrelly C. Hepatic tumor microenvironments and effects on NK cell phenotype and function. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. 2019.
 157. Zhang H, Lu H, Xiang L, Bullen JW, Zhang C, Samanta D, et al. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(45).

158. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. Vol. 27, *Cancer Cell*. 2015.
159. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res*. 2014;74(3).
160. Keith B, Simon MC. Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. Vol. 129, *Cell*. 2007.
161. Warburg O. The metabolism of carcinoma cells 1. *J Cancer Res*. 1925;9(1).
162. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. Vol. 356, *Cancer Letters*. 2015.
163. Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez J, Ralph S, Rodriguez-Enriquez S, Moreno-Sanchez R. HIF-1 α ; Modulates Energy Metabolism in Cancer Cells by Inducing Over-Expression of Specific Glycolytic Isoforms. *Mini-Reviews Med Chem*. 2009;9(9).
164. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008;452(7184).
165. Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 2011;145(5).
166. Fuhrmann DC, Brüne B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. Vol. 12, *Redox Biology*. 2017.
167. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2006;281(14).
168. Shimoda LA, Fallon M, Pisarcik S, Wang J, Semenza GL. HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalinization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(5).
169. Švastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zát'ovičová M, Gibadulinová A, Casini A, et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett*. 2004;577(3).
170. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. Vol. 19, *Seminars in Cancer Biology*. 2009. p. 12–6.
171. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. 2019.
172. De Nadai TR, De Nadai MN, Albuquerque AAS, De Carvalho MTM, Celotto AC, Evora PRB. Metabolic acidosis treatment as part of a strategy to curb inflammation. Vol. 2013, *International Journal of Inflammation*. 2013.
173. Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, Gillies RJ. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol Pharm*. 2011;8(6).
174. Semenza GL. Tumor metabolism: Cancer cells give and take lactate. Vol. 118, *Journal of Clinical Investigation*. 2008.

BIBLIOGRAFÍA

175. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Vol. 15, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014.
176. Esteban MA, Tran MGB, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, et al. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res*. 2006;66(7).
177. Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of β -catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int*. 2002;26(5):463–76.
178. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*. 2003;425(6955).
179. Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res*. 2006;66(5).
180. Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, De Paulsen N, Mekhail K, Parolin DAE, et al. Hypoxia Inducible Factor Activates the Transforming Growth Factor- α /Epidermal Growth Factor Receptor Growth Stimulatory Pathway in VHL-/- Renal Cell Carcinoma Cells. *J Biol Chem*. 2003;278(45).
181. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*. 2003;3(4).
182. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. Vol. 440, *Nature*. 2006.
183. Zavyalova M V., Denisov E V., Tashireva LA, Savelieva OE, Kaigorodova E V., Krakhmal N V., et al. Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. Vol. 84, *Biochemistry (Moscow)*. 2019.
184. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell*. 2009;15(6).
185. Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P, Liu Y. Targeting HIF1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4).
186. Muinao T, Deka Boruah HP, Pal M. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in ovarian cancer and the potential roles of cancer stem cells – An updated review. Vol. 362, *Experimental Cell Research*. 2018.
187. Nguyen PH, Giraud J, Chambonnier L, Dubus P, Wittkop L, Belleanne G, et al. Characterization of Biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(6).
188. Corrò C, Moch H. Biomarker discovery for renal cancer stem cells. Vol. 4, *Journal of Pathology: Clinical Research*. 2018.
189. Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. Vol. 25, *Journal of Biomedical Science*. 2018.
190. Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol*

- Med. 2013;17(1).
191. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2007;170(1):1–15.
 192. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. Vol. 77, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer; 2020. p. 1745–70.
 193. Delgado-Bellido D, Serrano-Saenz S, Fernández-Cortés M, Oliver FJ. Vasculogenic mimicry signaling revisited: Focus on non-vascular VE-cadherin. Vol. 16, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2017.
 194. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LMG, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155(3).
 195. McDonald DM, Munn L, Jain RK. Vasculogenic mimicry: How convincing, how novel, and how significant? Vol. 156, *American Journal of Pathology*. 2000.
 196. Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, Kawamoto S, Brechbiel MW, Kasumi F, et al. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res.* 2002;62(2).
 197. Van Der Schaft DWJ, Hillen F, Pauwels P, Kirschmann DA, Castermans K, Oude Egbrink MGA, et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res.* 2005;65(24).
 198. Scavelli C, Nico B, Cirulli T, Ria R, Di Pietro G, Mangieri D, et al. Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene.* 2008;27(5).
 199. Sun T, Zhao N, Zhao XL, Gu Q, Zhang SW, Che N, et al. Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: Its role in vasculogenic mimicry. *Hepatology.* 2010;51(2).
 200. El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idbaih A, et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: Tubular vasculogenic mimicry. *Brain.* 2010;133(4).
 201. Zhang S, Zhang D, Sun B. Vasculogenic mimicry: Current status and future prospects. Vol. 254, *Cancer Letters*. 2007.
 202. Baeten CIM, Hillen F, Pauwels P, De Bruine AP, Baeten CGMI. Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2009;52(12).
 203. Cao Z, Bao M, Miele L, Sarkar FH, Wang Z, Zhou Q. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: A systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2013;49(18).
 204. Yang JP, Liao YD, Mai DM, Xie P, Qiang YY, Zheng LS, et al. Tumor vasculogenic mimicry predicts poor prognosis in cancer patients: a meta-analysis. *Angiogenesis.* 2016;19(2).
 205. Goncharov N V., Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin P V. Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. Vol. 2017, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017.

BIBLIOGRAFÍA

206. Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Pe'er J, Maniotis AJ, Trent JM, et al. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(3).
207. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: Active guardians of vascular integrity. Vol. 26, *Developmental Cell*. 2013.
208. Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, et al. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer*. 2002;99(6).
209. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova T V., et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*. 2004;5(1).
210. Sun B, Zhang S, Zhang D, Du J, Guo H, Zhao X, et al. Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2006;16(4).
211. Kawahara R, Niwa Y, Simizu S. Integrin $\beta 1$ is an essential factor in vasculogenic mimicry of human cancer cells. *Cancer Sci*. 2018;109(8).
212. Breier G, Grosser M, Rezaei M. Endothelial cadherins in cancer. Vol. 355, *Cell and Tissue Research*. 2014.
213. Hendrix MJC, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LMG, Hess AR, Kirschmann DA, et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: Role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(14).
214. Liu Z, Sun B, Qi L, Li H, Gao J, Leng X. Zinc finger E-box binding homeobox 1 promotes vasculogenic mimicry in colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Sci*. 2012;103(4).
215. Liu T, Sun B, Zhao X, Gu Q, Dong X, Yao Z, et al. HER2/neu expression correlates with vasculogenic mimicry in invasive breast carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2013;17(1).
216. Mao XG, Xue XY, Wang L, Zhang X, Yan M, Tu YY, et al. CDH5 is specifically activated in glioblastoma stemlike cells and contributes to vasculogenic mimicry induced by hypoxia. *Neuro Oncol*. 2013;15(7).
217. Du J, Sun B, Zhao X, Gu Q, Dong X, Mo J, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by inducing epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2014;133(3).
218. Topczewska JM, Postovit LM, Margaryan N V., Sam A, Hess AR, Wheaton WW, et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: Role in melanoma aggressiveness. *Nat Med*. 2006 Aug;12(8):925–32.
219. Hardy KM, Kirschmann DA, Seftor EA, Margaryan N V., Postovit LM, Strizzi L, et al. Regulation of the embryonic morphogen nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res*. 2010;70(24).
220. Qi L, Song W, Liu Z, Zhao X, Cao W, Baocun Sun BS. Wnt3a promotes the vasculogenic mimicry formation of colon cancer via Wnt/ β -Catenin signaling. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8).
221. Liu Y, Li F, Yang YT, Xu XD, Chen JS, Chen TL, et al. IGFBP2 promotes vasculogenic mimicry

- formation via regulating CD144 and MMP2 expression in glioma. *Oncogene*. 2019;38(11).
222. Sun T, Sun BC, Zhao XL, Zhao N, Dong XY, Che N, et al. Promotion of tumor cell metastasis and vasculogenic mimicry by way of transcription coactivation by Bcl-2 and Twist1: A study of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011;54(5).
 223. Peris-Torres C, Plaza-Calonge MDC, López-Domínguez R, Domínguez-García S, Barrientos-Durán A, Carmona-Sáez P, et al. Extracellular protease adamts1 is required at early stages of human uveal melanoma development by inducing stemness and endothelial-like features on tumor cells. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4).
 224. Gavard J, Gutkind JS. VEGF Controls endothelial-cell permeability promoting β -arrestin-dependent Endocytosis VE-cadherin. *Nat Cell Biol*. 2006;8(11).
 225. Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S, et al. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun*. 2012;3.
 226. Allingham MJ, van Buul JD, Burrridge K. ICAM-1-Mediated, Src- and Pyk2-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation Is Required for Leukocyte Transendothelial Migration. *J Immunol*. 2007;179(6).
 227. Lampugnani MG, Dejana E, Giampietro C. Vascular endothelial (VE)-cadherin, endothelial adherens junctions, and vascular disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(10).
 228. Jean C, Chen XL, Nam JO, Tancioni I, Uryu S, Lawson C, et al. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J Cell Biol*. 2014;204(2).
 229. Delgado-Bellido D, Fernández-Cortés M, Rodríguez MI, Serrano-Sáenz S, Carracedo A, Garcia-Diaz A, et al. VE-cadherin promotes vasculogenic mimicry by modulating kaiso-dependent gene expression. *Cell Death Differ*. 2019 Feb 1;26(2):348–61.
 230. Hess AR, Postovit LM, Margaryan N V., Seftor EA, Schneider GB, Seftor REB, et al. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res*. 2005;65(21).
 231. Delgado-Bellido D, Bueno-Galera C, López-Jiménez L, Garcia-Diaz A, Oliver FJ. Endothelial Phosphatase VE-PTP Participates in Vasculogenic Mimicry by Preventing Autophagic Degradation of VE-Cadherin. *Front Oncol*. 2020 Jan 24;10.
 232. Liu S, Ni C, Zhang D, Sun H, Dong X, Che N, et al. S1PR1 regulates the switch of two angiogenic modes by VE-cadherin phosphorylation in breast cancer. *Cell Death Dis*. 2019;10(3).
 233. Wessel F, Winderlich M, Holm M, Frye M, Rivera-Galdos R, Vockel M, et al. Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol*. 2014;15(3).
 234. Seftor REB, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LMG, Bilban M, et al. Cooperative Interactions of Laminin 5 2 Chain, Matrix Metalloproteinase-2, and Membrane Type-1-Matrix/Metalloproteinase Are Required for Mimicry of Embryonic Vasculogenesis by Aggressive Melanoma 1 [Internet]. 2001. Available from: <http://www.nhgri.nih.gov/DIR/LCG/15K/HTML/>.
 235. Biondani G, Zeeberg K, Greco MR, Cannone S, Dando I, Dalla Pozza E, et al. Extracellular

BIBLIOGRAFÍA

- matrix composition modulates PDAC parenchymal and stem cell plasticity and behavior through the secretome. *FEBS J.* 2018;285(11).
236. Bedal KB, Grässel S, Spanier G, Reichert TE, Bauer RJ. The NC11 domain of human collagen XVI induces vasculogenic mimicry in oral squamous cell carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2015;36(11).
237. Velez DO, Tsui B, Goshia T, Chute CL, Han A, Carter H, et al. 3D collagen architecture induces a conserved migratory and transcriptional response linked to vasculogenic mimicry. *Nat Commun.* 2017;8(1).
238. Wang M, Zhao X, Zhu D, Liu T, Liang X, Liu F, et al. HIF-1 α promoted vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma through LOXL2 up-regulation in hypoxic tumor microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1).
239. Maes H, Van Eygen S, Krysko D V., Vandenabeele P, Nys K, Rillaerts K, et al. BNIP3 supports melanoma cell migration and vasculogenic mimicry by orchestrating the actin cytoskeleton. *Cell Death Dis.* 2014;5(3).
240. Dunleavey JM, Xiao L, Thompson J, Kim MM, Shields JM, Shelton SE, et al. Vascular channels formed by subpopulations of PECAM1 + melanoma cells. *Nat Commun.* 2014;5.
241. Hendrix MJC, Seftor REB, Seftor EA, Gruman LM, Lee LML, Sheriff DD, et al. Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: Role of the microenvironment in cell-fate determination. *Cancer Res.* 2002;62(3).
242. Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Margaryan N V., Seftor REB, Hendrix MJC. The epigenetic reprogramming of poorly aggressive melanoma cells by a metastatic microenvironment. *J Cell Mol Med.* 2006;10(1).
243. Vartanian A, Karshieva S, Dombrovsky V, Belyavsky A. Melanoma educates mesenchymal stromal cells towards vasculogenic mimicry. *Oncol Lett.* 2016;11(6).
244. Comito G, Calvani M, Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Torre E, et al. HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(4).
245. Zhang Y, Sun B, Zhao X, Liu Z, Wang X, Yao X, et al. Clinical significances and prognostic value of cancer stem-like cells markers and vasculogenic mimicry in renal cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 2013;108(6).
246. Rong X, Huang B, Qiu S, Li X, He L, Peng Y. Tumor-associated macrophages induce vasculogenic mimicry of glioblastoma multiforme through cyclooxygenase-2 activation. *Oncotarget.* 2016;7(51).
247. Hutchenreuther J, Vincent K, Norley C, Racanelli M, Gruber SB, Johnson TM, et al. Activation of cancer-associated fibroblasts is required for tumor neovascularization in a murine model of melanoma. *Matrix Biol.* 2018;74.
248. Thijssen VLJL, Paulis YWJ, Nowak-Sliwinska P, Deumelandt KL, Hosaka K, Soetekouw PMMB, et al. Targeting PDGF-mediated recruitment of pericytes blocks vascular mimicry and tumor growth. *J Pathol.* 2018;246(4).
249. Fernández-Cortés M, Delgado-Bellido D, Bermúdez-Jiménez E, Paramio JM, O'Valle F, Vinckier S, et al. PARP inhibition promotes endothelial-like traits in melanoma cells and

- modulates pericyte coverage dynamics during vasculogenic mimicry. *J Pathol.* 2023;259(3).
250. Hottiger MO, Hassa PO, Lüscher B, Schüler H, Koch-Nolte F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(4):208–19.
 251. Palazzo L, Mikoč A, Ahel I. ADP-ribosylation: new facets of an ancient modification. *FEBS J.* 2017;284(18):2932–46.
 252. Rodríguez MI, Majuelos-Melguizo J, Martí Martín-Consuegra JM, Ruiz de Almodóvar M, López-Rivas A, Javier Oliver F. Deciphering the Insights of Poly(ADP-Ribosylation) in Tumor Progression. *Med Res Rev.* 2015;35(4):678–97.
 253. Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;13(7):411–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3376>
 254. Martí JM, Fernández-Cortés M, Serrano-Sáenz S, Zamudio-Martinez E, Delgado-Bellido D, García-Díaz A, et al. The multifactorial role of PARP-1 in tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 2020;12(3).
 255. Vyas S, Chang P. New PARP targets for cancer therapy. Vol. 14, *Nature Reviews Cancer.* 2014. p. 502–9.
 256. Vyas S, Matic I, Uchima L, Rood J, Zaja R, Hay RT, et al. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nat Commun.* 2014;5.
 257. Kleine H, Poreba E, Lesniewicz K, Hassa PO, Hottiger MO, Litchfield DW, et al. Substrate-Assisted Catalysis by PARP10 Limits Its Activity to Mono-ADP-Ribosylation. *Mol Cell.* 2008;32(1):57–69.
 258. Gupte R, Liu Z, Kraus WL. Parps and adp-ribosylation: Recent advances linking molecular functions to biological outcomes. Vol. 31, *Genes and Development.* 2017.
 259. Yang CS, Jividen K, Spencer A, Dworak N, Ni L, Oostdyk LT, et al. Ubiquitin Modification by the E3 Ligase/ADP-Ribosyltransferase Dtx3L/Parp9. *Mol Cell.* 2017;66(4):503-516.e5.
 260. Poirier GG, de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Niedergang C, Mandel P. Poly (ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(11 I):3423–7.
 261. Kameshita I, Matsuda Z, Taniguchi T, Shizuta Y. Poly (ADP-Ribose) Synthetase. 1984;259(8):4770–7.
 262. Alemasova EE, Lavrik OI. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: Reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019;47(8):3811–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz120>
 263. Wei H, Yu X. Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways. *Genomics, Proteomics Bioinforma* [Internet]. 2016;14(3):131–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.001>
 264. Martín-Oliva D, Aguilar-Quesada R, O’Valle F, Muñoz-Gámez JA, Martínez-Romero R, García Del Moral R, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-

BIBLIOGRAFÍA

- related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2006;66(11):5744–56.
265. Gonzalez-Flores A, Aguilar-Quesada R, Siles E, Pozo S, Rodríguez-Lara MI, López-Jiménez L, et al. Interaction between PARP-1 and HIF-2 in the hypoxic response. *Oncogene.* 2014;33(7):891–8.
266. Sobczak M, Pitt AR, Spickett CM, Robaszkiewicz A. PARP1 Co-regulates EP300–BRG1-dependent transcription of genes involved in breast cancer cell proliferation and DNA repair. *Cancers (Basel).* 2019;11(10):1–18.
267. Zhou X, Patel D, Sen S, Shanmugam V, Sidawy A, Mishra L, et al. Poly-ADP-ribose polymerase inhibition enhances ischemic and diabetic wound healing by promoting angiogenesis. *J Vasc Surg [Internet].* 2017;65(4):1161–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2016.03.407>
268. Ivana Scovassi A, Diederich M. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):1041–7.
269. Nikolettópoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet].* 2013;1833(12):3448–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
270. Min A, Im SA. PARP inhibitors as therapeutics: Beyond modulation of parylation. *Cancers (Basel).* 2020;12(2).
271. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. Vol. 355, *Science.* 2017.
272. Zamudio-Martinez E, Herrera-Campos AB, Muñoz A, Rodríguez-Vargas JM, Oliver FJ. Tankyrases as modulators of pro-tumoral functions: molecular insights and therapeutic opportunities. Vol. 40, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 2021.
273. Lakshmi TV, Bale S, Khurana A, Godugu C. Tankyrase as a Novel Molecular Target in Cancer and Fibrotic Diseases. *Curr Drug Targets.* 2016;18(10).
274. Wang H, Segersvärd H, Siren J, Perttunen S, Immonen K, Kosonen R, et al. Tankyrase Inhibition Attenuates Cardiac Dilatation and Dysfunction in Ischemic Heart Failure. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17).
275. Wang H, Kuusela S, Rinnankoski-Tuikka R, Dumont V, Bouslama R, Ramadan UA, et al. Tankyrase inhibition ameliorates lipid disorder via suppression of PGC-1 α PARylation in db/db mice. *Int J Obes [Internet].* 2020;44(8):1691–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41366-020-0573-z>
276. Lafon-Hughes L, Fernandez Villamil SH, Vilchez Larrea SC. Tankyrase inhibitors hinder *Trypanosoma cruzi* infection by altering host-cell signalling pathways. *Parasitology.* 2021;148(13).
277. Kaminker PG, Kim SH, Taylor RD, Zebardjian Y, Funk WD, Morin GB, et al. TANK2, a New TRF1-associated Poly(ADP-ribose) Polymerase, Causes Rapid Induction of Cell Death upon Overexpression. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35891–9.
278. Chiang YJ, Hsiao SJ, Yver D, Cushman SW, Tessarollo L, Smith S, et al. Tankyrase 1 and tankyrase 2 are essential but redundant for mouse embryonic development. *PLoS One.*

- 2008;3(7):1–10.
279. Smith S. The world according to PARP. Vol. 26, Trends in Biochemical Sciences. 2001. p. 174–9.
 280. Hsiao SJ, Smith S. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. Vol. 90, Biochimie. 2008. p. 83–92.
 281. Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-Ribosylation Reactions in Mammalian Cells: Where Are We Today and Where Are We Going? Microbiol Mol Biol Rev. 2006;70(3):789–829.
 282. Langelier MF, Eisemann T, Riccio AA, Pascal JM. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. Curr Opin Struct Biol. 2018;53:187–98.
 283. Bell CE, Eisenberg D. Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. Adv Exp Med Biol. 1997;419:35–43.
 284. Haikarainen T, Krauss S, Lehtio L. Tankyrases: Structure, Function and Therapeutic Implications in Cancer. Curr Pharm Des. 2014;20(41):6472–88.
 285. Eisemann T, Langelier MF, Pascal JM. Structural and functional analysis of parameters governing tankyrase-1 interaction with telomeric repeat-binding factor 1 and GDP-mannose 4,6-dehydratase. J Biol Chem. 2019;294(40):14574–90.
 286. Kamaletdinova T, Fanaei-Kahrani Z, Wang Z-Q. The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers. Cells. 2019;8(12):1625.
 287. Leslie Pedrioli DM, Leutert M, Bilan V, Nowak K, Gunasekera K, Ferrari E, et al. Comprehensive ADP-ribosylome analysis identifies tyrosine as an ADP-ribose acceptor site. EMBO Rep. 2018;19(8):1–11.
 288. Ruf A, Rolli V, De Murcia G, Schulz GE. The mechanism of the elongation and branching reaction of Poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. J Mol Biol. 1998;278(1):57–65.
 289. Rippmann JF, Damm K, Schnapp A. Functional characterization of the poly(ADP-ribose) polymerase activity of tankyrase 1, a potential regulator of telomere length. J Mol Biol. 2002;323(2):217–24.
 290. Aviv T, Lin Z, Lau S, Rendl LM, Sicheri F, Smibert CA. The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. Nat Struct Biol. 2003;10(8):614–21.
 291. Oberstrass FC, Lee A, Stefl R, Janis M, Chanfreau G, Allain FHT. Shape-specific recognition in the structure of the Vts1p SAM domain with RNA. Nat Struct Mol Biol. 2006;13(2):160–7.
 292. De Rycker M, Venkatesan RN, Wei C, Price CM. Vertebrate tankyrase domain structure and sterile α motif (SAM)-mediated multimerization. Biochem J. 2003;372(1):87–96.
 293. De Rycker M, Price CM. Tankyrase Polymerization Is Controlled by Its Sterile Alpha Motif and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Domains. Mol Cell Biol. 2004;24(22):9802–12.
 294. Mariotti L, Templeton CM, Raney M, Paracuellos P, Cronin N, Beuron F, et al. Tankyrase

BIBLIOGRAFÍA

- Requires SAM Domain-Dependent Polymerization to Support Wnt- β -Catenin Signaling. *Mol Cell*. 2016;63(3):498–513.
295. Fan C, Yarravarapu N, Chen H, Kulak O, Dasari P, Herbert J, et al. Regulation of tankyrase activity by a catalytic domain dimer interface. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(3):1780–5.
296. Riccio AA, McCauley M, Langelier MF, Pascal JM. Tankyrase Sterile α Motif Domain Polymerization Is Required for Its Role in Wnt Signaling. *Structure*. 2016;24(9):1573–81.
297. DaRosa PA, Ovchinnikov S, Xu W, Klevit RE. Structural insights into SAM domain-mediated tankyrase oligomerization. *Protein Sci*. 2016;25:1744–52.
298. Guettler S, Larose J, Petsalaki E, Gish G, Scotter A, Pawson T, et al. Structural basis and sequence rules for substrate recognition by tankyrase explain the basis for cherubism disease. *Cell*. 2011;147(6):1340–54.
299. Seimiya H, Smith S. The telomeric poly(ADP-ribose) polymerase, tankyrase 1, contains multiple binding sites for telomeric repeat binding factor 1 (TRF1) and a novel acceptor, 182-kDa tankyrase-binding protein (TAB182). *J Biol Chem*. 2002;277(16):14116–26.
300. Azarm K, Smith S. Nuclear PARPs and genome integrity. *Genes Dev*. 2020;1–17.
301. Eisemann T, McCauley M, Langelier MF, Gupta K, Roy S, Van Duyne GD, et al. Tankyrase-1 Ankyrin Repeats Form an Adaptable Binding Platform for Targets of ADP-Ribose Modification. *Structure* [Internet]. 2016;24(10):1679–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2016.07.014>
302. Mariotti L, Templeton CM, Ranes M, Paracuellos P, Cronin N, Beuron F, et al. Tankyrase Requires SAM Domain-Dependent Polymerization to Support Wnt- β -Catenin Signaling. *Mol Cell* [Internet]. 2016;63(3):498–513. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.019>
303. Smith S, Giriat L, Schmitt A, De Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* (80-). 1998;282(5393):1484–7.
304. Kim MK. Novel insight into the function of Tankyrase (Review). *Oncol Lett*. 2018;16(6):6895–902.
305. Chi NW, Lodish HF. Tankyrase is a Golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles. *J Biol Chem*. 2000;275(49):38437–44.
306. Bhardwaj A, Yang Y, Ueberheide B, Smith S. Whole proteome analysis of human tankyrase knockout cells reveals targets of tankyrase-mediated degradation. *Nat Commun*. 2017;8(1).
307. Li X, Han H, Zhou MT, Yang B, Ta AP, Li N, et al. Proteomic Analysis of the Human Tankyrase Protein Interaction Network Reveals Its Role in Pexophagy. *Cell Rep*. 2017;20(3):737–49.
308. Smith S, De Lange T. Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes. *J Cell Sci*. 1999;112(21):3649–55.
309. Sbodio JJ, Lodish HF, Chi NW. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to

- both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem J.* 2002;361(3):451–9.
310. DaRosa PA, Klevit RE, Xu W. Structural basis for tankyrase-RNF146 interaction reveals noncanonical tankyrase-binding motifs. *Protein Sci.* 2018;27(6):1057–67.
 311. Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S. Role for the Related Poly(ADP-Ribose) Polymerases Tankyrase 1 and 2 at Human Telomeres. *Mol Cell Biol.* 2002;22(1):332–42.
 312. Callow MG, Tran H, Phu L, Lau T, Lee J, Sandoval WN, et al. Ubiquitin ligase RNF146 regulates tankyrase and Axin to promote Wnt signaling. *PLoS One.* 2011;6(7).
 313. Zhang Y, Liu S, Mickanin C, Feng Y, Charlat O, Michaud GA, et al. RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2011;13(5):623–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2222>
 314. He F, Tsuda K, Takahashi M, Kuwasako K, Terada T, Shirouzu M, et al. Structural insight into the interaction of ADP-ribose with the PARP WWE domains. *FEBS Lett* [Internet]. 2012;586(21):3858–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.09.009>
 315. Li N, Zhang Y, Han X, Liang K, Wang J, Feng L, et al. Poly-ADP ribosylation of PTEN by tankyrases promotes PTEN degradation and tumor growth. *Genes Dev.* 2015;29(2):157–70.
 316. Viveló CA, Ayyappan V, Leung AKL. Poly(ADP-ribose)-dependent ubiquitination and its clinical implications. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2019;167(May):3–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.05.006>
 317. Li N, Wang Y, Neri S, Zhen Y, Fong LWR, Qiao Y, et al. Tankyrase disrupts metabolic homeostasis and promotes tumorigenesis by inhibiting LKB1-AMPK signalling. *Nat Commun.* 2019;10(1).
 318. Bae J, Donigian JR, Hsueh AJW. Tankyrase 1 interacts with Mcl-1 proteins and inhibits their regulation of apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278(7):5195–204.
 319. Bisht KK, Dudognon C, Chang WG, Sokol ES, Ramirez A, Smith S. GDP-Mannose-4,6-Dehydratase Is a Cytosolic Partner of Tankyrase 1 That Inhibits Its Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity. *Mol Cell Biol.* 2012;32(15):3044–53.
 320. Okamoto K, Ohishi T, Kuroiwa M, Iemura SI, Natsume T, Seimiya H. MERIT40-dependent recruitment of tankyrase to damaged DNA and its implication for cell sensitivity to DNA-damaging anticancer drugs. *Oncotarget.* 2018;9(88):35844–55.
 321. Kullmann L, Krahn MP. Controlling the master - Upstream regulation of the tumor suppressor LKB1. *Oncogene* [Internet]. 2018;37(23):3045–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-018-0145-z>
 322. Zeqiraj E, Filippi BM, Deak M, Alessi DR, Van Aalten DMF. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science (80-).* 2009;326(5960):1707–11.
 323. Becker DJ, Lowe JB. Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology.* 2003;13(7).
 324. Zheng D, Xie W, Li L, Jiang W, Zou Y, Chiang C, et al. RXXPEG motif of MERIT40 is required

BIBLIOGRAFÍA

- to maintain spindle structure and function through its interaction with Tankyrase1. *Cell Biol Int*. 2019;43(2):174–81.
325. Sbodio JI, Chi NW. Identification of a tankyrase-binding motif shared by IRAP, TAB182, and human TRF1 but not mouse TRF1: NuMA contains this RXXPDG motif and is a novel tankyrase partner. *J Biol Chem*. 2002;277(35):31887–92.
 326. DaRosa PA, Wang Z, Jiang X, Pruneda JN, Cong F, Klevit RE, et al. Allosteric activation of the RNF146 ubiquitin ligase by a poly(ADP-ribosyl)ation signal. *Nature*. 2014;517(7533).
 327. Deng Z, Lezina L, Chen CJ, Shtivelband S, So W, Lieberman PM. Telomeric proteins regulate episomal maintenance of epstein-barr virus origin of plasmid replication. *Mol Cell [Internet]*. 2002;9(3):493–503. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00476-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00476-8)
 328. Li Z, Yamauchi Y, Kamakura M, Murayama T, Goshima F, Kimura H, et al. Herpes Simplex Virus Requires Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity for Efficient Replication and Induces Extracellular Signal-Related Kinase-Dependent Phosphorylation and ICP0-Dependent Nuclear Localization of Tankyrase 1. *J Virol*. 2012;86(1):492–503.
 329. McGurk L, Rifai O, Bonini NM. TDP-43 a protein central to amyotrophic lateral sclerosis is destabilized by Tankyrase-1/2. *J Cell Sci*. 2020;133(12).
 330. Schatoff EM, Goswami S, Zafra MP, Foronda M, Shusterman M, Leach BI, et al. Distinct colorectal cancer–associated apc mutations dictate response to tankyrase inhibition. *Cancer Discov*. 2019;9(10):1358–71.
 331. Jang MK, Mashima T, Seimiya H. Tankyrase inhibitors target colorectal cancer stem cells via axin-dependent downregulation of c-kit tyrosine kinase. *Mol Cancer Ther*. 2020;19(3):765–76.
 332. Busch AM, Johnson KC, Stan R V., Sanglikar A, Ahmed Y, Dmitrovsky E, et al. Evidence for tankyrases as antineoplastic targets in lung cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:1–15.
 333. Tang B, Wang J, Fang J, Jiang B, Zhang M, Wang Y, et al. Expression of TNKS1 is correlated with pathologic grade and Wnt/ β -catenin pathway in human astrocytomas. *J Clin Neurosci [Internet]*. 2012;19(1):139–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2011.08.013>
 334. Bao R, Christova T, Song S, Angers S, Yan X, Attisano L. Inhibition of Tankyrases Induces Axin Stabilization and Blocks Wnt Signalling in Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2012;7(11).
 335. Yang HY, Shen JX, Wang Y, Liu Y, Shen DY, Quan S. Tankyrase Promotes Aerobic Glycolysis and Proliferation of Ovarian Cancer through Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling. *Biomed Res Int*. 2019;2019.
 336. Ma L, Wang X, Jia T, Wei W, Chua MS, So S. Tankyrase inhibitors attenuate WNT/ β -catenin signaling and inhibit growth of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*. 2015;6(28):25390–401.
 337. Canudas S, Houghtaling BR, Kim JY, Dynek JN, Chang WG, Smith S. Protein requirements for sister telomere association in human cells. *EMBO J*. 2007;26(23):4867–78.
 338. Dynek JN, Smith S. Resolution of Sister Telomere Association Is Required for Progression Through Mitosis. *Science (80-)*. 2004;304(5667):97–100.

339. Chang P, Coughlin M, Mitchison TJ. Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat Cell Biol.* 2005;7(11).
340. Kim MK, Dudognon C, Smith S. Tankyrase 1 regulates centrosome function by controlling CPAP stability. *EMBO Rep.* 2012;13(8).
341. Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, et al. Poly-ADP Ribosylation of Miki by tankyrase-1 Promotes Centrosome Maturation. *Mol Cell.* 2012;47(5).
342. Yang L, Sun L, Teng Y, Chen H, Gao Y, Levine AS, et al. Tankyrase1-mediated poly(ADP-ribosyl)ation of TRF1 maintains cell survival after telomeric DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(7):3906–21.
343. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. Vol. 169, *Cell.* Cell Press; 2017. p. 985–99.
344. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. Vol. 13, *Nature Reviews Cancer.* 2013. p. 246–57.
345. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: An updated version. Vol. 24, *Genes and Development.* 2010.
346. Wang W, Li N, Li X, Tran MK, Han X, Chen J. Tankyrase Inhibitors Target YAP by Stabilizing Angiomotin Family Proteins. *Cell Rep.* 2015;13(3).
347. Huang SMA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* [Internet]. 2009;461(7264):614–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08356>
348. Norum JH, Skarpen E, Brech A, Kuiper R, Waaler J, Krauss S, et al. The tankyrase inhibitor G007-LK inhibits small intestine LGR5+ stem cell proliferation without altering tissue morphology. *Biol Res* [Internet]. 2018;51(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0151-6>
349. Mizutani A, Yashiroda Y, Muramatsu Y, Yoshida H, Chikada T, Tsumura T, et al. RK-287107, a potent and specific tankyrase inhibitor, blocks colorectal cancer cell growth in a preclinical model. *Cancer Sci.* 2018;109(12):4003–14.
350. Okada-Iwasaki R, Takahashi Y, Watanabe Y, Ishida H, Saito JI, Nakai R, et al. The Discovery and characterization of K-756, a Novel Wnt/ β -Catenin pathway inhibitor targeting tankyrase. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(7):1525–34.
351. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* [Internet]. 2017;169(6):985–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
352. Li B, Liang J, Lu F, Zeng G, Zhang J, Ma Y, et al. Discovery of novel inhibitor for Wnt/ β -catenin pathway by tankyrase 1/2 structure-based virtual screening. *Molecules.* 2020;25(7).
353. Xu W, Lau YH, Fischer G, Tan YS, Chattopadhyay A, De La Roche M, et al. Macrocyclized Extended Peptides: Inhibiting the Substrate-Recognition Domain of Tankyrase. *J Am Chem Soc.* 2017;139(6):2245–56.
354. Diamante A, Chaturbedy PK, Rowling PJE, Kumita JR, Eapen RS, McLaughlin SH, et al.

BIBLIOGRAFÍA

- Engineering mono- And multi-valent inhibitors on a modular scaffold. *Chem Sci*. 2021;12(3).
355. Xu D, Liu J, Fu T, Shan B, Qian L, Pan L, et al. USP25 regulates WNT signalling by controlling the stability of tankyrases. *Genes Dev*. 2017;31(10):1024–35.
 356. Cheng H, Li X, Wang C, Chen Y, Li S, Tan J, et al. Inhibition of tankyrase by a novel small molecule significantly attenuates prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett*. 2019;443(November 2018):80–90.
 357. Pollock K, Liu M, Zaleska M, Meniconi M, Pfuhl M, Collins I, et al. Fragment-based screening identifies molecules targeting the substrate-binding ankyrin repeat domains of tankyrase. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–20.
 358. Sowa ST, Vela-Rodríguez C, Galera-Prat A, Cázares-Olivera M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Ignatov A, et al. A FRET-based high-throughput screening platform for the discovery of chemical probes targeting the scaffolding functions of human tankyrases. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69229-y>
 359. Ha GH, Kim DY, Breuer EK, Kim CK. Combination treatment of polo-like kinase 1 and tankyrase-1 inhibitors enhances anticancer effect in triple-negative breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2018;38(3):1303–10.
 360. Tian X, Hou W, Bai S, Fan J, Tong H, Bai Y. XAV939 promotes apoptosis in a neuroblastoma cell line via telomere shortening. *Oncol Rep*. 2014;32(5):1999–2006.
 361. Jia J, Qiao Y, Pilo MG, Cigliano A, Liu X, Shao Z, et al. Tankyrase inhibitors suppress hepatocellular carcinoma cell growth via modulating the Hippo cascade. *PLoS One*. 2017;12(9):1–15.
 362. Thorvaldsen TE, Pedersen NM, Wenzel EM, Schultz SW, Brech A, Liestøl K, et al. Structure, dynamics, and functionality of tankyrase inhibitor-induced degradasomes. *Mol Cancer Res*. 2015;13(11):1487–501.
 363. Kierulf-Vieira KS, Sandberg CJ, Waaler J, Lund K, Skaga E, Saberniak BM, et al. A small-molecule tankyrase inhibitor reduces glioma stem cell proliferation and sphere formation. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1–16.
 364. Waaler J, Mygland L, Tveita A, Strand MF, Solberg NT, Olsen PA, et al. Tankyrase inhibition sensitizes melanoma to PD-1 immune checkpoint blockade in syngeneic mouse models. *Commun Biol* [Internet]. 2020;3(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-020-0916-2>
 365. Anumala UR, Waaler J, Nkizinkiko Y, Ignatov A, Lazarow K, Lindemann P, et al. Discovery of a Novel Series of Tankyrase Inhibitors by a Hybridization Approach. *J Med Chem*. 2017;60(24):10013–25.
 366. Waaler J, Leenders RGG, Sowa ST, Alam Brinch S, Lycke M, Nieczypor P, et al. Preclinical Lead Optimization of a 1,2,4-Triazole Based Tankyrase Inhibitor. *J Med Chem*. 2020;63(13):6834–46.
 367. Scarborough HA, Helfrich BA, Casas-Selves M, Schuller AG, Grosskurth SE, Kim J, et al. AZ1366: An inhibitor of tankyrase and the canonical wnt pathway that limits the persistence of non-small cell lung cancer cells following EGFR inhibition. *Clin Cancer Res*. 2017;23(6):1531–41.

368. Wang H, Castillo J, Zhang Y, Yang Z, McAllister G, Lindeman A, et al. Tankyrase inhibitor sensitizes lung cancer cells to endothelial growth factor receptor (EGFR) inhibition via stabilizing angiomotins and inhibiting yap signaling. *J Biol Chem*. 2016;291(29):15256–66.
369. Huang J, Qu Q, Guo Y, Xiang Y, Feng D. Tankyrases/ β -catenin signaling pathway as an anti-proliferation and anti-metastatic target in hepatocarcinoma cell lines. *J Cancer*. 2020;11(2):432–40.
370. Shirai F, Mizutani A, Yashiroda Y, Tsumura T, Kano Y, Muramatsu Y, et al. Design and Discovery of an Orally Efficacious Spiroindolinone-Based Tankyrase Inhibitor for the Treatment of Colon Cancer. *J Med Chem*. 2020;63(8):4183–204.
371. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1).
372. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401–4.
373. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269).
374. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2 - Is one more important than the other? Vol. 56, *Vascular Pharmacology*. 2012.
375. Ivanova IG, Park C V., Kenneth NS. Translating the hypoxic response-the role of HIF protein translation in the cellular response to low oxygen. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
376. Chédeville AL, Lourdasamy A, Monteiro AR, Hill R, Madureira PA. Investigating glioblastoma response to hypoxia. *Biomedicines*. 2020 Sep 1;8(9).
377. Zhu X, Zelmer A, Wellmann S. Visualization of protein-protein interaction in nuclear and cytoplasmic fractions by co-immunoprecipitation and in situ proximity ligation assay. *J Vis Exp*. 2017 Jan 16;2017(119).
378. Iommarini L, Porcelli AM, Gasparre G, Kurelac I. Non-canonical mechanisms regulating hypoxia-inducible factor 1 alpha in cancer. Vol. 7, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
379. Galbán S, Gorospe M. Factors interacting with HIF-1 α mRNA: novel therapeutic targets.
380. Wang X, Li L, Zhao K, Lin Q, Li H, Xue X, et al. A novel LncRNA HITT forms a regulatory loop with HIF-1 α to modulate angiogenesis and tumor growth. *Cell Death Differ*. 2020;27(4).
381. Jeong K, Choi J, Choi A, Shim J, Kim YA, Oh C, et al. Determination of HIF-1 α degradation pathways via modulation of the propionyl mark. *BMB Rep*. 2023;
382. Bremm A, Moniz S, Mader J, Rocha S, Komander D. Cezanne (OTUD 7B) regulates HIF -1 α homeostasis in a proteasome-independent manner . *EMBO Rep*. 2014;15(12).
383. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018.
384. Lis P, Dylag M, Niedźwiecka K, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A, et al. The HK2 dependent ‘Warburg effect’ and mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer: Targets for

BIBLIOGRAFÍA

- effective therapy with 3-bromopyruvate. Vol. 21, *Molecules*. MDPI AG; 2016.
385. Lee JH, Liu R, Li J, Zhang C, Wang Y, Cai Q, et al. Stabilization of phosphofructokinase 1 platelet isoform by AKT promotes tumorigenesis. *Nat Commun*. 2017 Dec 1;8(1).
386. Bartrons R, Simon-Molas H, Rodríguez-García A, Castaño E, Navarro-Sabaté À, Manzano A, et al. Fructose 2,6-bisphosphate in cancer cell metabolism. Vol. 8, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
387. Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. Vol. 405, *Biochemical Journal*. 2007.
388. Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, et al. HIF-1 α -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nat Commun*. 2016;7.
389. Said HM, Supuran CT, Hageman C, Staab A, Polat B, Katzer A, et al. Modulation of Carbonic Anhydrase 9 (CA9) in Human Brain Cancer. Vol. 16, *Current Pharmaceutical Design*. 2010.
390. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. Vol. 95, *International Journal of Radiation Biology*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 912–9.
391. Yang J, Ren B, Yang G, Wang H, Chen G, You L, et al. The enhancement of glycolysis regulates pancreatic cancer metastasis. Vol. 77, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020.
392. De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, et al. XRole of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*. 2013 Aug 1;154(3).
393. Schoors S, De Bock K, Cantelmo AR, Georgiadou M, Ghesquière B, Cauwenberghs S, et al. Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metab*. 2014;19(1).
394. Hsin MC, Hsieh YH, Hsiao YH, Chen PN, Wang PH, Yang SF. Carbonic anhydrase ix promotes human cervical cancer cell motility by regulating pfkfb4 expression. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 1;13(5):1–13.
395. Guo M, Breslin JW, Wu MH, Gottardi CJ, Yuan SY. VE-cadherin and β -catenin binding dynamics during histamine-induced endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2008;294(4).
396. Schuijers J, Mokry M, Hatzis P, Cuppen E, Clevers H. Wnt-induced transcriptional activation is exclusively mediated by TCF/LEF. *EMBO J*. 2014;33(2).