

Tesis Doctoral

Papel del metabolismo de la glutamina en el control de la sensibilidad a TRAIL de células tumorales de mama

Marta Mauro Lizcano

2018



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

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **“Papel del metabolismo de la glutamina en el control de la sensibilidad a TRAIL de las células tumorales de mama”** presentado por **Doña Marta Mauro Lizcano**, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizado bajo su supervisión en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea defendido ante el tribunal correspondiente.

Y, para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Sevilla a 17 de septiembre de 2018.

Fdo. Dr. Abelardo López Rivas

Director

Fdo. Dr. Diego Ruano Caballero

Tutor de la Universidad de Sevilla

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Después de 5 años dedicados a esta tesis quiero agradecer el apoyo que me han dado las personas que han estado a mi alrededor y sin el que hubiese sido imposible terminarla,

A mi director de tesis Abelardo por darme la oportunidad de poder realizarla en su laboratorio, por todo lo que me ha ayudado y todo lo que he aprendido durante este tiempo.

Al SC4, a todas las personas que han pasado por él en estos años, con las que siempre he podido contar para resolver dudas, para echarme una mano con los experimentos, ha sido una maravilla trabajar con vosotros.

A los compañeros de pasillo siempre dispuestos a ayudar, y al personal del CABIMER, sobre todo de microscopía y citometría donde he pasado mucho tiempo de esta tesis.

A toda la gente que he conocido en Sevilla, ha merecido mudarse solo por conocerlos.

A mi familia porque incluso en la lejanía sois un gran apoyo.

¡Gracias a todos!

Índice global

Índice de contenidos	III
Abreviaturas	VI
Resumen	1
Introducción	4
Objetivos	48
Material y Métodos	50
Resultados:	
• Capítulo I. Regulación de la sensibilidad a TRAIL en células tumorales de mama triple negativas (TNBC) por la glutamina extracelular.	68
• Capítulo II. Papel del metabolismo de la glutamina en el control de la sensibilidad a TRAIL de células tumorales triple negativas de mama.	86
• Capítulo III. El metabolismo de la glutamina como diana antitumoral en combinación con TRAIL.	98
Discusión:	
• Discusión capítulo I.	106
• Discusión capítulo II.	109
• Discusión capítulo III.	112
Conclusiones	114
Bibliografía	117
Anexo	138

Índice de contenidos

ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	
1. Muerte celular: significado biológico y mecanismos involucrados.....	5
1.1. Apoptosis.....	6
1.2. Caspasas	8
1.3. Rutas de apoptosis.....	15
1.4. Necrosis programada: necroptosis.....	21
1.5. Autofagia.....	22
2. Apo2L/TRAIL	23
2.1. Señalización apoptótica de TRAIL.....	25
2.2. Regulación de la apoptosis inducida por TRAIL.....	27
2.3. Apo2L/TRAIL como terapia antitumoral.....	29
3. Metabolismo de la glutamina.....	31
3.1. Captación de la glutamina del medio extracelular.....	31
3.2. Síntesis de novo de la glutamina.....	32
3.3. Glutamina como fuente de nitrógeno.....	32
3.4. Glutamina como fuente de carbono.....	34
3.5. Efecto de la glutamina en la homeostasis redox.....	35
3.6. La glutamina como modulador de vías de señalización y de la expresión génica.....	35
3.7. Efecto de oncogenes y genes supresores de tumores sobre el metabolismo de la glutamina.....	36
3.8. Potencial terapéutico de inhibidores del metabolismo de la glutamina.....	37
4. Ruta de estrés GCN2-ATF4-CHOP.....	39
4.1. Quinasas de eIF2 α	40
4.2. Señalización de eIF2 α	41
5. Cáncer de mama.....	43
5.1 Tipos de cáncer de mama.....	43
5.2 Cáncer de mama triple negativo.....	44
5.3 Metabolismo de las células madre del cáncer de mama.....	46
OBJETIVOS.....	48
MATERIAL Y MÉTODOS.....	50
1. Materiales.....	51
1.1. Cultivos celulares.....	51
1.2. Reactivos.....	52

1.3.	Anticuerpos.....	55
1.4.	ARN de interferencia.....	56
2.	Métodos.....	56
2.1.	Cuantificación de la apoptosis.....	56
2.2.	Medida de la concentración de proteínas.....	57
2.3.	Inmunodetección de proteínas por western blot.....	57
2.4.	Producción de TRAIL recombinante.....	59
2.5.	Análisis de los receptores de TRAIL en la superficie celular.....	60
2.6.	Transfección transitoria con oligos de ARN de interferencia (siRNA).....	60
2.7.	Producción viral.....	61
2.8.	Infección viral.....	63
2.9.	RT-PCR.....	63
2.10.	RT-Q-PCR.....	64
2.11.	Ensayo de mamíferas.....	65
2.12.	Medida de la síntesis de proteínas.....	66
2.13.	Ensayo de clonogenicidad.....	66
2.14.	Análisis estadístico.....	66

RESULTADOS

1.	Capítulo I. Regulación de la sensibilidad a TRAIL en células tumorales de mama triple negativas (TNBC) por la glutamina extracelular.....	68
1.1.	Sensibilización de células tumorales triple negativas de mama a la apoptosis por TRAIL en medio de cultivo carente de glutamina.....	68
1.2.	Papel de la ruta GCN2/ATF4/CHOP en la regulación de la expresión de TRAIL-R2 tras la privación de glutamina.....	74
1.3.	La sensibilidad a TRAIL no depende del aumento de TRAIL-R2 y de la ruta GCN2/ATF4/CHOP.....	78
1.4.	La modulación de los niveles de FLIP por la glutamina regula la sensibilidad a TRAIL de las células TNBC.....	79
2.	Capítulo II. Papel del metabolismo de la glutamina en el control de la sensibilidad a TRAIL de células tumorales triple negativas de mama.....	86
2.1.	Control de la sensibilidad a TRAIL en células TNBC por el metabolismo citosólico de la glutamina.....	86
2.2.	La inhibición farmacológica y genética del metabolismo de la glutamina baja los niveles de FLIP y sensibilizan a TRAIL a las células TNBC.....	89

2.3.	La inhibición farmacológica y genética reduce los niveles de FLIP y sensibilizan a las células TNBC.....	93
3.	Capítulo III. El metabolismo de la glutamina como diana antitumoral en combinación con TRAIL.....	98
3.1.	La L-Asparaginasa sensibiliza a las células TNBC a la apoptosis inducida por TRAIL.....	98
3.2.	Efecto de la privación de glutamina en la sensibilidad a TRAIL de células madre de cáncer de mama.....	102
DISCUSIÓN		
1.	Discusión capítulo I.....	106
2.	Discusión capítulo II.....	109
3.	Discusión capítulo III.....	112
CONCLUSIONES.....		114
BIBLIOGRAFÍA.....		117
ANEXO.....		138

I-Abreviaturas

4EBP1 Proteína 1 de unión a el eIF4E (*del inglés, eIF4E Binding Protein 1*)

α -KG α -cetoglutarato

ACI Acivicina

ALL Leucemia linfática aguda

AOA Aminoxiacetato

APAF-1 Factor 1 activador de proteasas apoptóticas (*del inglés, Apoptotic Protease- Activating Factor-1*)

APS Persulfato de amonio (*del inglés, Amonium Persulfate*)

ATF4 *del inglés, Activating Transcription Factor 4*

ATF6 *del inglés, Activating Transcription Factor 6*

ATG *del inglés, AuTophagy related Gene*

ATP Adenosín trifosfato

Bak *del inglés, Bcl-2 homologous antagonist killer*

Bax *del inglés, Bcl-2 associated X protein*

Bcl-2 *del inglés, B-Cell Lymphoma/Leukaemia 2*

Bcl-xl *del inglés, Bcl-X-Long*

BH Dominio de homología de las proteínas de la familia de Bcl-2 (*del inglés, Bcl-2 Homology*)

BiP *del inglés, Inmunoglobulin-binding Protein*

BPTES bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-yl)etil sulfido

BSA Seroalbúmina bovina

CARD Dominio reclutador de caspasas (*del inglés, caspase recruitment domain*)

CHOP *del inglés, CCAAT/enhancer-ending Homologous Protein*

CHX Cicloheximida

CRD Dominio rico en cisteínas (*del inglés, Cysteine-Rich-Domain*)

CSCs células madre del cáncer (*del inglés, Cancer Stem Cells*)

CTP Citidina trifosfato

DcR Receptor señuelo (*del inglés, decoy deceptor*)

DD Dominio de muerte (*del inglés, death domain*)

DED Dominio efector de muerte (*del inglés, death efector domain*)

DEPC Dietilpirocarbonato

DIABLO Inhibidor directo de apoptosis (*del inglés, Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with LOw PI*)

DISC Complejo inductor de señales de muerte (*del inglés, death inducing signalling complex*)

DMEM *del inglés, Dubelco's modified Eagle's medium*

DMSO Dimetilsulfóxido

DON 6-diazo-5-oxo-L-norleucina

DR Receptor de muerte (*del inglés, Death Receptor*)

DTT Ditioneitol

EGCG Galato epigallocatequina

ECL Reactivo quimioluminiscente (*del inglés, Enhanced chemiluminescence*)

EDTA Ácido etilendiaminotetracético

EGFR Receptor del factor de crecimiento epidérmico

eIF2 Factor de iniciación de la traducción eIF2 (*del inglés, Eucariotic Translation Initiation Factor 2*)

ER receptor de estrógenos

ERK Quinasa regulada por señales intracelulares (*del inglés, Extracellular Signal Regulated Kinase*)

FADD Dominio de muerte asociado a Fas (*del inglés, Fas-Associated Death Domain*)

FBS Suero fetal bovino (*del inglés, foetal bovine serum*)

FLIP Proteína inhibidora de Caspasa-8 (*del inglés, FLICE-caspase-8 Inhibitory protein*)

GAPDH Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*del inglés, GlycerAldehyde-3- Phosphate DeHydrogenase*)

GCN2 *del inglés, General Control Non-derepressible-2*

GDH Glutamato deshidrogenasa

GFP Proteína verde fluorescente, (*del inglés, Green Fluorescent Protein*)

GLS Glutaminasa

GMP Guanosina monofosfato

GOT Transaminasa glutámico-oxalacética

GPT Transaminasa glutámico-pirúvica

GS Glutamina sintetasa

GTP Guanosín trifosfato

Her2 Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico

HRI *del inglés, Heme-regulated inhibitor*

HRP Peroxidasa de rábano (*del inglés, Horseradish peroxidase*)

hTERT Transcriptasa reversa de la telomerasa humana (*del inglés, human TElomerase Reverse Transcriptase*)

IAP Proteínas inhibidoras de apoptosis (*del inglés, Inhibitor of Apoptosis Proteins*)

IMP Inosina monofosfato

IRE-1 *del inglés, Inositol REquiring protein-1*

IRS Respuesta integral de estrés (*del inglés, integrated stress response*)

JNK *Quinasa N-terminal de c-Jun (del inglés, c-Jun N-terminal Kinase)*

L-ASNasa L-Asparaginasa

MAPK *Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés, Mitogen- activated protein kinase)*

Mcl-1 *del inglés, Mieloide cell leukemia sequence 1*

MEK *Quinasa de MAPK/ERK (del inglés, MAPK/ERK kinase)*

MLKL *del inglés, Mixed Lineage Kinase-domain*

MOMP *Permeabilización de la membrana mitocondrial externa (del inglés, Mitochondrial outer membrane permeabilization)*

mTOR *Diana de rapamicina en mamíferos (del inglés, Mammalian target Of Rapamycin)*

NAC N-acetilcisteína

NEAA *Aminoácidos no esenciales (del inglés, Non-Essential Amino Acids)*

NF-κB *Factor nuclear kappa B (del inglés, Nuclear factor Kappa B)*

NO Óxido nítrico

NT *Células no tratadas, sin tratamiento*

OAA Oxalacetato

OPG Osteoprotegerina

OXPHOS Fosforilación oxidativa

p70-S6K *Quinasa de la proteína ribosomal S6 (del inglés, 70 kDa ribosomal protein S6 Kinase 1)*

PARP *Poli-ADP-ribosa polimerasa*

PBS *Tampón fosfato (del inglés, Phosphate-buffered saline)*

PCD *Muerte celular programada (del inglés, Programmed Cell Death)*

PCR *Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polimerase Chain Reaction)*

PERK *del inglés, protein kinase (PKR)-like ER kinase*

PI *Ioduro de propidio (del inglés, propidium iodide)*

PI3K *Fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés, Phosphatidylinositol 3- Kinase)*

PKR *del inglés, Protein Kinase double-stranded RNA-dependent*

PLAD *dominios extracelulares ricos en cisteínas (del inglés, Preligand Assembly Domain)*

PR *Receptor de progesterona*

PS *Fosfatidilserina (del inglés, Phosphatidilserine)*

PUMA *Modulador de apoptosis regulado por p53 (del inglés, p53-Upregulated Modulator of Apoptosis)*

RE *Retículo Endoplasmático*

RING *del inglés, Really interesting new gene*

RIP1 *Proteína de interacción con el receptor (del inglés, Receptor interacting protein 1)*

ROS *Especies reactivas de oxígeno (del inglés, reactive oxygen species)*

RT-PCR Transcripción reversa de ARN y amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (*del inglés, Reverse Transcriptase-Polymerase-Chain Reaction*)

shRNA *del inglés, Short hairpin RNA*

siRNA ARN de interferencia (*Small interfering RNA*)

TAE Tris-acetato-EDTA

TCA Ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs

TCA ácido tricloroacético (*del inglés, Trichloroacetic acid*)

TE Tris- EDTA

TNBC cáncer de mama triple negativas (*del inglés, Triple Negative Breast Cancer*)

TNF Factor de necrosis tumoral (*del inglés, Tumor Necrosis Factor*)

TNFR1 Receptor de TNF α

TRADD Dominio de muerte asociado al receptor de TNF (*del inglés, TNF Receptor- Associated Death Domain*)

TRAF Factor asociado al receptor de TNF (*del inglés, TNF Receptor- Associated Factor*)

TRAIL Ligando inductor de apoptosis de la familia de TNF (*del inglés, TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*)

TRAIL-R Receptor de TRAIL

uORF Marcos cortos de lectura aguas arriba (*del inglés, Upstream Open Reading Frame*)

UPR Respuesta a proteínas mal plegadas (*del inglés, Unfolded Protein Response*)

II-Resumen

Desde su descubrimiento en 1995, TRAIL ha sido considerado como un ligando de muerte capaz de inducir selectivamente apoptosis en un amplio rango de células tumorales sin afectar a las células normales. Sin embargo, en estos años se ha observado que muchas células tumorales y especialmente de tumores de mama, muestran resistencia a este ligando de muerte. La causa de esta resistencia es diversa y puede producirse tanto a nivel extracelular, previo a la inducción de la señalización de TRAIL en el interior celular, como a nivel intracelular, por bloqueo de las rutas de señalización. Trabajos previos indicaban que la combinación de TRAIL con otros tratamientos que afectan al metabolismo tumoral podía ser una buena estrategia para vencer la resistencia de células tumorales de mama.

La glutamina juega un papel importante en el metabolismo de las células tumorales a través de su contribución a la homeostasis redox, la bioenergética, la síntesis de macromoléculas y la señalización. Los cánceres de mama triple negativos (TNBC) son altamente metastásicos y están asociados con un mal pronóstico. Este tipo de cánceres todavía representan un reto importante en su tratamiento, siendo la quimioterapia convencional la única opción terapéutica. Curiosamente, diferentes estudios han demostrado que las células TNBC son dependientes de la glutamina exógena para su supervivencia y crecimiento. En este sentido, se han propuesto inhibidores del transporte y metabolismo de la glutamina como potenciales terapias antitumorales.

En esta tesis hemos demostrado que la privación de glutamina produce un aumento de la expresión de los receptores TRAIL-R2/DR5 y una bajada de los niveles de la proteína antiapoptótica FLIP en células TNBC, seguido de una sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL. La quinasa GCN2, cuya activación ocurre en respuesta a la falta de aminoácidos, es responsable de la inducción de la expresión de TRAIL-R2 a través de una vía de señalización que implica a los factores de transcripción ATF4 y CHOP. Por el contrario, la bajada de los niveles celulares de FLIP tras la privación de glutamina en TNBC se produce por un mecanismo independiente de GCN2, en el que tiene lugar una inhibición general de la síntesis de proteínas, como consecuencia de la falta de aminoácidos no esenciales. Aunque el aumento de la expresión de los niveles de TRAIL-R2 mediante la activación de la ruta de GCN2 puede contribuir a la sensibilización a TRAIL, los resultados obtenidos mediante interferencia de ARN demuestran que la reducción de los niveles de cFLIP es el evento responsable de la marcada sensibilización de las células TNBC a la apoptosis inducida por TRAIL tras privación de glutamina.

Además, nuestros resultados demuestran que la inhibición farmacológica de las transaminasas aumenta los niveles de TRAIL-R2 en membrana e inhibe la expresión de FLIP, sensibilizando a las

células TNBC a TRAIL. Este último dato junto a otros obtenidos mediante el silenciamiento de enzimas clave implicadas en el metabolismo de la glutamina han permitido determinar la implicación de dicho metabolismo en la regulación de los niveles de FLIP y en la sensibilización a TRAIL.

Por otro lado, la actividad glutaminasa de la enzima L-asparaginasa (L-ASNasa), utilizada en terapia antitumoral de leucemia linfática aguda, produce la sensibilización a TRAIL en las células TNBC. Los resultados obtenidos muestran que la L-ASNasa provoca efectos similares a la privación de glutamina como son el aumento de los niveles de TRAIL-R2 y la bajada de FLIP en las células TNBC.

Por último, se ha llevado a cabo un estudio del papel del metabolismo de la glutamina en la sensibilidad de las células iniciadoras del cáncer de mama triple negativo, población responsable de la resistencia a las terapias convencionales y de la reaparición de los tumores. Los resultados obtenidos demuestran que este tipo de células también es dependiente de la glutamina extracelular para mantener la resistencia a TRAIL.

Todos estos datos indican que el metabolismo de la glutamina podría ser una diana antitumoral en combinación con la activación de los receptores proapoptóticos de TRAIL en TNBC.

III-Introducción

1. Muerte celular: significado biológico y mecanismos involucrados

La muerte celular es un proceso biológico fundamental que juega un papel clave durante el desarrollo embrionario y la regulación de la homeostasis tisular en organismos adultos, mediante la eliminación de células dañadas o que ya no son necesarias (Degterev & Yuan 2008).

Es un proceso del que se tiene conocimiento desde que Carl Vogt en 1842 lo describiese en la espina dorsal y cartílago adyacente de anfibios. Esta muerte descrita por los primeros histólogos fue más tarde definida como un proceso no accidental durante el siglo XX, acuñándose el termino Muerte Celular Programada (PCD, del inglés Programmed Cell Death) por Richard A. Lockshin en 1964, en su estudio del daño producido en los músculos intersegmentales de los gusanos de seda durante la metamorfosis (Lockshin & Williams 1964). En este tiempo el embriólogo John W. Saunders Jr., también reconocía la existencia de patrones reproducibles de muerte celular en embriones de pollo (Saunders 1966). Tras estos descubrimientos se fue caracterizando morfológicamente esta muerte hasta que una década después se estableció la primera clasificación:

- Muerte celular de tipo I: caracterizada por la condensación de la cromatina, la retracción de pseudopodos, la reducción del citoplasma, la fragmentación nuclear, la división sin pérdida de integridad física o “blebbing” de la membrana plasmática y la fagocitosis de la célula (apoptosis).
- Muerte celular de tipo II: caracterizada por una masiva vacuolización del citoplasma (autofagia).
- Muerte celular tipo III: caracterizada por no presentar ninguna de las manifestaciones anteriores (necrosis).

Sin embargo, en los últimos años esta clasificación se ha vuelto más compleja ya que se han añadido diferentes características morfológicas, criterios enzimáticos, aspectos funcionales o características inmunológicas. En 2012, el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) propuso sustituirla por una clasificación más objetiva.

La NCCD propone clasificar los distintos tipos de muerte celular en dos grandes grupos mutuamente excluyentes: Muerte Celular Accidental (ACD) o Muerte Celular Regulada (RCD). La

ACD se produce por acción severa de agentes físicos, químicos o mecánicos y no requiere la intervención de ninguna maquinaria molecular específica. Esto provoca que no pueda ser prevenida o modulada y, por tanto, no constituye una diana de estudio para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. La RCD es aquella que esté programada o no, su iniciación o ejecución esta mediada por una maquinaria celular determinada, y por lo tanto puede ser modificada mediante intervenciones farmacológicas o genéticas. La RCD será denominada Muerte Celular Programada (PCD) cuando ocurre en ausencia de cualquier perturbación exógena y opera dentro de un programa fisiológico para el desarrollo o renovación de los tejidos. La RCD también puede originarse ante perturbaciones del ambiente extracelular o intracelular. Cuando estas perturbaciones son demasiado intensas o prolongadas en el tiempo para que las respuestas adaptativas puedan hacer frente a este estrés y restaurar la homeostasis celular(Galluzzi et al., 2018).

En ningún caso hay un evento bioquímico que determine que la célula está sufriendo un proceso de muerte celular, según la NCCD una célula se considera muerta cuando cumple alguna de las siguientes características moleculares (Galluzzi et al., 2012)(Galluzzi et al., 2015):

- Pérdida de la integridad de la membrana plasmática, lo que implica la pérdida de la identidad celular.
- Fragmentación celular completa dando lugar a los comúnmente denominados cuerpos apoptóticos.
- Captura y digestión por células adyacentes in vivo y posterior degradación lisosomal.

1.1. Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular programada conservado que tiene lugar en organismos pluricelulares superiores tanto durante su desarrollo embrionario como en la fase adulta. Este mecanismo permite que una célula anormal que pone en riesgo la vida del organismo sea autodegradada de forma regulada, segura y sin provocar daño a las células colindantes (Ashkenazi 2008).

Kerr, Wyllie y Currie fueron los primeros en describir este tipo de muerte en la década de 1970, que se caracterizaba por una condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y el “blebbing” de la membrana plasmática, acuñando el termino apoptosis (Kerr, Wyllie, & Currie 1972). Igualmente se demostró en los años posteriores otros eventos bioquímicos de este tipo

de muerte como la fragmentación nuclear de la cromatina en fragmentos múltiples de 180 pares de bases, la translocación de la fosfatidilserina (PS) de la cara interna a la externa de la membrana plasmática y la existencia de proteínas implicadas en el reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas (Fadok et al. 1992)(Wyllie, Kerr, & Currie 1980). Más tarde, los estudios de Horvitz y colaboradores en el nematodo *Caenorhabditis elegans* demostraron que la apoptosis era un proceso controlado por genes específicos que se ejecutaba de manera ordenada (Ellis & Horvitz 1986)(Ellis & Horvitz 1991). Los genes descubiertos se denominaron CED (del inglés, Cell Death Abnormal), y rápidamente se identificaron sus homólogos en mamíferos, aunque el proceso en estos últimos es mucho más complejo (Degterev & Yuan 2008).

Con todos los datos obtenidos se pudo hacer una cronología de los eventos morfológicos y bioquímicos que se producen durante el proceso apoptótico. Tras la inducción de la apoptosis, se produce una condensación del citosol y compactación de la cromatina dando lugar a la formación de densos agregados que se deslocalizan y desplazan hacia la membrana nuclear. Posteriormente, sobre la cromatina actúan las endonucleasas que cortan el ADN en la región internucleosómica. Al mismo tiempo, el retículo endoplasmático se dilata originando unas vesículas que tienden a fusionarse con la membrana celular, adquiriendo una morfología tipo burbuja conocida como “blebbing”. Finalmente, la célula se divide en los llamados cuerpos apoptóticos que son rápidamente reconocidos y fagocitados por los macrófagos y otras células vecinas lo que impide la exposición del material celular al sistema inmune y por tanto una respuesta inflamatoria (Taylor, Cullen, & Martin 2008) (Figura 1). El reconocimiento de las células apoptóticas por parte de los fagocitos se debe a ciertas señales “eat me” que se exponen en la membrana plasmática de las células apoptóticas como la PS que, como hemos dicho anteriormente, en las fases tempranas de la apoptosis se transloca desde la región interna a la externa de la membrana (Fadok et al. 1992)(Fadok et al. 1998). La anexina I es otra proteína que se expone en la superficie de la célula apoptótica y, además, se pueden producir modificaciones en proteínas de membrana como ICAM-3 y CD31, así como cambios en la composición de azúcares y en la carga eléctrica de la superficie celular(Henson, Bratton, & Fadok 2001)(Grimsley & Ravichandran 2003).

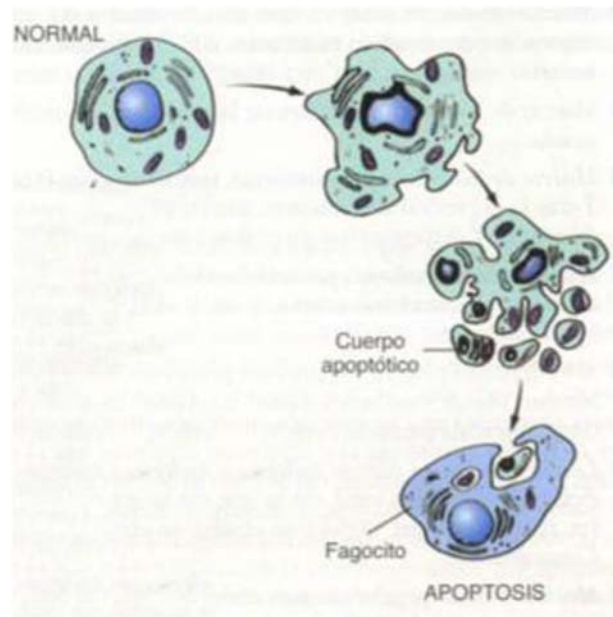


Figura 1 | Etapas del proceso de apoptosis.

La apoptosis es clave en el desarrollo de los tejidos y su mantenimiento, así como la eliminación de células que deben ser reemplazadas, que no se necesitan más o están dañadas. Por ello, su alteración tanto por exceso como por defecto puede dar lugar a ciertas patologías como desordenes neurodegenerativos (Alzheimer, Parkinson), cardiovasculares (muerte celular tras isquemia cardiaca), autoinmunes (diabetes tipo I, lupus eritematoso, artritis reumatoide) o cáncer (Ashkenazi 2008).

1.2. Caspasas

Las caspasas son los componentes enzimáticos principales de la respuesta apoptótica, cuya activación es la responsable de todos los cambios morfológicos que caracterizan este tipo de muerte. Las caspasas (del inglés, Cysteine-dependent ASPartate-directed ProteASES) son una familia de proteasas con cisteína en el centro activo y especificidad de corte tras los residuos de ácido aspártico, muy conservadas evolutivamente y ampliamente reconocidas por su papel en el control de la muerte celular y la inflamación (Green & Llambi 2015) (Shalini et al. 2015).

Estructura y clasificación.

Se han descrito 11 genes que codifican para 11 caspasas humanas, de la caspasa 1 a la 10 y la caspasa 14. Esta última caspasa se expresa en queratinocitos, está implicada en su diferenciación y no tiene, al parecer, ningún papel en la apoptosis e inflamación (Pistritto et al. 2002).

Las caspasas de mamíferos se pueden clasificar en 2 grandes subgrupos bien diferenciados funcionalmente: las caspasas pro-inflamatorias (caspasas -1, -4, -5, -11, -12) que regulan la maduración de las citoquinas durante el proceso inflamatorio y las caspasas pro-apoptóticas (caspasas -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) las cuales inician y ejecutan el proceso de apoptosis. Las caspasas pro-apoptóticas se dividen a su vez en caspasas iniciadoras, que son capaces de autoactivarse (caspasas -2, -8, -9, -10) y caspasas efectoras, que necesitan otra caspasa para su activación (caspasas -3, -6, -7). Esta clasificación puede ser demasiado simplista ya que hay evidencias que indican que las caspasas tienen múltiples funciones en otros procesos celulares que no serían clasificados como pro-apoptóticos o pro-inflamatorios como migración y proliferación celular, regeneración de tejidos o diferenciación. Además, la activación de las caspasas pro-inflamatorias puede inducir apoptosis en algunos sistemas (Li & Yuan 2008).

Las caspasas son sintetizadas como zimógenos que contienen un prodominio, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). El centro catalítico de la caspasa se encuentra en la subunidad p20, se trata de una cisteína (Cys285) que forma parte de una secuencia de aminoácidos muy conservados "QACXG". Las caspasas reconocen a sus sustratos por al menos cuatro aminoácidos P4-P3-P2-P1, y cortan después del aminoácido C-terminal (P1), que normalmente es un residuo aspártico. El residuo P3 suele ser glutámico, y los residuos P2 y P4 son variables, por lo que la secuencia de especificidad de corte de una caspasa puede ser X-Glu-X-Asp. Los aminoácidos de la enzima que se unen al sustrato y, que, por tanto, reconocen la secuencia P4-P3-P2-P1 se denominan S4-S3-S2-S1. S1 y S3 son residuos muy conservados en las diferentes caspasas, al contrario que S2 y S4, que varían significativamente entre las caspasas y originan las diferentes especificidades por el sustrato en las posiciones P2 y P4 (Li & Yuan 2008). La principal diferencia estructural entre ambos tipos es que las caspasas iniciadoras poseen un prodominio N-terminal de gran tamaño (unos 100 aminoácidos) que presenta uno o dos dominios de interacción con proteínas adaptadoras: DED (del inglés, Death Effector Domain), que se encuentra en la caspasa -8 y -10, o CARD (del inglés, Caspase Recruitment Domain), presente en las caspasas -2 y -9, al igual que en las caspasas pro-inflamatorias -1, -4 y -6.

Por su parte, las caspasas efectoras presentan un extremo N-terminal de menor tamaño (menor de 30 aminoácidos) y no contiene dominios DED o CARD (Pop & Salvesen 2009)(Figura 2).

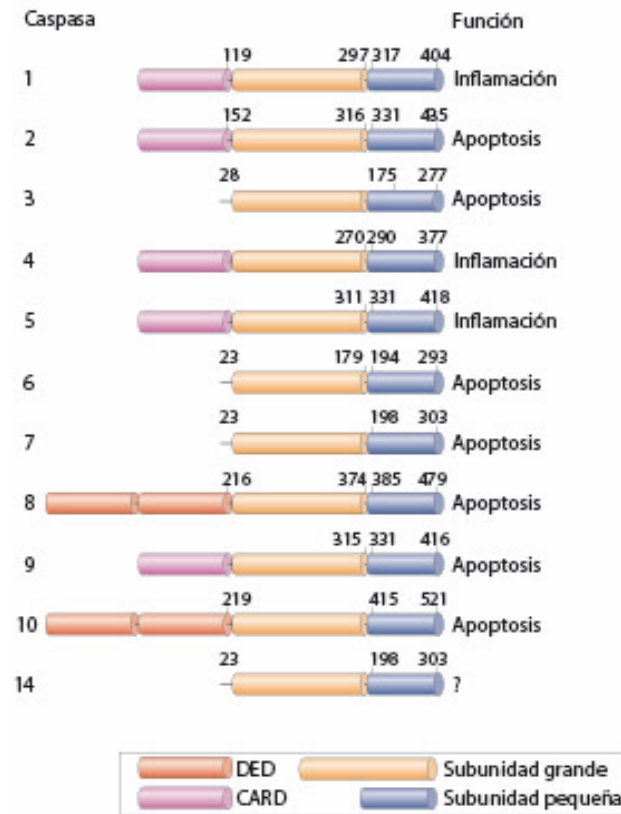


Figura 2 | Estructura de las caspasas. Adaptado de “Apoptosis: controlled demolition at the cellular level” (Taylor RC et al. 2008).

Mecanismos de activación.

Para la activación de las caspasas iniciadoras se requiere su homodimerización ya que se encuentran como monómeros inactivos. La dimerización se ve facilitada por reclutadores de caspasas que se unen a plataformas de activación, y requiere de una reorganización espacial de la subunidad grande y pequeña, con la posterior eliminación por proteólisis del prodominio (Figura 3). Tras un estímulo apoptótico como la unión del ligando de muerte a su receptor o un estímulo intracelular como el daño al DNA, las caspasas se reclutan en estos complejos multiprotéicos a través de sus dominios DED o CARD que interaccionan con las proteínas

adaptadoras, incrementando su concentración a nivel local lo que genera una dimerización por proximidad que induce su activación. Cada caspasa tiene su propia plataforma de activación: el DISC (del inglés, Death Inducing Signalling Complex) que recluta y activa a la caspasa -8 y -10; el apoptosoma que activa a la caspasa -9; y el PIDDosoma implicado en la activación de la caspasa -2.

Este modelo propone que la dimerización induciría un cambio conformacional tal, que sería suficiente para formar el sitio activo y permitir la unión de sustratos, incluso en ausencia de los cortes proteolíticos. De hecho, la proteólisis interna no activa a estas caspasas sino que es un evento secundario que favorece la estabilización del dímero activo y la señalización pro-apoptótica. Las caspasas efectoras, por su parte, se encuentran como homodímeros inactivos que deben ser reconocidas y cortadas por las caspasas iniciadoras para ser activadas (Figura 3). El proceso proteolítico favorece un reordenamiento estructural que hace accesible el sitio activo, favoreciendo la interacción con sus sustratos y la señalización apoptótica (Green & Llambi 2015)(Pop & Salvesen 2009)(Li & Yuan 2008).

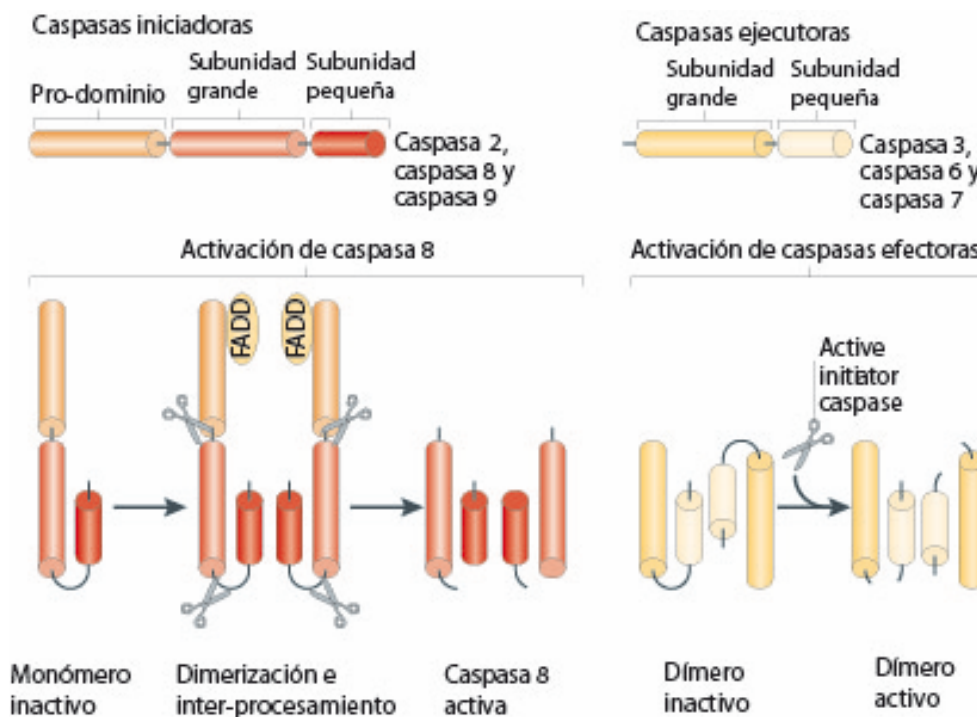


Figura 3 | Estructura y mecanismo de activación de las caspasas iniciadoras y efectoras. Adaptado de “Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond” (Tait & Green 2010).

Mecanismos de regulación.

Ya que la proteólisis es irreversible, la acción de las caspasas está muy regulada. Para prevenir respuestas fisiológicas indeseadas, la célula utiliza tres estrategias: inhibición de caspasas, degradación de caspasas e inhibidores decoy (Pop & Salvesen 2009).

La fosforilación es uno de los principales mecanismos de regulación en la célula. En este sentido se han descrito múltiples quinasas capaces de fosforilar a caspasas en respuesta a diversos estímulos o en distintas etapas de desarrollo. Por ejemplo, el residuo treonina 125 de la caspasa -9 puede ser fosforilado por diversas quinasas como ERK1/2 y CDK1 (Tait & Green 2010). Del mismo modo, hay múltiples ejemplos de fosforilación en otras caspasas como la que se produce directamente por p38 MAPK que inhibe la actividad de la caspasa -8 y -3, y protege a los neutrófilos de la muerte inducida por activación de CD95/FAS (Alvarado-Kristensson et al. 2004). CDK1 durante la mitosis fosforila a caspasa-8 en la serina 387 inhibiendo su procesamiento y activación (Matthess et al. 2010). Además, según los niveles celulares de NADPH en la célula caspasa -2 será fosforilada en su dominio CARD por CaMKII impidiendo su asociación en el PIDDosoma (Nutt et al. 2009).

La ubiquitinación también juega un papel importante en la regulación de las caspasas. En este sentido se ha descrito que caspasa -8 es poliubiquitinada en el DISC por la E3 ubiquitin ligasa CUL3 tras la unión del ligando TRAIL a su receptor, esta ubiquitinación es necesaria para su completa activación (Jin et al. 2009). Por otro lado, se ha descrito que la subunidad p20 de la caspasa -9 activa puede ser poliubiquitinada por la E3 ubiquitin ligasa XIAP, aunque no se conoce con certeza el papel de esta ubiquitinación en el control del proceso de apoptosis (Morizane et al. 2005). Caspasa -3 también puede ser modificada por ubiquitinación por cIAP induciendo su degradación en el proteasoma e incrementando la resistencia al ligando de muerte TRAIL (Choi et al. 2009).

Por otro lado, la nitrosilación afecta a la regulación de las caspasas. El óxido nítrico (NO) induce S-nitrosilación de caspasa-8, lo que reduce la sensibilidad a apoptosis a través de TNF- α en hepatocitos. Igualmente, altos niveles de NO, a través de una sintasa inducible por NO, inhiben la actividad de la caspasa -8, de la caspasa -3 y la liberación de citocromo-c (Hess et al. 2005).

Además de las modificaciones post-traduccionales hay proteínas que interaccionan directamente con las caspasas. Es el caso de las IAPs, una familia de proteínas muy conservada

durante la evolución que pueden inhibir directamente a las caspasas iniciadoras y efectoras. En humanos se han descrito 8 miembros de esta familia: NAIP, XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivina, ML-IAP, ILP2 y Apollon.

La principal característica estructural de esta familia de proteínas es que todos los miembros tienen al menos un dominio BIR (del inglés, Baculoviral IAP Repeat), el cual es crucial para la inhibición de las caspasas así como para interactuar con otras proteínas. Otras IAPs presentan un dominio C-terminal RING (del inglés, Really Interesting New Gene), que presenta actividad E3 ubiquitin ligasa (Riedl & Shi 2004).

XIAP es el miembro mejor caracterizado, posee tres dominios BIR en su extremo N-terminal y un dominio RING en el C-terminal. XIAP inhibe de forma directa a través de sus dominios BIR a la caspasa iniciadora 9 y a las caspasas efectoras -3 y -7 (Eckelman, Salvesen, & Scott 2006).

Por último, la proteína trampa o decoy cFLIP realiza una función de regulación de la activación de las caspasas. Estas proteínas son estructuralmente similares a las caspasas, y por tanto, compiten por la unión a las proteínas adaptadoras en las plataformas de activación. cFLIP (del inglés, FLICE-like inhibitory protein) es denominada así por su elevada homología con la caspasa -8, originalmente conocida como FLICE. En mamíferos se han identificado hasta 13 isoformas de cFLIP generadas por splicing alternativo, sin embargo, solo tres se han detectado a nivel de proteínas. Son la isoforma larga de 55 KDa (cFLIPL) y la corta de 26 KDa (cFLIPS) (Djerbi et al. 2001), y una tercera isoforma aislada de la línea celular Raji (cFLIPR) de 24 KDa (Golks et al. 2005). Estructuralmente, la isoforma larga se compone de dos dominios DED similares a los de las caspasas -8 y -10 en el extremo aminoterminal y un dominio pseudocaspasa sin actividad catalítica en el extremo carboxiterminal (Irmeler et al. 1997). Por su parte la isoforma corta solo tiene los dominios DED (Figura 4). La unión de la isoforma corta al DISC impide por completo la unión de caspasa -8 y su procesamiento, sin embargo, la unión de la isoforma larga parece que permite un procesamiento parcial.



Figura 4 | Estructura de cFLIP. Adaptado de “cFLIP regulation of lymphocyte activation and development” (Budd, Yeh, & Tschopp 2006).

En contraste a los estudios que describen que cFLIPL inhibe la activación de caspasa -8, ciertos trabajos muestran que la unión de esta isoforma puede facilitar la activación de caspasas. La concentración local de cFLIPL en el DISC determinara su papel inhibitor o activador, cuando los niveles son altos se produce la inhibición de la apoptosis ya que impide la oligomerización de la caspasa 8 dando lugar a una pro-caspasa-8 inactiva. Sin embargo niveles fisiológicos de cFLIPL permiten la activación de la ruta de muerte (Hughes et al. 2016)(Figura 5).

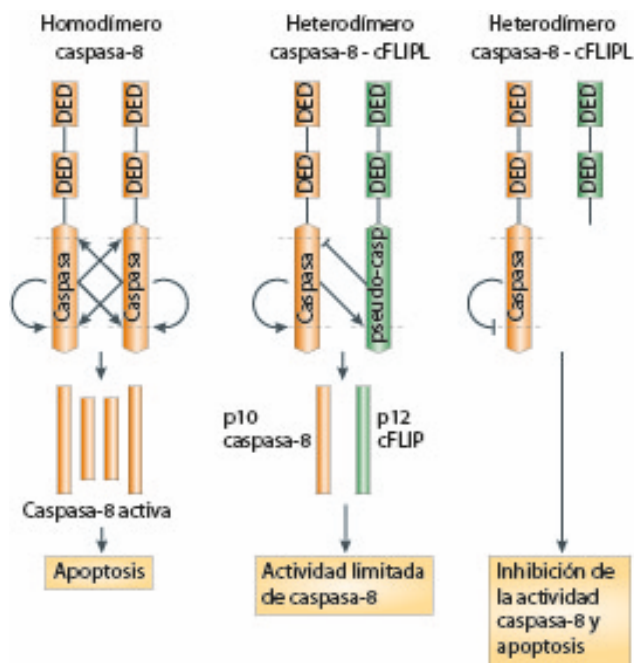


Figura 5 | Regulación de la actividad caspasa -8 por c-FLIP. Adaptado de “cFLIP regulation of lymphocyte activation and development” (Budd, Yeh, & Tschopp 2006).

1.3. Rutas de apoptosis

En vertebrados existen dos rutas de señalización de apoptosis que darán lugar a la activación de caspasas: la ruta intrínseca o mitocondrial y la ruta extrínseca o de receptores de muerte.

Ruta apoptótica mitocondrial o intrínseca

Esta ruta se activa en respuesta a diferentes tipos de estrés intracelular como daño en el DNA, estrés oxidativo, saturación de calcio en el citosol o acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico. En este mecanismo de muerte, las caspasas ejecutoras son activadas por procesamiento por la caspasa -9, una vez esta ha sido activada en una plataforma de activación denominada apoptosoma, formada por la proteína adaptadora Apaf-1 (del inglés, Apoptosis protease-activating factor-1) y el citocromo c liberado de la mitocondria.

Independientemente del estímulo que desencadene el proceso de apoptosis intrínseca, el evento crítico del que depende esta ruta es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP, del inglés Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization), que provoca la liberación de todas las moléculas solubles que se encuentran en el espacio entre las membranas mitocondriales. Entre estas moléculas se liberan factores proapoptóticos que inducen la activación de caspasa -9 y -3, y con ello la muerte celular (Galluzzi et al., 2015)(Galluzzi et al., 2012) Específicamente, la formación de la MOMP permitirá la liberación de citocromo-c al citosol el cual se unirá a Apaf-1, lo que provoca la hidrólisis del cofactor dATP de Apaf-1 a dADP (Kim et al. 2005). El posterior intercambio de dADP por dATP exógeno permite la oligomerización de siete unidades de Apaf-1-dATP-citocromo-c lo que constituye un apoptosoma activo. En el centro del apoptosoma, las proteínas Apaf-1 interaccionan mediante sus dominios CARDS con el dominio CARD de la pro-caspasa 9 que está siendo reclutada en forma de monómeros inactivos. Estas pro-caspasas dimerizarán por proximidad provocando su autoprocesamiento y activación. (Yu et al. 2005) (Yuan et al. 2010). Debido a su mayor afinidad por la forma no procesada, la pro-caspasa-9 desplaza a la caspasa 9 activa en el apoptosoma generando un ciclo continuo de reclutamiento, procesamiento, activación y liberación (Malladi, Fearnhead, & Bratton 2009). Por otra parte, la mitocondria también puede liberar al citosol las proteínas Smac/DIABLO (del inglés, Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein LOw PI) y Omi/HtrA2 que inducen apoptosis de manera indirecta bloqueando la actividad de miembros de la familia de los IAPs (van Loo et al. 2002) (Figura 6).

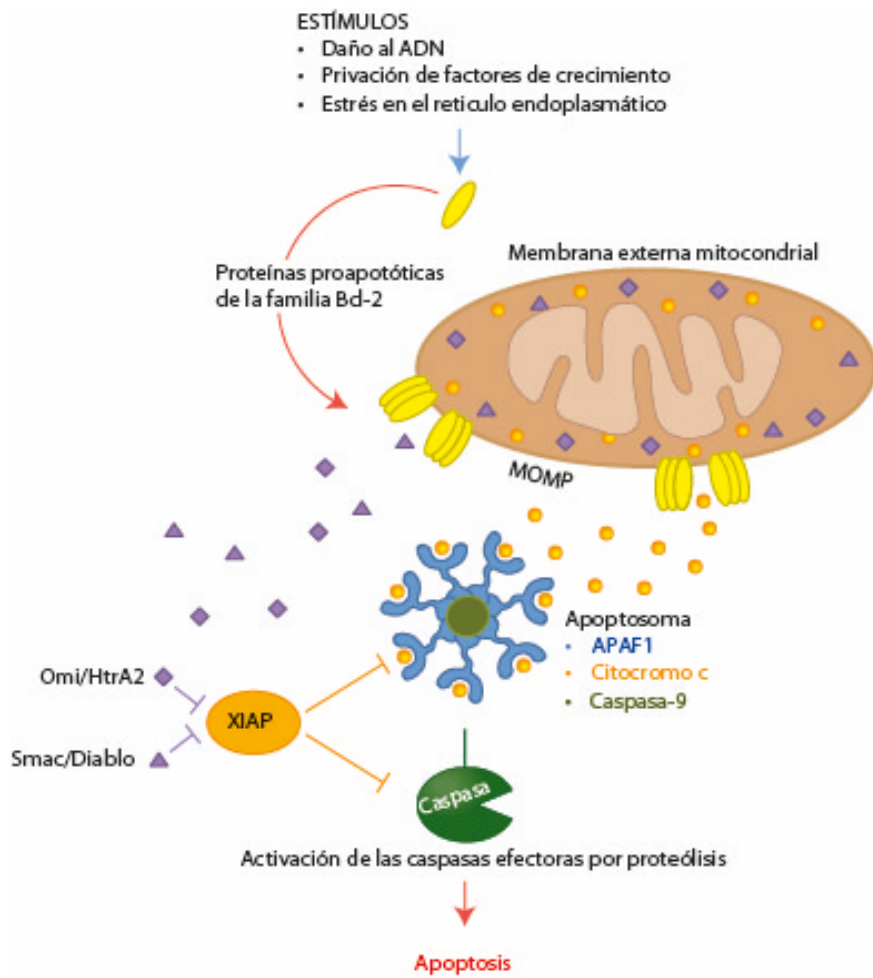


Figura 6 | Ruta apoptótica mitocondrial. Adaptado de “Cell death signalling” (Green & Llambi 2015).

Este proceso de apoptosis por la ruta intrínseca está principalmente regulado por miembros de la familia Bcl-2. Todas las proteínas de esta familia comparten de uno hasta cuatro dominios BH (del inglés, Bcl-2 Homology domain) (Figura 7) y se pueden clasificar en tres grupos que se diferencian por estructura y función:

- Proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, cuyos principales componentes son: Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Mcl-1 y Bfl1/A1. Se caracterizan por presentar cuatro dominios homólogos (BH1-4). Tienen la función de mantener la integridad de la membrana mitocondrial externa mediante la inhibición directa de las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas.

- Proteínas proapoptóticas efectoras: Bax y Bak. Responsables directos de la pérdida de integridad de la membrana externa mitocondrial. Presentan dominios transmembrana que les permite insertarse establemente en la membrana y dominios estructurales que facilitan la oligomerización y la formación de poros.
- Proteínas proapoptóticas BH3-only o iniciadoras. Solo presentan un dominio BH. Se dividen en sensibilizadoras (Bad, Noxa) que únicamente tienen capacidad para interactuar con las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas y en activadoras directas (Bid, Bim y Puma), pueden interactuar tanto con las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas como con las efectoras induciendo directamente la oligomerización de Bak y Bax y por tanto la MOMP (Chipuk et al. 2010).

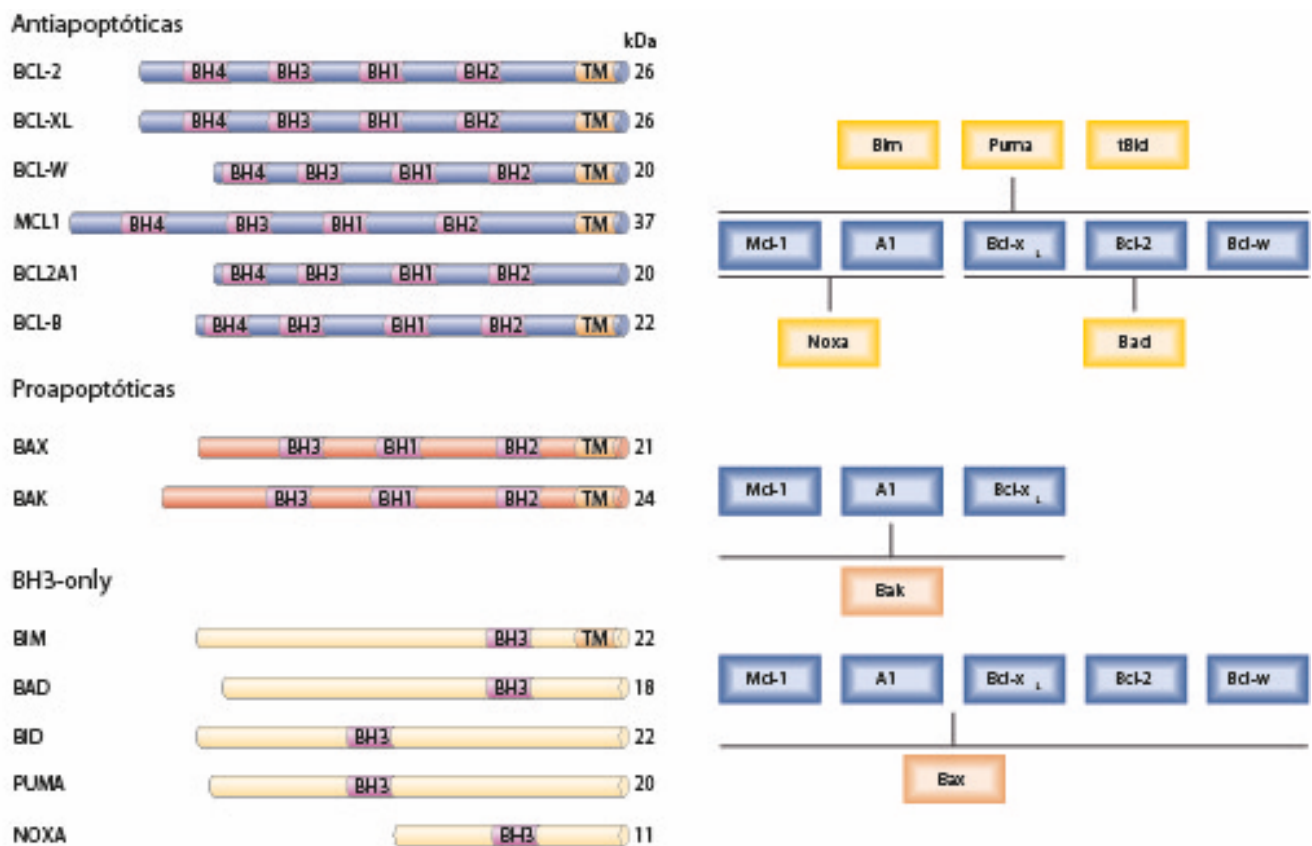


Figura 7 | Estructura e interacciones entre los miembros de la familia Bcl-2. Adaptado de “Apoptosis: controlled demolition at the celular levels” (Taylor, Cullen, & Martin 2008) y “Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other disease” (Strasser, Cory, & Adams 2011).

El evento central que permite la iniciación de la apoptosis es la activación de Bak y Bax en la membrana mitocondrial externa. Bax se encuentra principalmente en el citosol, aunque una pequeña porción se encuentra viajando continuamente del citosol a la membrana mitocondrial y viceversa, ya que la presencia de miembros antiapoptóticos Bcl-2 o Bcl-X en la membrana mitocondrial impediría su acumulación y autoactivación. Por otro lado, Bak se encuentra inactivo, y anclado en la membrana externa mitocondrial. De este modo, en respuesta a un estímulo apoptótico, se produce la homo-oligomerización y activación de Bax y Bak que conducirá a la permeabilización de la membrana externa y a la liberación de citocromo-c al citosol. Sin embargo, no existe un mecanismo consenso que explique cómo tiene lugar la translocación de Bax a la mitocondria ni como se da la activación de Bax y Bak. Existen 3 modelos teóricos no excluyentes que tratan de explicarlo. El modelo de activación directa postula que ciertas proteínas BH3-only (Bim, Bid y Puma) se unen transitoriamente a Bax y Bak activándolas de forma que las otras BH3-only sensibilizadoras (Bad y Noxa) podrían unirse a miembros antiapoptóticos de la familia (Westphal et al. 2011). En el modelo de activación indirecta se propone que las proteínas Bax y Bak se encuentran siempre unidas a los miembros Bcl-2 anti-apoptóticos que estarían impidiendo su activación. Tras un estímulo apoptótico, las proteínas BH3-only se unirían a los miembros anti-apoptóticos, liberando a Bax y Bak y permitiendo su oligomerización (Willis 2007). Por último, en el modelo unificado las proteínas anti-apoptóticas estarían impidiendo la MOMP de dos modos: secuestrando a las proteínas BH3-only activadoras y secuestrando a las proteínas efectoras Bax y Bak una vez activadas (Llambi et al. 2011).

Ruta apoptótica extrínseca

La ruta extrínseca se inicia en respuesta a señales de estrés extracelular que son detectadas y transmitidas al interior celular mediante receptores de muerte específicos. Los receptores de muerte son un subconjunto dentro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), e incluyen a TNFR1, FAS/CD95 y TRAIL-R (1-2). La unión del ligando de muerte (FAS/CD95L, TNF α y TRAIL) a sus receptores específicos induce la activación de una plataforma de activación de caspasas iniciadoras que provocara en última instancia la muerte celular. Los receptores de muerte son proteínas transmembrana de tipo I que en el extremo N-terminal extracelular presentan de dos a cuatro dominios ricos en cisteína (CRD, del inglés Cystein-rich Domain) implicados en la unión con su ligando. En el extremo C-terminal intracelular poseen dominios específicos denominados dominios de muerte (DD, del inglés Death Domain) esenciales para la

transmisión de la señal y que actúan como sitios de unión para el reclutamiento de las proteínas adaptadoras.

Los ligandos de muerte son proteínas transmembrana de tipo II, poseen un extremo C-terminal en el espacio extracelular que presenta un dominio de homología al TNF o THD (del inglés, TNF-Homology Domain) por el cual se une al receptor (Bodmer, Schneider, & Tschopp 2002). Los receptores se encuentran formando homo-trímeros en la superficie celular y las interacciones necesarias para formar estos complejos se producen a través de los dominios extracelulares ricos en cisteínas PLAD (del inglés, Preligand Assembly Domain) localizados en el primer CRD del receptor (Clancy et al. 2005)(Chan 2007). Cuando el homotrímero del ligando de muerte se une a tres receptores de FAS/CD95 o TRAIL-R se produce un cambio conformacional que permite el reclutamiento intracelular de la proteína adaptadora FADD (del inglés, Fas Associated Death Domain) a través de una interacción DD-DD. FADD además tiene un dominio DED que le permite interactuar con la pro-caspasa 8 y de este modo forman el complejo de activación de muerte DISC (del inglés, Death Inducing Signalling Complex).

Se han establecido dos tipos celulares en función de cómo señalizan los receptores de muerte para apoptosis (Figura 8A). Las células tipo I promueven apoptosis a través de la activación directa de las caspasas efectoras -3 y -7 por la caspasa iniciadora. Por su parte, en las células tipo II, la activación de la caspasa-8 no es suficiente ya que las caspasas ejecutoras están inhibidas por XIAP y por tanto la apoptosis está bloqueada. Por ello, necesitan la activación de la ruta mitocondrial para la consiguiente activación de las caspasas efectoras mediante el bloqueo de XIAP por proteínas como SMAC/DIABLO liberadas de la mitocondria. La conexión entre ambas rutas esta mediada por la proteína BH3-only, Bid. Tras la activación de la caspasa -8 en el DISC, esta será capaz de procesar Bid generando su forma activa truncada tBid. Esta forma activa se transloca a la mitocondria donde induce la dimerización de Bax y Bak en la superficie de la membrana mitocondrial.

La señalización que se produce a través de TNFR1 es más compleja y puede dar lugar a tres resultados diferentes: supervivencia, apoptosis y necrosis. La unión del homo-trímero de TNF alfa al receptor TNFR1 permite la formación de dos complejos, uno inicial (complejo I) que promueve la supervivencia (Figura 8B) y un segundo complejo (complejo II) que provoca muerte celular (Figura 8C). La unión del ligando al receptor previamente preasociado formando un trímero da lugar a un cambio conformacional que permite el reclutamiento de la proteína adaptadora TRADD (del inglés, TNF-R Associated Death Domain) a través del dominio DD. TRADD

no se une directamente ni activa a caspasa 8, sino que recluta proteínas adicionales como RIP1 (del inglés, Receptor-interacting protein 1) a través de los dominios de muerte presentes en ambas. La proteína adaptadora TRAF2 (del inglés, Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2) y las E3 ubiquitin ligasas cIAP1/2 también se reclutan en el complejo I. Componentes de este complejo, incluyendo a RIP1, son ubiquitinados por las cIAPs lo que culmina en la activación de la ruta de señalización NF- κ B y en una respuesta inflamatoria. Además, el complejo I puede activar otras rutas de señalización como JNK y p38. Cuando no se produce ubiquitinación de RIP1 por inhibición de ubiquitin ligasas en el complejo I o por una de-ubiquitinación directa por enzimas como CYLD, RIP1 formará el complejo II junto a FADD, TRADD y pro-caspasa -8 dando lugar a apoptosis (Figura 8C). La isoforma larga de FLIP y la pro-caspasa-8 pueden formar un heterodímero que aunque sea catalíticamente activo no induce apoptosis. Sin embargo, la inhibición de la caspasa -8 permite a RIP1 reclutar a RIP3 y formar un tercer complejo denominado necrosoma (Figura 8C). RIP1 fosforila a RIP3 lo que conduce a la fosforilación de MLKL (del inglés, Mixed Lineage Kinase-domain) que hace que oligomeric y se trasloque a la membrana plasmática. Lo que en última instancia perturba la integridad de la membrana y promueve la necroptosis.

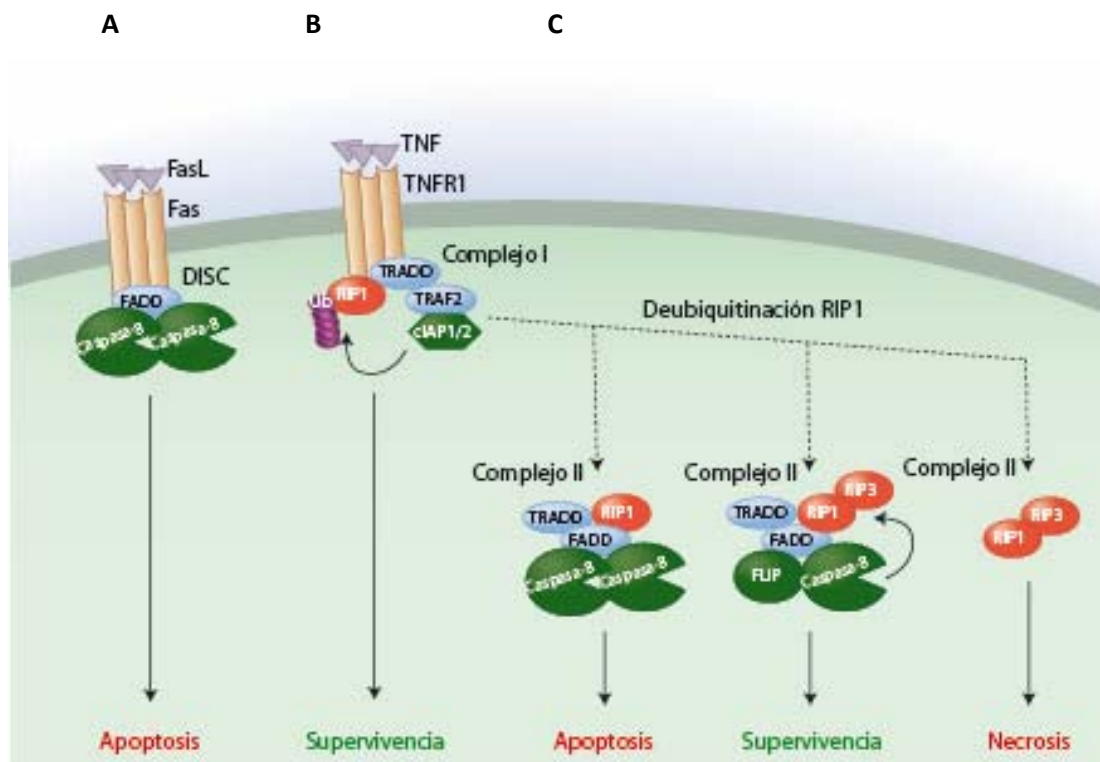


Figura 8 | Ruta apoptótica de receptores de muerte. Adaptado de “Cell death signalling” (Green & Llambi 2015).

1.4. Necrosis programada: necroptosis

El término necrosis hace referencia a una muerte accidental producida por una agresión externa, en la que se pierde la integridad celular y se produce una salida de los componentes citoplasmáticos al medio extracelular. Esta muerte puede ocurrir como consecuencia de un daño que interrumpe la integridad celular como alta temperatura, congelación o un estrés mecánico. Se trata de una muerte pasiva que no necesita ninguna señalización particular. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la muerte necrótica no siempre es un proceso accidental y pasivo sino que también puede resultar de una cascada de señalización finamente regulada (Golstein & Kroemer 2007)(Berghe et al. 2014)(Feoktistova & Leverkus 2015).

La necrosis regulada se define como un tipo de muerte celular genéticamente controlada y morfológicamente caracterizada por una granulación citoplasmática acompañada de un incremento en el volumen celular y de los orgánulos.

El modelo de necroptosis inducido por $TNF\alpha$ es la muerte por necrosis mejor estudiada. La unión de $TNF\alpha$ al receptor $TNFR1$ promueve su trimerización y la formación de un complejo intracelular formado por TRADD, RIP1 y TRAF2, esta última proteína adaptadora recluta a c-IAP1 y c-IAP2 lo que permite la poliubiquitinación de RIP1. Este complejo dará lugar a la activación de $NF-\kappa B$ a través de la unión de la quinasa TAK y de NEMO, la subunidad reguladora de IKK. TAK fosforila y activa a IKK, la cual fosforilará marcando para su degradación a I κ B (inhibidor de $NF-\kappa B$) lo que permitirá la translocación de $NF-\kappa B$ al núcleo donde activará la transcripción de genes anti-apoptóticos como FLIP, IAP-1 y IAP-2 (Ea et al. 2006). Si la activación de $TNFR1$ coincide con la ausencia de c-IAPs, con una inhibición de la traducción o con la deubiquitinación de RIP1 por la deubiquitinasa CYLD, RIP1 formará el complejo II que previene la inducción de necroptosis e induce apoptosis. Sin embargo, si no se produce una activación completa de caspasas o se bloquea su actividad, la proteína RIP3 es reclutada y se forma el necrosoma. Tras una serie de auto y cros-fosforilaciones que permiten la unión y activación de pseudoquinasa MLKL se produce la necroptosis. Esta muerte puede ser inhibida por necrostatina 1 (Nec1) inhibidor específico de la actividad quinasa de RIP1 (Linkermann & Green 2014). En la actualidad sabemos que la necroptosis puede ser también inducida por otros receptores de muerte como FAS y TRAIL-R (Holler et al. 2000), receptores tipo Toll-like (Kim, Ono, & Han 2001) e infecciones virales (Linkermann & Green 2014).

Se han descrito otras formas de señalización de necrosis, pero al contrario que la necrosis dependiente de RIP ninguna está completamente caracterizada. Por ejemplo, las lesiones por isquemia/perfusión causan muerte celular cuando un tejido sufre privación de sangre y luego se

restaura el flujo. Se producen altos niveles de calcio y generación de especies reactivas de oxígeno relacionados con este tipo de necrosis regulada (Halestrap & Pasdois 2009). En neuronas, la acción de los receptores de glutamato puede dar lugar a un tipo de necrosis denominada excitotoxicidad (Wang & Qin 2010).

1.5. Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico a través del cual proteínas, macromoléculas y orgánulos dañados o de larga vida se degradan y reciclan en los lisosomas. Se han descrito tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA). La macroautofagia, en lo sucesivo denominada autofagia, es fundamental para la homeostasis tisular y una respuesta a condiciones estresantes. Los niveles basales de este proceso son importantes para mantener a las células libres de agregados proteicos tóxicos y proteínas mal plegadas y se elevan en respuesta a estrés. La alteración de este tipo de muerte se ve asociada con diversos trastornos humanos, como infecciones, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y musculares.

La autofagia está regulada por las proteínas Atg, de las cuales, hasta la fecha, se han identificado más de 30. Las proteínas ligadas a la autofagia se organizan en complejos funcionales que participan en cada uno de los pasos de la autofagia, que son esenciales para el proceso. Este proceso se inicia cuando una parte del citoplasma, incluidos los orgánulos, está rodeada por una fagóforo o membrana de aislamiento para formar un autofagosoma. Los autofagosomas finalmente se fusionan con los lisosomas y su contenido se degrada por las hidrolasas lisosomales. Los productos de este proceso digestivo (aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos) se liberan al citoplasma mediante permeasas lisosómicas (Boya, Reggiori, & Codogno 2013)(Figura 9) para su utilización en reacciones biosintéticas.

Varias cascadas de señalización modulan la autofagia en respuesta a numerosas señales celulares y ambientales como privación de nutrientes, presencia o ausencia de insulina, factores de crecimiento, hipoxia o estrés en el retículo endoplasmático. La vía de señalización más conocida es la que se desencadena a través de mTOR, en particular en el complejo I (mTORC1), que regula negativamente la autofagia en respuesta a cambios nutricionales y factores de crecimiento (Parzych & Klionsky 2014).

La autofagia es generalmente considerada como un mecanismo de supervivencia, por lo que su clasificación dentro de los tipos de muerte suele deberse a un intento fallido de superar un estrés letal. La muerte celular autofágica se caracteriza por ausencia de la condensación de la cromatina y una masiva vacualización del contenido citoplasmático. Además, suele producirse una considerable movilización de lípidos en forma de vesículas o lipid droplets y una dilatación del retículo endoplásmico y las cisternas del aparato de Golgi (Kroemer & Levine 2008).

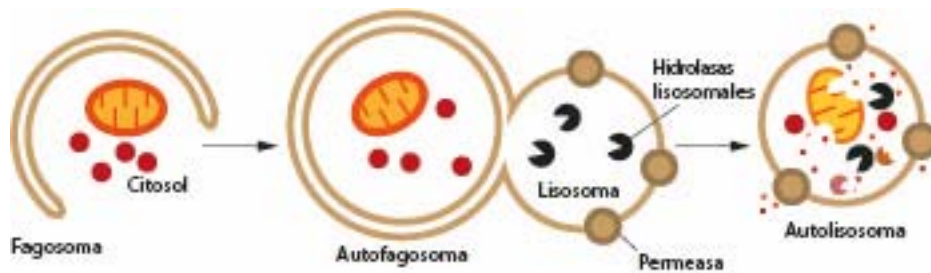


Figura 9 | Mecanismo de autofagia. Adaptado de “An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation” (Parzych & Klionsky 2014).

2. Apo2L/TRAIL

TRAIL fue identificado en 1995 como un nuevo miembro apoptótico de la familia de TNF. Se trata de una proteína transmembrana tipo II, que puede ser procesada proteolíticamente en su dominio extracelular liberando un ligando soluble de 24KDa a la matriz extracelular. Tanto la forma transmembrana como el ligando soluble puede inducir apoptosis en una gran variedad de líneas celulares de cáncer sin afectar a las células normales, y además, tanto en solitario como en combinación con quimioterapia, muestra una significativa actividad antitumoral en modelos murinos xenoinjertados de cáncer (Almasan & Ashkenazi 2003)

Los ligandos de la familia del TNF α pueden matar a células que tiene receptores específicos y están preparadas para la muerte. Las células que son objetivo de estos ligandos de muerte están preparadas para la muerte apoptótica como parte de su programa de diferenciación normal o debido a daño, infección o transformación oncogénica. De hecho, la función biológica más destacada de los receptores de muerte y sus ligandos es su participación en la regulación y actividad del sistema inmune. Aunque el ARN mensajero de TRAIL está presente en la mayoría

de tejidos, la proteína se expresa principalmente en células del sistema inmune como linfocitos, monocitos, células dendríticas y células natural killer (NK) dependiendo del estado de estimulación (Fanger et al. 1999)(Kayagaki et al. 1999).

TRAIL puede unirse a cinco receptores: cuatro transmembrana y uno soluble. Los receptores transmembrana son proteínas de tipo I de la familia de receptores de TNF, y al igual que TRAIL, se expresan constitutivamente en la mayoría de tejidos y tipos celulares (Figura 10).

Dos de los receptores transmembrana, TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5, actúan como receptores agonistas, contienen dominios CRD extracelular a través de los cuales interactúan con la molécula de TRAIL transmitiendo así la señal apoptótica.

Los otros receptores, TRAIL-R3/DcR1 y TRAIL-R4/DcR2, son receptores decoy o trampa ya que TRAIL se puede unir a ellos pero actuarían como receptores antagonistas y no transmitirían la señal debido a que no tienen dominios DD intracelulares o presentan una forma trunca. También hay modelos que sugieren que TRAIL-R4 podría activar la ruta de NF- κ B bloqueando la señalización apoptótica. No obstante, el papel fisiológico de estos dos receptores sigue siendo controvertido y su función podría depender del tipo celular.

OPG por su parte es un miembro soluble de la superfamilia de TNF cuya función está relacionada con la remodelación ósea a través de la inhibición de RANKL (del inglés, *Receptor Activator NF- κ B*)(Lacey et al. 2012), también se ha descrito que puede interactuar con TRAIL (Emery et al. 1998). La aplicación exógena de OPG recombinante es capaz de inhibir la apoptosis inducida por TRAIL (Miyashita et al. 2004). Sin embargo, la baja afinidad entre TRAIL y OPG a temperaturas fisiológicas pone en duda esta interacción (Truneh et al. 2000). Además, ningún estudio in vivo con tratamientos largos con TRAIL a dosis elevadas ha mostrado anomalías óseas que es lo que se esperaría si la interacción OPG-TRAIL tuviese relevancia fisiológica. Por todo ello, el papel de esta interacción es todavía incierto (Lemke et al. 2014).

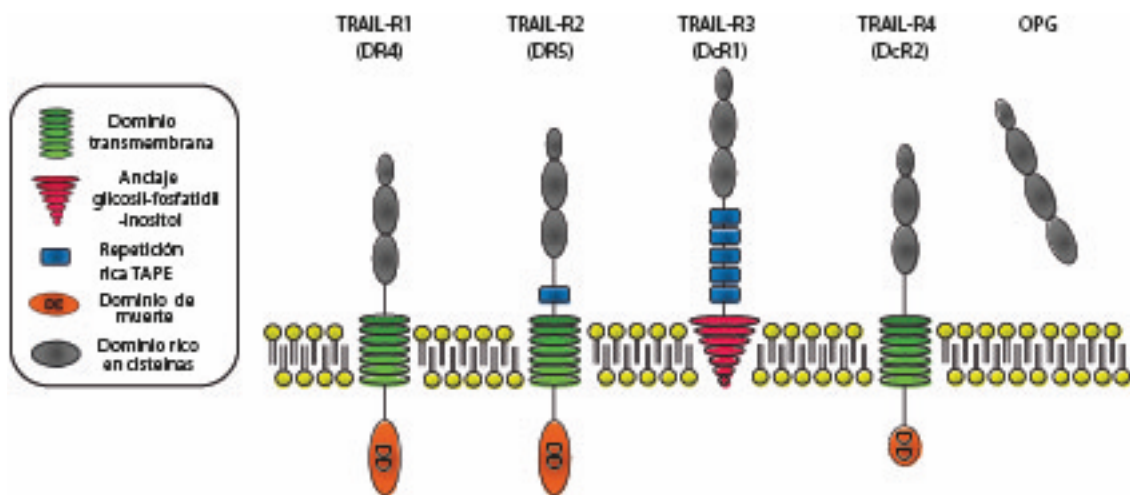


Figura 10 | Receptores de TRAIL. Adaptado de “Getting TRAIL back on track for cáncer therapy” (Lemke et al. 2014).

2.1. Señalización apoptótica de TRAIL

La forma activa de TRAIL es un homotrímero que puede unirse a tres receptores simultáneamente. Estos receptores presentan un átomo de zinc central que interacciona covalentemente con tres residuos de cisteína localizados en la posición 230 de cada monómero de TRAIL y es esencial para su estabilidad, solubilidad y bio-actividad (Bodmer et al. 2000)(Hymowitz et al. 2000)(Trabzuni, Famulski, & Ahmad 2000).

La unión de TRAIL a sus receptores proapoptóticos desencadena directamente la cascada apoptótica mediante la formación del complejo de muerte DISC, que contiene como mínimo a FADD y C8 (Wallach et al. 1997)(Kischkel et al. 2000). Tras la unión del ligando a los receptores de muerte se produce un cambio conformacional en el dominio intracelular de los receptores (Scott et al. 2009) (Wang et al. 2010) que permite el reclutamiento de la proteína FADD por su dominio de muerte. Esta proteína a su vez tiene un dominio DED por el que recluta a caspasa -8, -10 y cFLIP. Los homodímeros de caspasa -8 y -10 se activan por autoprocésamiento y una vez liberados del DISC activan a las caspasas efectoras por proteólisis (Figura 11). Siempre se ha considerado que los principales componentes que forman el DISC se encuentran en proporciones 1:1. Sin embargo, recientemente se ha descrito un nuevo modelo en el que las proporciones de TRAIL-R :FADD :Caspasa-8/cFLIP serían de 3:1:9, de este modo, las moléculas

de caspasa -8 interaccionarían secuencialmente a través de sus DED, originando una cadena de activación de caspasas (Dickens et al. 2012).

TRAIL también puede activar a la ruta mitocondrial de apoptosis mediante el procesamiento de la proteína “BH3-only” Bid, el cual se trasloca en su forma truncada a la membrana externa de la mitocondria donde induce la oligomerización y activación de Bak y Bax.

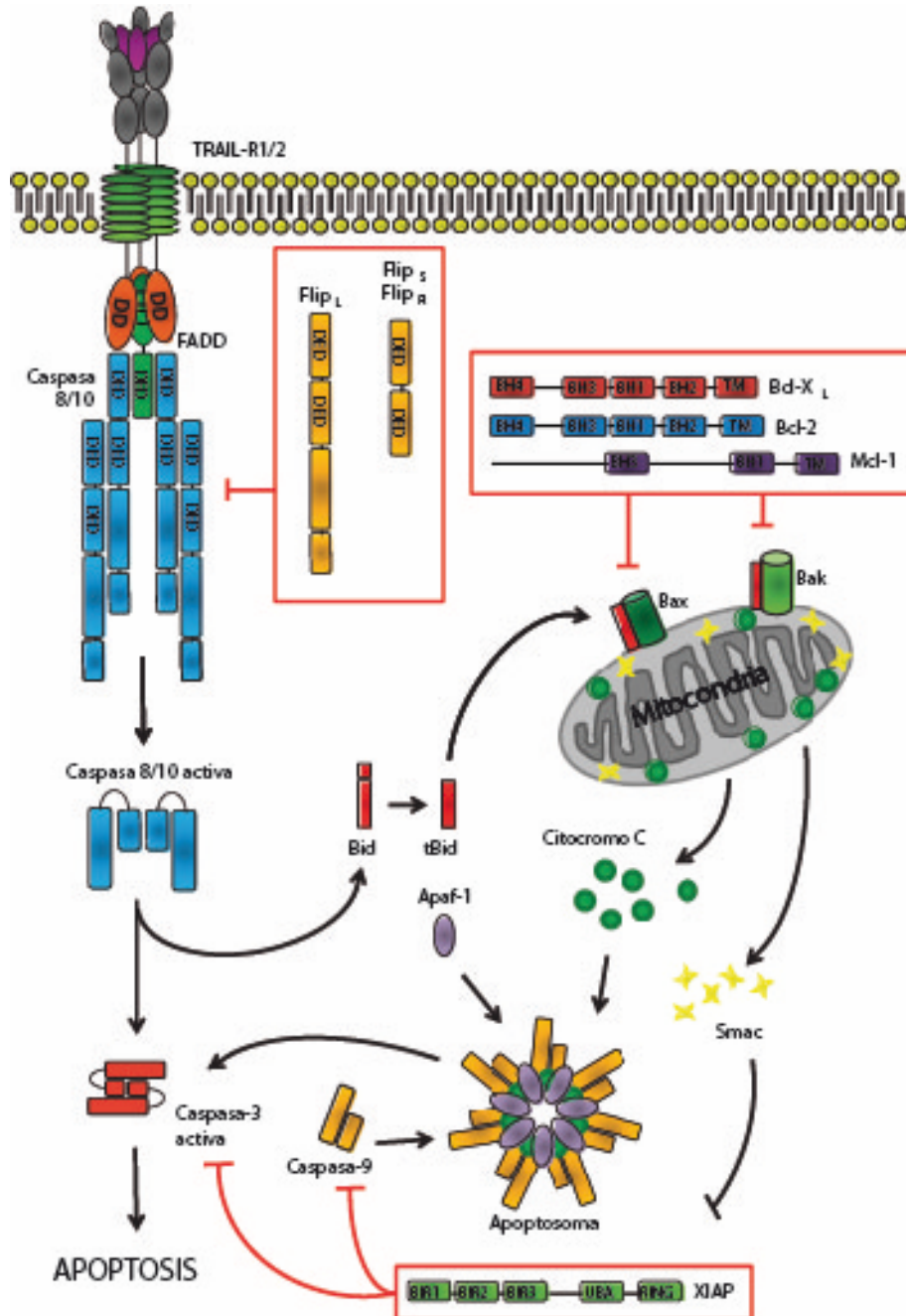


Figura 11 | Señalización de apoptosis inducida por TRAIL. Adaptado de “Getting TRAIL back on track for cáncer therapy” (Lemke et al. 2014).

2.2. Regulación de la apoptosis inducida por TRAIL

La apoptosis inducida por TRAIL se encuentra meticulosamente regulada a niveles tempranos de su señalización, a nivel de membrana, controlando la expresión y localización de los receptores; o a nivel del DISC, controlando la activación de la caspasa -8 mediante la proteína cFLIP.

En cuanto a la expresión y localización de los receptores en la superficie celular, se ha descrito que las modificaciones post-transduccionales como la glicosilación o la palmitoilación son importantes moduladores. La O-glicosilación de DR4 y DR5 incrementa la estabilidad de los receptores en membrana, previniendo la endocitosis y facilitando la traslocación de los receptores agrupados para el ensamblaje del DISC y la activación de la caspasa -8 (Wagner et al. 2007). La S-palmitoilación puede inducir la localización de TRAIL-R1 en los lipid-rafts y su homooligomerización (Rossin et al. 2009). La presencia de los receptores en los lipid-rafts, microdominios localizados en la membrana celular que se caracterizan por presentar una alta concentración de esfingomielina, esfingolípidos y colesterol (Simons and Ikonen 1997) (Brown and London 1998), constituyen un mecanismo esencial para la señalización eficiente de TRAIL. Cuando los receptores se localizan en estas zonas de la membrana se facilita su agregación tras unión del ligando.

La internalización de los receptores también juega un papel importante en su regulación. Esta internalización mediada por clatrina limita la señalización y reduce la activación de caspasas. Sin embargo, la escisión mediada por caspasa 8 del adaptador de clatrina AP2a contrarresta la internalización (Austin et al. 2006) (Kohlhaas et al. 2007). Por otra parte, E-cadherina interactúa con DR4 y DR5, acopla a estos receptores al citoesqueleto de actina a través de la α -catenina lo que aumenta el ensamblaje de DISC (Lu et al. 2014). Cuando las células tumorales pasan por la transición epitelio-mesénquima regulan negativamente la expresión de la E-cadherina, lo que las hace más resistentes a la activación apoptótica por DR4 y DR5.

En cuanto a la regulación de la señalización de apoptosis por TRAIL a nivel del DISC, su principal regulador en este punto es la proteína cFLIP. cFLIP es una proteína multifuncional con un importante papel en procesos celulares como apoptosis, necroptosis, autofagia e inflamación (Safa 2012). Además también participa en la inmunidad innata y adaptativa, y durante el desarrollo embrionario (Wu et al. 2015) (Dillon et al. 2016). Su papel en la ruta extrínseca como se ha comentado anteriormente, depende de que isoforma se une a caspasa-8. FLIP S y FLIP R actúan como simples inhibidores de la procaspasa-8 ya que inhiben la formación de sus

homodímeros. El papel de FLIP L es más complejo, el heterodímero formado entre la procaspasa-8 y FLIP L es enzimáticamente activo y puede activar por proteólisis a los homodímeros de procaspasa-8 cercanos. Si los niveles de FLIP L reclutados en el DISC son altos se producirá una inhibición de la apoptosis ya que proporcionalmente el número de homodímeros de procaspasa-8 es menor. Sin embargo la expresión de niveles bajos de FLIP L permite a la caspasa-8 mantener cierta actividad enzimática con funciones diferentes de la señalización de apoptosis (Yu, Jeffrey, & Shi 2009) (Hughes et al. 2016).

La delección genética de FLIP hace que los embriones de ratón mueran en el día 10.5 (Yeh et al. 2000), un fenotipo que recuerda a los observados tras eliminar caspasa-8 o FADD (Varfolomeev et al. 1998)(Yeh et al. 1998). En el caso de delecionar caspasa-8 la muerte embrionaria ocurre vía necroptosis, en el caso del knockout de FLIP la muerte es producto de la activación de caspasa-8 y de la subsiguiente apoptosis. Sistemas de knockout condicionales en ratón también han permitido la caracterización de la función de FLIP en tejidos adultos. Diversos estudios muestran como la falta de FLIP conduce a una inflamación en la epidermis o en intestino (Wittkopf et al. 2013)(Panayotova-Dimitrova et al. 2013). Estos modelos también han ayudado a entender el papel de FLIP en el desarrollo del sistema inmune. La delección de FLIP conlleva la pérdida de los linfocitos T CD4+ o CD8+, sugiriendo que es necesario su maduración (N. Zhang and He 2005). También se ha descrito que se requiere para la supervivencia de los linfocitos T maduros (He and He 2015).

También se ha descrito la participación de FLIP en otras cascadas de señalización, como en autofagia donde la inhibición de FLIP de la interacción entre Atg3 y LC3 impide la formación del autofagosoma (Lee et al. 2009).

Por su parte, las isoformas de FLIP también están reguladas a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional. Su expresión genética se ve aumentada gracias a factores transcripcionales como NF- κ B (O Micheau et al. 2001), CREB (J Zhang et al. 2008) o EGR1 (Mahalingam et al. 2010). Y se reprime con factores como c-Myc (Ricci et al. 2004), FoxO3a (Skurk et al. 2004) o E2F1 (Salon et al. 2006). FLIP es una proteína de vida media corta, se ha descrito que sus vidas medias son de 30 minutos en el caso de FLIP S y 3 horas en el caso de FLIP L aproximadamente. El recambio que se produce en ambas isoformas está regulado por un ciclo de ubiquitinación y degradación por el proteosoma. En el extremo c-terminal muestran ciertos residuos que pueden ser modificados post-transcripcionalmente. Por ejemplo, la fosforilación en S193 disminuye la ubiquitinación y aumenta la estabilidad de las isoformas FLIP L y FLIP R (Kaunisto et al. 2009), por su parte la S-nitrosilación en Cys 254 y Cys 259 de FLIP L inhibe su ubiquitinación e

incrementa su estabilidad (Chanvorachote et al. 2005). Como se ha explicado anteriormente TRAF2 es una E3-ubiquitin ligasa que puede ubiquitinar a FLIP. Se ha descrito que ITCH, otra E3 ligasa, puede ubiquitinar a FLIP L provocando su degradación y sensibilizando a las células a TNF α y daño al ADN (Chang et al. 2006). Sin embargo, este proceso de ubiquitinación se puede revertir mediante las deubiquitinasas lo que previene la degradación y otros efectos como la re-localización (Komander, Clague, & Urbe 2009). Aunque por el momento no se ha identificado una deubiquitinasa específica de FLIP.

Diversos estudios demuestran que la alta expresión de FLIP confiere resistencia a agentes quimioterapéuticos in vitro e in vivo. Además, la inhibición de la expresión de FLIP con ARN de interferencia aumenta la muerte tras diversos tratamientos como cisplatino en cáncer de pulmón o docetaxel en cáncer de próstata (Humphreys, Espona-Fiedler, & Longley 2018).

La ubiquitinación también actúa como mecanismo regulador de la apoptosis inducida por TRAIL. Se ha demostrado por espectrometría de masas que la subunidad E3 de la ubiquitin ligasa Cullin-3 (CUL3) y la deubiquitinasa (DUB) A20 se encuentran en el DISC (Jin et al. 2009), de tal manera que la ubiquitinación de caspasa -8 por parte de CUL3 permite el reclutamiento de la proteína de unión a ubiquitina p62, que dirige la caspasa-8 del DISC a un foco rico en ubiquitinas. Aquí se promueve el corte autoproteolítico y la liberación de la caspasa -8 activa al citoplasma.

2.3. APO2L/TRAIL como terapia antitumoral

Una de las estrategias más comunes en el tratamiento del cáncer ha sido superar la resistencia a apoptosis que muestran las células tumorales. Por ello se han buscado dianas que permitan la activación de la apoptosis en células tumorales sin afectar a las células normales. Desde el descubrimiento de TRAIL y debido a su potencial de inducir apoptosis específicamente en células tumorales se han dedicado numerosos esfuerzos para intentar usar esta molécula en la clínica.

Se han seguido principalmente dos estrategias terapéuticas contra los receptores de muerte: una forma soluble de TRAIL humano recombinante (rhTRAIL) también conocido como Dulanermin, y anticuerpos agonistas de TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (PARAs, del inglés Pro-Apoptotic Receptor Agonists).

Se han desarrollado diversas formas de TRAIL recombinante con el objetivo de aumentar su estabilidad y especificidad. Para la estabilización del trímero se ha añadido a la región N-terminal una cola de poli-histidinas, una cremallera de isoleucinas o la fusión de TRAIL con la porción Fc

de la inmunoglobulina humana G (H. Wang, Davis, & Wu 2014). Del mismo modo, se han seguido dos estrategias para una mayor especificidad hacia el tumor: acoplamiento de TRAIL a nanopartículas y la unión a anticuerpos o péptidos con diana en el tumor. La única forma de rhTRAIL desarrollado con aplicación clínica hasta la fecha es Dulanermin. Activa tanto a TRAIL-R1 como a TRAIL-R2 lo cual supone un beneficio terapéutico. No obstante, a pesar de los buenos resultados preclínicos, los ensayos clínicos no mostraron actividad antitumoral. Esto se puede deber a dos razones: su corta vida media, cerca de 30 minutos, y su reducida capacidad para producir agrupamiento de los receptores (De Miguel et al. 2016) (Von Karstedt, Montinaro, and Walczak 2017).

En cuanto a los anticuerpos agonistas de los receptores proapoptóticos de TRAIL, los generados hasta el momento tienen mayor vida media y son más estables que Dulanermin. Sin embargo, a pesar de sus alentadores ensayos preclínicos, tampoco se han observado mejores tasas de respuesta y supervivencia en el paciente en los ensayos clínicos realizados hasta ahora. Se han propuesto algunas posibles explicaciones para estos resultados negativos: insuficiente actividad agonista, resistencia de algunos tumores primarios a la monoterapia con uno de estos agonistas (Todaro et al. 2008) y la falta de biomarcadores que identifiquen que agonista sería conveniente utilizar (Ashkenazi 2015).

Entre las nuevas aproximaciones para aumentar la eficacia terapéutica de los agonistas de los receptores de TRAIL, se ha descrito que la combinación de Dulanermin con un agonista de TRAIL-R2 llamado AMG-655 aumenta la muerte de células tumorales ya que se produce un aumento de la multimerización de TRAIL-R2 y en consecuencia de la formación del DISC (Tuthill et al. 2015).

Otro nuevo enfoque para eliminar la resistencia de las células tumorales a TRAIL sería el tratamiento combinado con otros agentes sensibilizadores como inhibidores del proteasoma como Bortezomib (de Wilt et al. 2013), inhibidores de AKT o PI3K o miméticos de BH3 que antagonizan con proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 (Lemke et al. 2014). Igualmente, se ha descrito que la inhibición de CDK9 es un potente sensibilizador de TRAIL ya que disminuye los niveles de FLIP y MCL-1 a la vez que incrementa la actividad de caspasa -8 en el DISC y activa la ruta mitocondrial (Lemke et al. 2014)

3. Metabolismo de la glutamina

La glutamina se ha considerado tradicionalmente como un aminoácido no esencial dado que los mamíferos pueden sintetizarlo en numerosos tejidos. Sin embargo, en periodos de rápido crecimiento o enfermedad la célula aumenta su demanda y la glutamina se convierte en un aminoácido esencial, por lo que se le ha denominado aminoácido esencial condicional. Desempeña un papel crucial en el metabolismo, especialmente como fuente de carbono, nitrógeno y energía (Ji Zhang, Pavlova, and Thompson 2017). Aunque la glutamina se requiere como fuente alternativa de carbono para el ciclo de Krebs, también contribuye a un amplio número de procesos celulares como producción de aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos, además de tener un importante papel en la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno, la activación del complejo mTORC1 y la ruta de la hexosaminas.

3.1. Captación de glutamina del medio extracelular

El metabolismo de la glutamina empieza con su entrada en la célula desde el medio extracelular donde es muy abundante, a través de transportadores específicos. Hay diferentes tipos de transportadores de glutamina en la membrana plasmática entre los que se incluyen los receptores SLC donde se incluyen a los miembros SLC1, SLC6, SLC7, SLC36 y SLC38. Dentro de esta familia se encuentra el transportador principal y mejor caracterizado, ASCT2 (SLC1A5), que se encuentra sobrepresado en diversos tipos de cáncer, como en el cáncer de mama triple negativo. Su inhibición farmacológica reduce la captación de glutamina lo que conlleva la disminución del crecimiento tumoral (Van Geldermalsen et al. 2016) Sin embargo, recientemente se ha observado que su inhibición conduce a la inducción de SNAT1 y SNAT2, dos transportadores que mantienen la captación de glutamina en la célula tumoral (Broer, Rahimi, & Broer 2016).

En ciertos tumores se han observado otras vías de entrada de la glutamina extracelular. Una de ellas es la macropinocitosis de proteínas extracelulares que serán degradadas en lisosomas, tras lo cual se obtiene glutamina y otros aminoácidos. También se ha descrito, en células epiteliales de mama, la digestión de células enteras o apoptóticas para la obtención de aminoácidos (Krajcovic et al. 2013). Por último, la autofagia también puede ser una fuente relevante de obtención de glutamina.

3.2. Síntesis de novo de glutamina

Las células de mamífero tienen toda la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar glutamina de novo. En concreto la enzima glutamina sintetasa (GS) cataliza la condensación entre glutamato y amonio de una manera dependiente de ATP para generar glutamina. GS se expresa en todos los tejidos, pero en particular en hígado, cerebro y músculo (Haberle et al. 2006). Múltiples factores y señales oncogénicas regulan positivamente su expresión. En particular, se ha descrito que el regulador transcripcional YAP aumenta directamente la expresión y actividad de GS (Cox et al. 2016). Por otra parte, la glutamina exógena desestabiliza directamente a GS facilitando su ubiquitinación y degradación (Nguyen et al. 2016). A pesar de expresar esta enzima, la mayoría de células tumorales necesitan glutamina exógena adicional para su supervivencia y crecimiento ya que la síntesis de novo no es suficiente para las demandas de glutamina que necesitan estas células.

3.3. Glutamina como fuente de nitrógeno

La glutamina es un donante indispensable de nitrógeno para la síntesis de nucleótidos y de hexosaminas. En la síntesis de novo de los nucleótidos se requieren dos grupos γ -amino de dos moléculas de glutamina para la formación del anillo de purina y un tercer grupo para la conversión de inosina monofosfato (IMP) a guanosina monofosfato (GMP). El anillo de pirimidina requiere un paso inicial en el que un nitrógeno derivado de la glutamina se condensa con bicarbonato y ATP y genera carbamoyl-fosfato, que reacciona con un aspartato para completar el anillo. Además, se necesita un grupo γ -amino adicional para el paso de uridina trifosfato (UTP) a citidina trifosfato (CTP).

La glutamina se necesita en la síntesis de hexosaminas por parte de la fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT), que transfiere un grupo amido de la glutamina a una fructosa-6-fosfato para formar glucosamina-6-fosfato, un precursor de la N- y de la O-glicosilación. Estas glicosilaciones son cambios postraduccionales que modifican proteínas y lípidos para su participación en señalización, tráfico, secreción y otros procesos celulares.

El grupo γ -amino es directamente proteolizado por la enzima glutaminasa (GLS) produciendo glutamato y amonio, este nitrógeno será incorporado a la ruta de nucleótidos y hexosaminas. El grupo α -amino que permanece en el glutamato será transferido a diferentes α -cetoácidos por

la familia de aminotransferasas (TA) para formar α -cetoglutarato (α -KG) y aminoácidos no esenciales (NEAA) como alanina, aspartato, serina y ornitina (Figura 12). Cabe destacar dentro de las aminotransferasas a la alanina aminotransferasa, llamada GPT1 en el citosol y GPT2 en la mitocondria, que cataliza la reacción reversible de transferencia del grupo amino desde el glutamato al piruvato para producir α -KG y alanina. Por otro lado, la aspartato aminotransferasa, denominada GOT1 en el citosol y GOT2 en la mitocondria, producen aspartato a partir del oxalacetato (Still & Yuneva 2017)(Ji Zhang, Pavlova, & Thompson 2017).

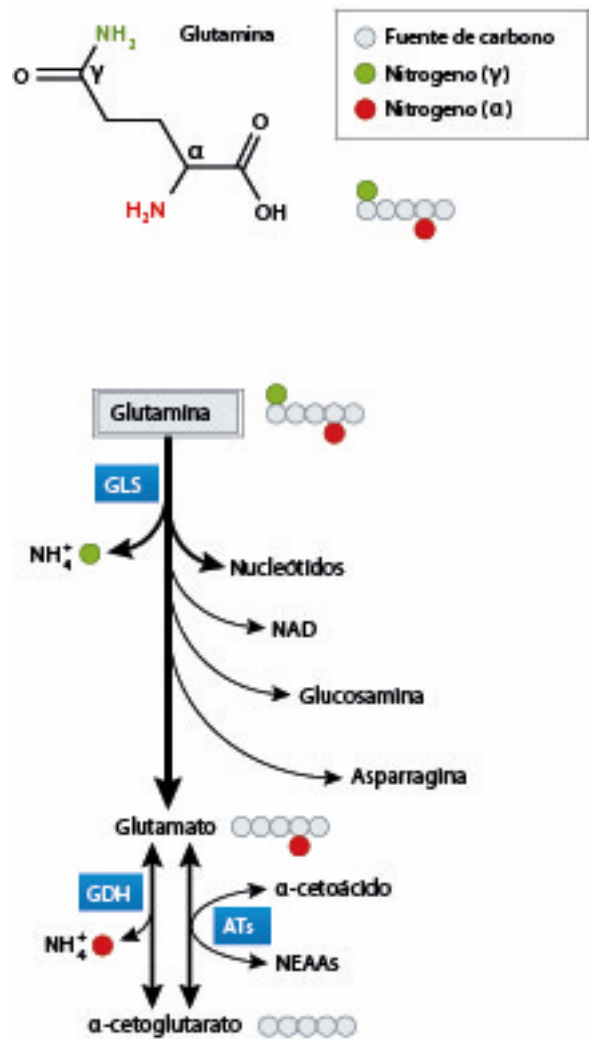


Figura 12 | La glutamina como fuente de nitrógeno. Adaptado de “Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine” (Ji Zhang, Pavlova, and Thompson 2017).

3.4. Glutamina como fuente de carbono

La glutamina también es una importante fuente de carbono necesaria para la bioenergética y la biosíntesis de moléculas. Una alta proliferación es asociada con un alto flujo de carbono de la glutamina hacia el ciclo TCA. En el TCA no solo se están obteniendo NADH y FADH₂ también se están formando precursores para la síntesis de moléculas. Así, por ejemplo, la mayoría del citrato formado en TCA se exporta al citosol donde se convierte en acetyl-CoA, un precursor de la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Metallo et al. 2012)(Mullen et al. 2012). De igual manera, el oxalacetato (OAA) se usa para la síntesis de aspartato y asparragina. La vía por la que entra el carbono derivado de la glutamina en el TCA es en forma de α -KG. Para ello previamente se ha formado a partir del glutamato, por la acción tanto de las transaminasas como de la glutamato deshidrogenasa (GDH), que solo se encuentra en la ruta metabólica mitocondrial de la glutamina (Figura 13)(Ji Zhang, Pavlova, & Thompson 2017)(Still & Yuneva 2017).

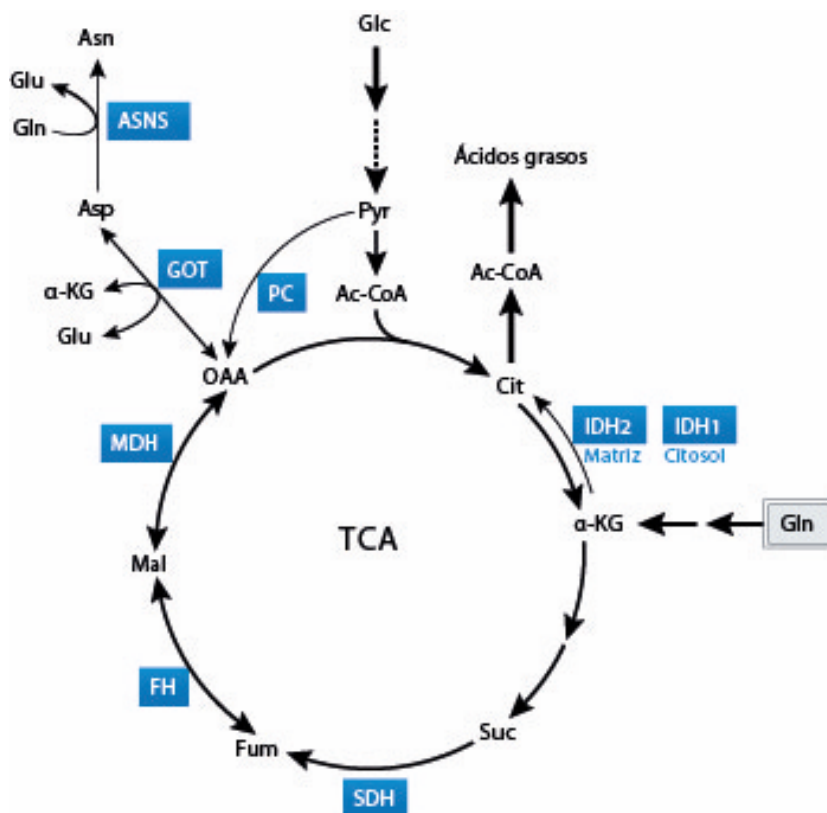


Figura 13 | La glutamina como fuente de carbono. Adaptado de “Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine” (Ji Zhang, Pavlova, & Thompson 2017).

3.5. Efecto de la glutamina en la homeostasis redox

La glutamina también está implicada en el mantenimiento del balance redox. Por una parte, el glutamato que se ha formado a partir de glutamina es utilizado para la síntesis de novo de glutatión (GSH), un potente antioxidante formado por el tripeptido glutamato-cisteína-glicina. La glutamato-cisteína-ligasa (GCL) condensa el glutamato con cisteína en una reacción dependiente de ATP generando γ -glutamilcisteína, la cual es condensada con glicina a través de la glutatión sintetasa para formar el glutatión (Lu 2009). Se ha descrito que la privación de glutamina reduce las reservas de glutatión presentes en la célula (Yuneva et al. 2007). Una segunda vía por la que la glutamina contribuye a la formación del glutatión es gracias al transportador xCT de la membrana plasmática por el cual entra una molécula de cistina gracias a la salida de una molécula de glutamato. Dentro de la célula las dos moléculas de cisteína que forman la cistina podrán incluirse en la formación del glutatión. Por último, también permite la producción de NADPH que pueden revertir el estado oxidado del glutatión (GSSG).

3.6. La glutamina como modulador de vías de señalización y de la expresión génica

Los aminoácidos se requieren para la activación de mTOR en el complejo mTORC1 (del inglés, mammalian target of rapamycin) que regula la traducción de proteínas, el crecimiento celular y la autofagia. mTOR es una serina/treonina quinasa y en situaciones donde el ambiente es rico en aminoácidos mTOR está activo y se activa la síntesis de proteínas y se produce la inhibición de la autofagia. Cuando en el medio extracelular hay falta de aminoácidos se activa la autofagia, la cual recicla los componentes celulares y proporciona aminoácidos de manera alternativa a la célula. Además, se ha descrito que la salida de glutamina intracelular y la entrada de leucina extracelular a través del transportador bidireccional SLC7A5 permite la activación de mTOR. La inhibición de este transportador impide el crecimiento celular y activa la autofagia (Nicklin et al. 2009).

Por otra parte, la presencia de glutamina y leucina en la célula permite la formación de α -KG mediante la glutaminólisis, activándose la GTPasa Rag que se transloca al lisosoma y activa a mTOR en el complejo mTORC1 (Durán et al. 2012).

Recientes estudios demuestran que la glutamina extracelular tiene también una función en señalización celular mediante la activación del factor de transcripción STAT3 lo que promueve la proliferación tumoral (Cacace et al. 2017) (Cacace A et al. 2016). Además, otros estudios conectan el metabolismo de la glutamina con la vía de señalización NOTCH en leucemia linfática aguda (ALL). De esta forma, la inhibición de la glutaminólisis y de la autofagia aumenta el efecto de las terapias anti-NOTCH en esta leucemia (Herranz et al. 2015).

La glutamina también puede afectar a la epigenética de la célula, dado que el α -KG actúa como cofactor de demetilasas de histonas que contienen un dominio Jumonji. La falta de glutamina y, por tanto, la bajada de los niveles de α -KG, conlleva la inhibición de las demetilasas. Esto se traduce en una hipermetilación de histonas que suprime la expresión de genes implicados en diferenciación (Kinnaird et al. 2016).

3.7. Efecto de oncogenes y genes supresores de tumores sobre el metabolismo de la glutamina

Diversos estudios demuestran que el metabolismo de la glutamina está regulado por oncogenes y genes supresores. cMyc es un proto-oncogen que regula proliferación y estimula la expresión de genes relacionados con el metabolismo. Se ha relacionado claramente con el consumo de glutamina por la célula y su metabolismo, pudiendo unirse directamente a promotores génicos y estimular la expresión de genes como el transportador de glutamina SLC1A5. cMyc también puede promover de manera indirecta la expresión de la glutaminasa reprimiendo la expresión de miR-23a/b (Gao 2009). Todas estas funciones de Myc hacen que, en ciertas líneas tumorales, la sobreexpresión de Myc induzca un fenómeno de dependencia de glutamina extracelular y que la ausencia de este aminoácido pueda provocar la muerte celular por apoptosis (Yuneva et al. 2007).

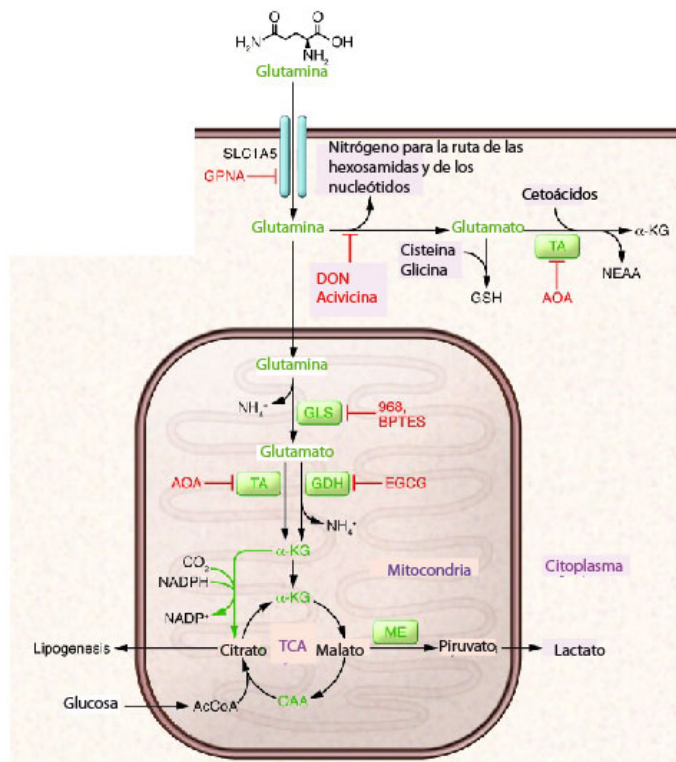
Kras es una de las mutaciones oncogénicas más frecuentes en numerosos tumores, provocando en la célula una reprogramación del metabolismo que incluye un aumento del flujo glicolítico, adicción a la glutamina, autofagia y macropinocitosis (Bryant et al. 2014). Por ello, tumores que expresan Kras necesitan a la glutamina para su crecimiento ya que permite el incremento de los niveles de carbono y nitrógeno requeridos para la síntesis de macromoléculas (Gaglio et al. 2009).

p53 es un importante regulador transcripcional y supresor de tumores que está también implicado en la regulación del metabolismo de la glutamina. p53 induce la expresión de GLS2, lo que conlleva el incremento de los niveles de GSH y la reducción de los ROS, inhibiendo así la tumorigénesis. Al parecer, GLS1 y GLS2 tienen funciones opuestas en tumorigénesis aunque los dos tienen el mismo papel en el metabolismo de la glutamina en la conversión de glutamina a glutamato. Myc induce la expresión de GLS1 mientras que p53 lo hace de GLS2. Un posible mecanismo que explica esta diferencia de papeles puede ser la acción no enzimática de GLS2. Diversos estudios han demostrado que GLS2 suprime la metástasis en células de hepatocarcinoma a través de la inhibición de la expresión del factor de transcripción Snail o de actividad GTPasa de Rac (Kuo et al. 2017)(Zhang et al. 2016). Además, GLS1 y GLS2 tienen diferentes estructuras y están sujetos a diferentes mecanismos de regulación (Curthoys 1995). Para conocer en detalle estas diferentes funciones de GLS1 y GLS2 es necesario un estudio más profundo del mecanismo que diferencia a estas dos isoformas en tumorigénesis.

3.8. Potencial terapéutico de inhibidores del metabolismo de la glutamina

Dada la importancia del metabolismo de la glutamina en la homeostasis celular y su disregulación en procesos cancerígenos, se ha convertido en los últimos años en una diana interesante para nuevas terapias oncogénicas. Miméticos de la glutamina como la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) o la acivicina se han evaluado en ensayos clínicos pero, a pesar de sus prometedores efectos *in vitro*, todos estos compuestos han mostrado toxicidad en el tracto gastrointestinal, en células inmunes y en el sistema nervioso central debido a su inhibición no selectiva del metabolismo (Ahluwalia et al. 1990). En la búsqueda de inhibidores más selectivos los estudios se centraron en la GLS, cuya actividad suele estar disregulada en diversos tumores. A este respecto se han desarrollado inhibidores como el BPTES, el compuesto 968 o el compuesto CB-389, siendo este último el único que ha pasado a una fase clínica (Gross et al. 2014)(Le et al. 2012)(Stalneck et al. 2015). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente GLS2 puede tener un papel supresor de tumores (Hu et al. 2010). Igualmente, el inhibidor no selectivo de las aminotransferasas, el aminoxiacetato (AOA), muestra citotoxicidad en estudios preclínicos en tumores mamarios de ratón y xenoinjertos (Korangath et al. 2015) (Figura 14).

Otro enfoque para la utilización del metabolismo de la glutamina como diana terapéutica ha sido la reducción de los niveles de glutamina en sangre. La L-asparraginasa (L-ASNasa) que se ha usado rutinariamente en leucemia linfática aguda (ALL), cataliza la deaminación de la asparragina y de la glutamina lo que provoca la disminución de estos aminoácidos en sangre. Durante años la utilización de esta enzima se ha centrado preferentemente en su capacidad para eliminar la asparragina en el medio y su tratamiento contra diversos tumores que necesitan este aminoácido (Kidd 1953)(Broome 1963)(Krishnapura, Belur, & Subramanya 2016). Recientemente se está demostrando que algunos de los efectos antitumorales de la L-ASNasa de deben a su actividad glutaminasa. Es por ello que se evaluó esta actividad como terapia anticancerígena. A pesar de unos resultados preclínicos prometedores, en algunos pacientes se ha observado cierta toxicidad en el sistema nervioso central y una respuesta antitumoral deficiente(Lanvers-Kaminsky 2017). A pesar de que la actividad glucosidasa no parece una opción en el tratamiento de pacientes, parece claro que la actividad glutaminasa es esencial para el efecto antileucémico de la L-ASNasa, ya que las células pueden sintetizar asparragina a partir de ácido aspártico y de glutamina. La reducción de glutamina previene la resistencia a L-ASNasa (Lorenzi et al. 2013). También se ha descrito que la privación de glutamina mediante el tratamiento con L-ASNasa en células de leucemia mieloide aguda (AML) provoca muerte por apoptosis tras la inhibición de mTOR y de la síntesis de proteínas (Willems et al. 2013).



CLASE	DROGAS	ESTATUS
Mimético de la glutamina	DON Acivicina	Efectos inespecíficos Toxicidad
Depleción de glutamina	L-Asparaginasa	Aprobado por la FDA para el tratamiento de ALL Efectos inespecíficos Toxicidad
Inhibidores de la glutaminasa	968 BPTES	Ensayos preclínicos
Inhibidores de las aminotransferasas	AOA	Usado clínicamente para tratar tinnitus Tóxico a altas dosis
Inhibidores de la glutamato deshidrogenasa	EGCG	Ensayos preclínicos

Figura 14 | Inhibidores del metabolismo de la glutamina y su aplicación en tratamientos clínicos. Adaptado de “Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities”(Hensley, Wasti, & Deberardinis 2013) y “From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy”(Altman, Stine, & Dang 2016)

4. Ruta de estrés GCN2-ATF4-CHOP

Tras diversos estímulos de estrés, la señalización celular converge en la fosforilación de la subunidad α del factor 2 de iniciación de la traducción de ARN mensajeros en eucariotas (eIF2 α). Esta fosforilación se produce en el residuo de serina 51 y produce la inhibición general de la síntesis de proteínas y a su vez permite la traducción de ARN mensajeros que tienen un papel importante en la respuesta a estrés. Por este motivo, la fosforilación y posterior señalización se ha denominado respuesta integral de estrés o IRS (del inglés, integrated stress response)(Harding et al. 2003). El resultado de esta señalización puede ser una respuesta adaptativa o la inducción de la muerte celular por apoptosis, aunque el mecanismo que conduce a estas respuestas finales está aún por elucidar. En este sentido se ha sugerido que la duración y niveles de fosforilación de eIF2 α pueden determinar la supervivencia o muerte de la célula (Donnelly et al. 2013).

4.1. Quinasas de eIF2 α

La fosforilación de eIF2 α está a cargo de cuatro quinasas: PERK (del inglés, PKR-like ER Kinase), PKR (del inglés, protein kinase double-stranded RNA-dependent), GCN2 (del inglés, general control non-derepressible-2), y HRI (del inglés, heme-regulated inhibitor). Aunque en todas ellas existen similitudes en los dominios quinasa responsables de la fosforilación de eIF2 α , poseen características únicas que permiten su regulación diferencial bajo diferentes estímulos (Figura 15). Cada quinasa se activa bajo diferentes tipos de estrés y juegan un papel importante en la respuesta a infecciones, bajos niveles de nutrientes y de grupos hemo y proteotoxicidad. Por tanto, tienen un papel relevante en procesos como las infecciones virales, el cáncer o el desarrollo embrionario.

PERK es un componente indispensable de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés unfolded protein response). La UPR es una respuesta adaptativa que coordina la expresión de chaperonas, enzimas y diferentes componentes del retículo endoplasmático para restaurar la función del RE. Aunque la función de la UPR es ayudar a la célula a superar el estrés, bajo condiciones de un estrés severo puede desembocar en apoptosis (Schröder and Kaufman 2005). La UPR se puede iniciar por tres proteínas presentes en la membrana del retículo: IRE1 (del inglés, inositol-requiring kinase 1), ATF6 (del inglés, activating transcription factor 6) y PERK. La región N-terminal de PERK se encuentra en el lumen del RE unida a la chaperona BiP, actúa como sensor del estado de plegamiento de proteínas en el RE y contiene los dominios de dimerización y regulación. La región C-terminal es citoplasmática y es donde se encuentran el dominio quinasa y los sitios de autofosforilación. La acumulación de proteínas mal plegadas en el RE provoca la disociación de BiP de PERK lo que lleva a su dimerización y autofosforilación, y por último a su activación (Koromilas 2015)(Harding, Zhang, & Ron 1999).

GCN2 es un sensor de la falta de aminoácidos y un regulador de los cambios en la expresión génica en respuesta a privación de aminoácidos. También se ha descrito su activación por privación de glucosa, infección viral o radiación UV. La estructura de GCN2 es más compleja que la del resto de quinasas. Muestra un dominio quinasa, un dominio pseudoquinasa y un dominio HisRS (del inglés, histidyl-tRNA synthetase-related domain) el cual tiene mayor afinidad por los ARNt no cargados que los cargados con el aminoácido correspondiente. Cuando los ARNt no cargados se acumulan por privación de aminoácidos esenciales, se unen al dominio HisRS de

GCN2 lo que provoca la dimerización de GCN2 y su autofosforilación, y por tanto su activación (Kilberg et al. 2005)(Deval et al. 2009).

PKR fue inicialmente descrita como una quinasa que fosforilaba a eIF2 α en respuesta a una infección viral, que bloqueaba la traducción de ARN mensajeros virales y promovía la apoptosis en respuesta a la infección viral. Sin embargo, parece que también juega un papel en respuesta a estrés en el retículo y estrés oxidativo(Galluzzi et al. 2008)(Cole 2007).

HRI participa en dos procesos fisiológicos. Por un lado regula la síntesis de globinas según la cantidad de grupo hemo, y por otro lado promueve la supervivencia en los precursores de eritrocitos cuando los niveles de hierro son bajos(Chen 2007) . También está implicado en respuesta a estrés como la inhibición del proteosoma (Yerlikaya, Kimball, & Stanley 2008) o la exposición a arsénico (Lu, Han, & Chen 2001).

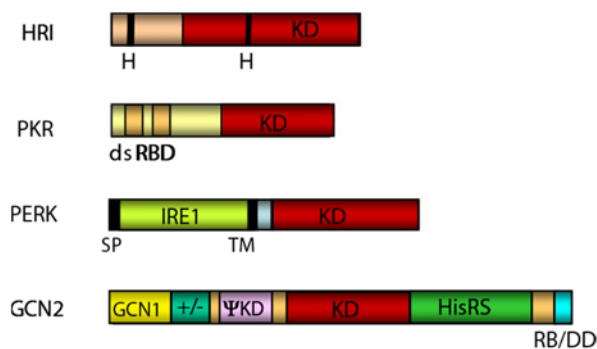


Figura 15 | Estructura de las quinasas de eIF2 α . Adaptado de “Roles of the translation initiation factor eIF2 α serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment” (Koromilas 2015).

4.2. Señalización de eIF2 α

El factor de iniciación de la traducción eIF2 está formado por tres subunidades: α , β y γ . El inicio de la traducción requiere la unión a eIF2 de una molécula de GTP y el ARNt-Met de iniciación para formar un complejo que se unirá a la subunidad del ribosoma 40S y los factores de iniciación de la traducción eIF1, eIF1A y eIF3. Todos ellos forman el complejo de preiniciación 43S(Lorsch & Dever 2010). Tras esto el GTP unido a eIF2 es hidrolizado a GDP lo que provoca que pierda afinidad por el ARNt-Met. Con el fin de volver a su estado activo, el GDP se intercambia por GTP

gracias a la actividad GEF (del inglés, guanine exchange activity) de eIF2B. El aumento en la fosforilación en la serina 51 de la subunidad α constituye un mecanismo de control de la traducción en células expuestas a un estrés. Cuando eIF2-GDP es fosforilado en su subunidad α por una de las quinasas que hemos mencionado antes, se convierte en un inhibidor de eIF2B, por lo que los niveles de eIF2-GTP caen y se inhibe la traducción (Proud 2001)(Figura 16). A pesar de la inhibición general de la traducción, la fosforilación de eIF2 α provoca la traducción de ARNm de factores de transcripción responsables de la respuesta adaptativa al estrés como es el caso de ATF4. El mecanismo que permite la traducción de estos factores se basa en la presencia de marcos cortos de lectura aguas arriba (uORFs) en la región 5'UTR que impiden su traducción en condiciones normales. En presencia de niveles elevados de eIF2 α -GTP se traducen todos los uORFs y se inhibe la traducción del ORF de ATF4. En respuesta a estrés, se produce la fosforilación de eIF2 α que ralentiza la traducción de los uORFs por lo que solo llega a traducirse el fragmento correspondiente a ATF4. ATF4 por su parte puede favorecer la expresión de factores de transcripción relevantes en la respuesta adaptativa como CHOP o TRB3. (Ye & Koumenis 2009).

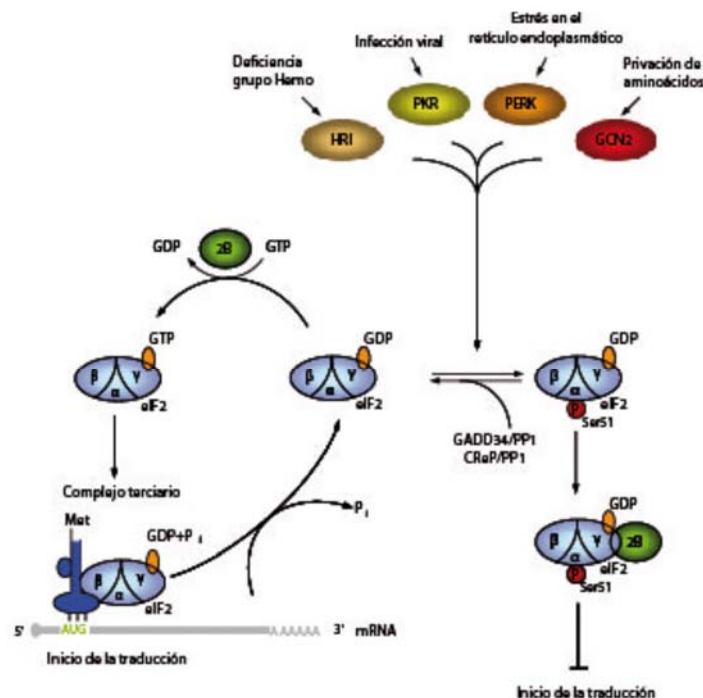


Figura 16 | Regulación del inicio de la traducción por eIF2 α . Adaptado de “Roles of the translation initiation factor eIF2 α serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment” (Koromilas 2015)

5. Cáncer de mama

5.1. Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en mujeres (Ferlay et al. 2018). Se trata de una enfermedad muy compleja con diferentes características biológicas e implicaciones clínicas. Uno de los mayores retos clínicos es encontrar un tratamiento efectivo dada su gran heterogeneidad. Marcadores clásicos de inmunohistoquímica como la presencia o ausencia del receptor de estrógeno (ER) y del receptor de progesterona (PR) y la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epitelial humano 2 (Her2/Neu), junto con las tradicionales variables clinicopatológicas como el tamaño y el grado tumoral o la implicación ganglionar, se han usado convencionalmente para clasificar el tumor y han determinado el tratamiento y pronóstico del paciente. Sin embargo, los análisis genéticos actuales han abierto una nueva vía para la clasificación del tumor y su posterior tratamiento, ya que demuestra que la respuesta del tumor no se basa en características anatómicas (Dai et al. 2015). Integrar la nueva información a diferentes niveles ha llevado a un aumento de los subtipos, ampliando la heterogeneidad de este tipo de cáncer. Diversos estudios de expresión genética permitieron clasificar el cáncer de mama en 5 subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, tumores que sobreexpresan Her2, basal y normal (Sorlie et al. 2001)(Z. Hu et al. 2006). Aunque esta es la clasificación estándar otros grupos han desarrollado otras clasificaciones (Fan et al. 2006)(Sotiriou et al. 2003). A pesar de todo, los tumores de mama que se suelen diagnosticar se pueden agrupar en tres grandes grupos: luminales, tumores que sobreexpresan Her2 y tumores triple negativos, estos últimos son los más heterogéneos y la mayoría se englobaría en el subtipo basal.

Los tumores de tipo luminal expresan receptores hormonales con perfiles de expresión que recuerdan al epitelio luminal de la mama (Perou et al. 2000). Existen al menos dos subtipos: luminal A y luminal B donde A expresa ER+ PR+ HER2- y B expresa ER+ PR+ HER2+, aunque no siempre es así (Vallejos et al. 2010). El subtipo A muestra mayor expresión de los genes relacionados con ER y menos expresión de genes relacionados con proliferación que el subtipo B, estos últimos tienen mayor grado en la progresión tumoral. Los tumores luminales son los más comunes, siendo en la mayoría de los casos de subtipo A. Generalmente estos tumores tienen un buen pronóstico siendo significativamente peor en el caso del subtipo B, también la recurrencia es peor en este subtipo (Sorlie et al. 2001). Por último, responden bien a la terapia hormonal no así a la quimioterapia convencional (Brenton et al. 2005).

Los tumores que sobreexpresan Her2 se definen como ER- PR- HER2+ y se caracterizan por estar habitualmente en un estadio alto por lo que suelen tener mal pronóstico (Vallejos et al. 2010). El mal pronóstico parece derivar de una alta probabilidad de recidiva en los tumores en los que no se ha erradicado por completo las células tumorales. Actualmente hay agentes dirigidos específicamente hacia Her2 como el anticuerpo monoclonal Trastuzumab (Brenton et al. 2005). Los tumores de tipo basal comprenden mayoritariamente a los tumores triple negativo, en torno a 60% a un 90% de los casos. Muestran perfiles de expresión de células mioepiteliales de mama o del epitelio basal de otras partes del cuerpo (Perou et al. 2000). No expresan o expresan bajos niveles de Her2, en cambio los niveles de marcadores basales como EGFR y de genes relacionados con proliferación si están altos (Sorlie et al. 2001). Estos tumores son muy agresivos y actualmente carecen de terapia específica, siendo la quimioterapia la única opción (Brenton et al. 2005).

5.2. Cáncer de mama triple negativo

Los tumores triple negativos (TNBC) se definen por la no expresión de los receptores para ER y PR, así como por la ausencia de sobreexpresión o amplificación genética de HER2, y constituyen el 15-20% de los tumores diagnosticados. Se caracterizan por un alto grado de recurrencia y metástasis en cerebro y pulmones, y una pobre prognosis, por tanto son el tipo de cáncer de mama con peor pronóstico (Neophytou, Boutsikos, and Papageorgis 2018)(Bianchini et al. 2016). Histológicamente, la mayoría de TNBCs (95%) están clasificados como carcinomas mamarios invasivos no específicos y no tienen diferencias histológicas distintivas. En cuanto a la clasificación molecular, se tratan mayoritariamente de tumores basales heterogéneos, es decir, que muestran algunas características de los tumores basales, es por ello que son llamados BLBC (del inglés, basal-like breast cáncer). Recientemente, Lehmann et al analizaron los perfiles de expresión genética de diversas bases de datos y establecieron seis subtipos diferentes de TNBC: BL1 y BL2 (del inglés, basal-like 1 y 2), M (del inglés, mesenchymal), MSL (del inglés, mesenchymal stem-like), IM (del inglés, immunomodulatory subgroup) y LAR (del inglés, luminal androgen receptor)(Lehmann et al. 2011).

Las células tumorales sufren una transformación metabólica que les permite adaptarse a sus nuevos requerimientos energéticos y proliferativos. La glutamina pasa a ser un importante metabolito en la proliferación de la célula cancerígena, ciertos tipos de células cancerígenas se vuelven adictas a la glutamina y su crecimiento disminuye drásticamente en su ausencia (Wise & Thompson 2010). Pero este aminoácido no solo permite la producción de ATP también es

esencial en la biosíntesis de nucleótidos, lípidos y proteínas, así como un regulador del balance redox. El cáncer de mama como se ha dicho anteriormente es heterogéneo y también lo es en cuanto a su reprogramación metabólica incluyendo el metabolismo de la glutamina. En las células TNBC se ha observado un incremento en la expresión de las enzimas del metabolismo de la glutamina, en este sentido se ha descrito el aumento de expresión de la glutaminasa y de la glutamina sintetasa. Esto concuerda con los altos niveles de glutamato y bajos niveles de glutamina observados en estas células, sugiriendo un aumento del consumo de glutamina y glutaminólisis en estos tumores (Cao et al. 2014). Esta reprogramación metabólica está controlada por la mutación de oncogenes o de supresores de tumores, y más directamente por mutaciones en los genes que controlan el metabolismo de la célula (Haider et al. 2016). Entre las mutaciones más frecuentes en TNBC, se encuentra la mutación de p53 en un 60-70%, la pérdida de función de este gen permite que se produzca un aumento de la glicólisis aeróbica (Bensaad et al. 2006). La mutación de PI3K se produce en torno a un 10% de los casos, y no solo provoca un aumento de la glicólisis a través de la ruta PI3K/Akt/mTOR sino también a través de la movilización de la aldolasa A desde el citoesqueleto (Hu et al. 2016). El oncogen MYC está amplificado en el 15% de los tumores de mama. MYC desvía el metabolismo de la glucosa hacia una glicólisis aeróbica y producción de lactato. Además, también tiene un papel directo en la expresión de los componentes del metabolismo de la glutamina, por ejemplo, induce la expresión de los transportadores de la glutamina a través de la unión a sus promotores. Tras privación de glutamina, se activa ATF4 que en coordinación con MYC activa la expresión de transportadores para mantener los niveles de glutamina intracelular (Van Geldermalsen et al. 2016). Por otro lado, promueve la expresión de la glutaminasa mediante la represión de los miARNs miR 23 a/b que inhiben la expresión de esa enzima (Wise et al. 2008)(Gao 2009). El resto de mutaciones ocurren en baja frecuencia (1-5%) como las mutaciones en los genes BRCA1/2 (Shah et al. 2012) (Lehmann et al. 2011). BRCA1 y BRCA2 son supresores de tumores esenciales para la división celular, el control de errores en la replicación del ADN, reparación de ADN y apoptosis. Si estos genes están mutados y se producen errores en el ADN, este no podrá ser reparado por completo lo que aumenta el riesgo de desarrollar un tumor. La mutación de BRCA1/2 aumenta las posibilidades de tener cáncer de mama en un 50-85% (Venkitaraman 2009).

Actualmente hay numerosos ensayos clínicos en los que se prueban diversos tratamientos contra los TNBC. La quimioterapia sigue siendo el tratamiento principal para este tipo de tumores. A pesar de la falta de biomarcadores y de un mal pronóstico general, los pacientes con TNBC tienen una mayor respuesta a la quimioterapia que los pacientes con otros tipos de cáncer

de mama, esto se denomina paradoja de TNBC ya que aun así tienen un alto grado de recurrencia (Bianchini et al. 2016). Ya que en el 90% de los casos los tumores TNBC persisten después de la quimioterapia actualmente se están testando en ensayos clínicos inhibidores de otras rutas alteradas en estos tipos de cáncer, como por ejemplo inhibidores de PARP (Audeh et al. 2010), inhibidores de PI3K (Ibrahim et al. 2012) o inhibidores de MEK (Hoeflich et al. 2009). La privación de glutamina puede reducir la proliferación y progresión tumoral especialmente en los tipos celulares más agresivos, por tanto, se ha convertido en una nueva estrategia para el tratamiento de estos tumores. A este respecto, hay ensayos clínicos en fase II con el CB-839, un inhibidor de la glutaminasa (Gross et al. 2014). El inhibidor de MYC CX-3543 también está siendo testado en ensayos clínicos de fase II (Chen et al. 2014).

5.3. Metabolismo de las células madre de cáncer de mama

Actualmente hay dos teorías para explicar la diversidad celular dentro de un tumor. Por un lado, el modelo tradicional afirma que la iniciación y desarrollo del cáncer se produce por una acumulación secuencial de mutaciones, las cuales promueven la pérdida de especificidad en los tejidos, desdiferenciación y regresión a un fenotipo más primitivo. Según esta teoría cada célula cancerígena puede potencialmente formar un tumor. El segundo modelo, postula que un reducido grupo con características similares a las células madre son las responsables del desarrollo del tumor. Estas células se denominan células madre del cáncer (CSC, del inglés cancer stem cells). El tumor se organiza jerárquicamente y sostenido por diferentes subpoblaciones de células cancerígenas. Las células iniciadoras del tumor estarían en lo alto de la pirámide y darían lugar al resto de células del tumor con alta tasa de proliferación (Tannishtha et al. 2001) (Figura 17).

Las células madre son células no diferenciadas y que se pueden autorenovar un número indefinido de veces. Estas células sufren divisiones asimétricas en las que se producen una nueva célula madre y una célula que se diferenciara en un determinado tipo celular. Las células madre del cáncer comparten características con estas células como permanecer indiferenciadas, expresar en su superficie marcadores como CD44, CD133 o la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), la activación de rutas de señalización celular como Wnt, Notch o Hedgehog, permanecer en un estado relativo de quiescencia y una alta capacidad de reparación del ADN (Pattabiraman & Weinberg 2014).

La adaptación metabólica es una de las características de las células tumorales. La glucólisis es la conversión enzimática de glucosa en lactato con la producción de dos moléculas de ATP. En presencia de oxígeno, las células optan por la vía de fosforilación oxidativa (OXPHOS) como la vía principal para producir energía ya que es más eficiente que la glucólisis, teóricamente genera 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Las células cancerosas pueden generar ATP a través de la glucólisis incluso en condiciones de normoxia, es lo que se conoce como el efecto Warburg. La glucólisis produce ATP más rápidamente que OXPHOS en presencia de glucosa abundante. Las células madre del cáncer dependen más de la glucólisis que su descendencia diferenciada. Durante la diferenciación, estas células también pueden ajustar su metabolismo pasando de un perfil preferentemente glucolítico a un fenotipo más oxidativo para generar grandes cantidades de energía necesarias para este proceso (Peiris-Pages et al. 2016).

Las terapias convencionales actúan basándose en la rápida proliferación de las células cancerígenas, sin embargo, este enfoque no afecta a las CSCs, lo que provoca la reaparición del tumor y la metástasis. Es por ello que el estudio de las características de estas células y más concretamente de su metabolismo puede dar lugar al desarrollo de una nueva estrategia terapéutica. Durante los últimos se ha investigado el metabolismo de las células centrándose en la glucosa, sin embargo, estudios recientes se han acercado al metabolismo de la glutamina. De esta manera se ha demostrado la dependencia de las CSCs pancreáticas a la glutamina. La inhibición de GLS y de GOT evita la autorenovación de las CSCs y su sensibilización a radioterapia (Guo et al. 2012)(D. Li et al. 2015).

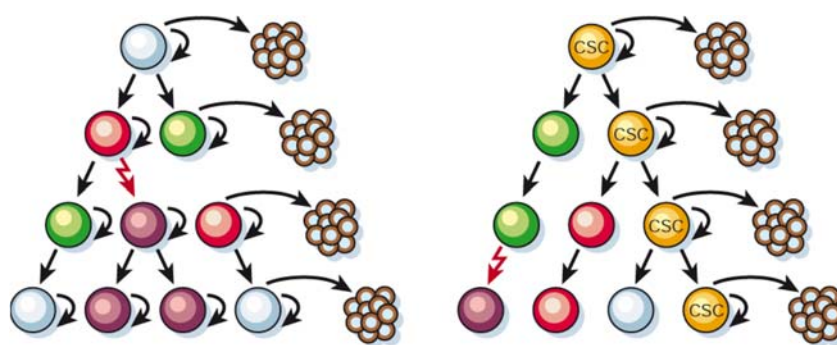


Figura 17 | Heterogeneidad en el cáncer: modelo tradicional y modelo de las células madre del cáncer. Adaptado de “ Stem cells, cáncer, and cáncer stem cells” (Tannishtha et al. 2001).

IV-Objetivos

En los últimos años el metabolismo tumoral está siendo foco de un gran interés por la necesidad de identificar nuevas dianas terapéuticas. En este sentido, el cáncer de mama triple negativo (TNBC) está asociado con un mal pronóstico y sigue siendo un reto importante encontrar una terapia más efectiva para su tratamiento. A este respecto se ha descrito en diversos estudios la dependencia de las células TNBC a la glutamina convirtiéndose esta característica en una potencial diana terapéutica.

TRAIL, es una proteína transmembrana que activa señales de apoptosis a través de receptores de muerte en la célula diana. En forma soluble, esta molécula ha sido considerada un potente agente antitumoral y se ha ensayado su función en ensayos clínicos. Sin embargo, la resistencia a la acción de TRAIL que muestran multitud de tumores primarios hace necesario conocer los mecanismos reguladores de la señalización apoptótica de los receptores de TRAIL y evaluar el potencial de nuevas terapias combinadas.

Por estas razones, el objetivo global de la tesis es el estudio del metabolismo de la glutamina y su posible relación con la resistencia a TRAIL en células TNBC así como determinar la posible aplicación de terapias combinadas de TRAIL con inhibidores de este metabolismo como terapia antitumoral.

Los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

- 1- Determinar la relación entre la dependencia de las células TNBC de la glutamina extracelular y la sensibilidad a TRAIL.
- 2- Analizar el impacto de inhibidores del metabolismo de la glutamina en la sensibilización a TRAIL de las células TNBC y caracterizar el mecanismo de sensibilización.
- 3- Investigar el papel del metabolismo de la glutamina como diana antitumoral en combinación con TRAIL.

V-Material y Métodos

1. Materiales

1.1. Cultivos celulares

Línea Celular	Especie	Características/Origen	Medio Cultivo	Procedencia
BT474	Humana	Epitelial/ Cáncer de mama	RPMI 1640 completo	ATCC
BT549	Humana	Mesenquimal/Cáncer de mama	DMEM completo+ 20 mM glucosa	ATCC
MCF-7	Humana	Epitelial/Cáncer de mama	DMEM completo	ATCC
MDA-MB231	Humana	Mesenquimal/Cáncer de mama	RPMI 1640 completo	Dr. Joaquín Arribas (Vall d'Hebron, BCN)
MDA-MB231 pBABE Ø	Humana	Mesenquimal/Cáncer de mama	RPMI 1640 completo	Producidas en el laboratorio
MDA-MB231 pBABE FLIP L	Humana	Mesenquimal/Cáncer de mama	RPMI 1640 completo	Producidas en el laboratorio
MDA-MB436	Humana	Mesenquimal/Cáncer de mama	DMEM-F12 completo	ATCC
MDA-MB468	Humana	Epitelial/Cáncer de mama	DMEM completo	ATCC
MDA-MB468 shSCR	Humana	Epitelial/Cáncer de mama	DMEM completo	Producidas en el laboratorio.
MDA-MB468 shTRAIL-R2/DR5	Humana	Epitelial/Cáncer de mama	DMEM completo	Producidas en el laboratorio.
T47D	Humana	Epitelial/Cáncer de mama	RPMI completo + 20mM glucosa	ATCC

Abreviaturas:

ATCC: American Type Culture Collection.

Completo: 10% de suero fetal bovino (FBS), 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de estreptomycin y 500U de penicilina.

Todas las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 °C, con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire.

1.2. Reactivos

Medios de cultivo y suplementos

Producto	Casa comercial/Referencia
DMEM	Sigma-Aldrich/REF:D5546
DMEM-F12	Sigma-Aldrich/REF:D6421
RPM1 1640	Sigma-Aldrich/REF:M8403
DMEM F-12 sin rojo fenol	Gibco/REF:21041-025
B27	Gibco/REF: 17504-044
FBS (Suero fetal bovino)	Sigma-Aldrich/REF:F7524
GPS (L-glutamina/Penicilina/Estreptomycin; en solución)	Sigma-Aldrich/REF:G1146
L-glutamina	Sigma-Aldrich/REF:G3126
L-asparagina	Sigma-Aldrich/REF:A0884
Antibióticos (Penicilina-Estreptomycin; en solución)	Sigma-Aldrich/REF:P0781
Puromicina	Sigma-Aldrich/REF:P7255
Glucosa monohidratada	Merck-Millipore/ REF:1.08342.1000

Reactivos

Producto	Casa comercial/Referencia
Acrilamida/Bis solution 29:1	Biorad/ REF:161-0156
Agarosa LOW EEO	Applichem Panreac/ REF: A2114.0250
APS	Sigma-Aldrich/REF:A3678
BSA (seroalbumina bovina fracción V)	Applichem Panreac/ REF: A65880050
Complete protease cocktail	Roche / REF:11836153001
ECL (Chemoluminiscent HRP substrate)	Millipore/ REF:WBKL50500
Membranas de transferencia de PVDF 0,45µm	Immobilion-Millipore/ REF:IPVH00010
Metanol (para activar la membrana de transferencia)	Applichem Panreac/ REF:221091.1612

Streptavidina-Agarosa	Sigma-Aldrich/REF:S1638
TEMED	Sigma-Aldrich/REF:T9281

Drogas e inhibidores

Producto	Descripción	Concentración	Casa comercial/Referencia
6-Diazo-5-oxo-L-norleucina	Antagonista de la glutamina. Puede inhibir diversas enzimas de su metabolismo, entre ellas la glutaminasa.	50µM	Sigma-Aldrich/REF:D2141
Acivicina	Inhibe a la gamma glutamiltransferasa.	450µM	Santa Cruz/REF:SC-200498
Aminooxiacetato	Inhibidor de las transaminasas.	1mM	Sigma-Aldrich/REF:C13408
BPTES	Inhibidor de la glutaminasa.	20µM	Sigma-Aldrich/REF:SML0601
Bromuro de etidio	Agente intercalante de DNA.	1µM	Sigma-Aldrich/REF:E8751
Cicloheximida	Inhibidor de la síntesis general de proteínas en eucariotas	5µg/ml	Sigma-Aldrich/REF:C7698
Compuesto 968	Inhibidor de la glutaminasa	10µM	Merck/REF:352010
Dimetil 2-oxoglutarato	Intermediario del ciclo de Krebs	5mM	Sigma-Aldrich/REF:349631
DHARMAFECT	Reactivo de transfección de siRNA	2,5µl/transfección	Dharmacon-Thermo scientific/ REF:T-2001-03
Epigalocatequina galato	Inhibidor de la glutamina deshidrogenasa	50µM	
N-Acetil D-Glucosamina	Intermediario de la ruta de las hexosaminas	20mM	Sigma-Aldrich/REF:A8625
Inosina	Intermediario de las rutas de síntesis de ácidos nucleicos	2,5 mM	Sigma-Aldrich/REF:I4125
Ioduro de propidio	Intercalante de ADN y ARN de doble cadena. Utilizado como colorante para la medida del ciclo	40µg/ml	Sigma-Aldrich/REF:P4170

	celular por citometría de flujo.		
L-Asparaginasa	Enzima con capacidad para eliminar la asparagina y la glutamina del medio. Se utiliza como tratamiento de ciertos tipos de leucemia	0.5 U/ml	Sigma-Aldrich/REF:A3804
N-Acetil -L-cisteína	Molécula antioxidante	10mM	Sigma-Aldrich/REF:A7250
Solución de nucleósidos 100X		1X	Merck-Millipore/REF:ES-008-D
Polybrene (sequabrene)	Agente anti-heparina. Empleado para potenciar la infección con retro- y lentivirus	8 µg/ml	Sigma-Aldrich/REF:S2667
Rapamicina	Inhibidor de mTOR (mTORC1)	500 nM	LC-laboratories/REF:R50002 5M
Solución de aminoácidos no esenciales			Sigma-Aldrich/REF:7145
Orotato	Intermediario de las rutas de síntesis de ácidos nucleicos	2,5 mM	Sigma-Aldrich/REF:O2750
Torina 1	Inhibidor de mTOR (mTORC1 y mTORC2)	250 nM	Tocris/REF:4247
Transcriptasa reversa- MLVRT	Enzima que permite la síntesis de una cadena complementaria de DNA a partir de una secuencia de DNA o RNA de cadena simple	200U/ul (ul por reacción)	Gibco/ REF:28025013

1.3. Anticuerpos

Anticuerpos primarios para western blot

Antígeno	Peso Molecular (KDa)	Origen/Tipo	Dilución	Casa Comercial	Referencia
4E-BP1	15	Conejo/PC	1:1000	Millipore	07-1416
P-4E-BP1	15	Ratón/MC	1:1000	Millipore	
AKT	60	Conejo/PC	1:1000	Cell Signaling	9272
P-AKT (Ser345)	60	Conejo/PC	1:1000	Cell Signaling	9271S
ATF4	38/55	Conejo/PC	1:1000	Santa Cruz	SC-200
Caspasa 8-XMS	53/55-42/44-18	Conejo/PC	1:1000	Donado por Dr. Gerald Cohen	-
CHOP (D46F1)	27	Conejo/PC	1:1000	Cell Signaling	5554S
eIF2 α (D7D3)	38	Conejo/PC	1:1000	Cell Signaling	5324S
P-eIF2 α	38	Conejo/PC	1:1000	Cell Signaling	3597
FADD	24	Ratón/MC	1:1000	BD-Pharmigen	610178
FLIP (7F10)	55/28	Ratón/MC	1:1000	ENZO	ALX-804-961-0100
GAPDH	37	Ratón/MC	1:40000	Santa Cruz	SC-47724
GCN2	150	Ratón/MC	1:1000	Santa Cruz	SC-374609
P70S6K	70	Conejo/PC	1:1000	Cell Signaling	9202S
P-P70S6K (Thr389)	70	Ratón/MC	1:1000	Cell Signaling	9206S
PERK	140	Conejo/PC	1:1000	Cell Signaling	3192S
TRAIL-R2/DR5	48	Cabra/PC	1:1000	R&D Systems	AF631

Anticuerpos citometría de flujo

Antígeno	Origen/Tipo	Dilución	Casa Comercial	Referencia
IgG-PE	Ratón IgG	2,5 μ l/muestra	BD-Pharmigen	554680

TRAIL-R1/DR4-PE (CD262)	Ratón IgG	2,5 µl/muestra	Biolegend	307206
TRAIL-R2/DR5-PE (CD262)	Ratón IgG	2,5 µl/muestra	Biolegend	307406

Anticuerpos secundarios para western blot

Los anticuerpos secundarios policlonales conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) fueron adquiridos a la casa comercial DAKO.

1.4. ARN de interferencia

ARN de interferencia	Secuencia 5´- 3´
ATF4	GCCUAGGUCUCUUAGAUGAdTdT
CHOP pool (1-2-3-4)	AGGGAGAACCAGGAAACGGAA
	ACGGCUCAAGCAGGAAAUCGA
	AAGGAAGUGUAUCUUCAUACA
	CAGCUUGUAUAUAGAGAUUGU
FLIP	CUUUGGGUGAUCUACGUUAdTdT
GCN2	CAGCAGAAAUCAUGUACGAUU
GLS#1	AAGAGUGUAUGGAUAUGUUAdTdT
GLS#2	AAGUGCUGUAAAAGCAGUCUGGdTdT
GOT1#1	GGGCUUCCUGAAUGAUCUGdTdT
GOT1#2	GCUAAUGACAAUAGCCUAAAuTdT
GOT1#3	GCGUUGGUACAAUGGAACAAAdTdT
GOT2	GGGACACCAAUAGCAAAAAdTdT
GPT2	CGAGUGUGGUUACAGAGGAdTdT
GS	GAUUGGACCUUGUGAAGGAdTdT
PERK	CAAACUGUAUAACGGUUUAdTdT
Scrambled control	GAGCGCUAGACAAUGAAG

2. Métodos

2.1. Cuantificación de apoptosis

La apoptosis se cuantificó por citometría de flujo mediante la detección de células hipodiploides. Para ello se sembraron 250.000 células por pocillo y, tras el tratamiento

correspondiente, se recogieron con tripsina. Se fijaron y permeabilizaron con 900 μ l de una solución de etanol frío al 70%, agitando suavemente en el vortex e incubando 5 minutos en hielo. Después de lavar, se añadieron 250 μ l de PBS1X y 250 μ l de solución de extracción de ADN (0'2M Na₂HPO₄, 0'1M ácido cítrico en PBS; pH 7'8) y se incubaron 10 minutos a 37°C. A continuación, y tras lavarlas, las células fijadas se resuspendieron en 250 μ l de solución PI/RNasa (100 μ g/ml RNasa, 40 μ g/ml de Ioduro de Propidio en PBS) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Las células apoptóticas hipodiploides se detectaron y cuantificaron en la población del ciclo celular con menor contenido en ADN que las células el pico G1 (subG1). La citometría de flujo fue realizada en un citómetro FACScalibur, utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) para el análisis de los datos.

2.2. Medida de la concentración de proteínas

Con el fin de cuantificar la cantidad de proteínas que se había obtenido tras recoger las células, se utilizaron los reactivos de BioRad (Hercules, CA, USA): Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent A, B y S. Para ello se hizo una curva patrón con BSA desde 1 μ g/ml hasta 8 μ g/ml, sobre la cual se extrapolaron los valores obtenidos de las muestras y se obtuvo la concentración de proteína. En primer lugar, se añadieron 5 μ l de muestra (o una cantidad menor, pero siempre completando hasta 5 μ l con el tampón en que estuviera diluída la muestra), a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano. En el caso del blanco, se añadieron 5 μ l del tampón. A continuación, se añadieron 25 μ l de la Solución A (1ml de Solución A + 20 μ l de Solución S). Posteriormente se añadieron 200 μ l del reactivo B. Se dejó incubando 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 750 nm en el lector de placas Varioskan Flash (Termo Electron Corporation).

2.3. Inmunodetección de proteínas por western-blot

Para el análisis de la expresión de proteínas por western-blot, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 250.000 células por pocillo. Tras el tratamiento, se aspiró el medio de cultivo y la monocapa celular se lavó una vez con PBS 1X frío. Una vez lavadas y en frío, se añaden 30-60 μ l de buffer TR3 por cada pocillo, se lisan las células utilizando un scraper que raspará la monocapa y el volumen de lisis de

cada pocillo es recogido en tubo eppendorf para cada condición. Cada muestra es sonicada durante 10 segundos en modo constante y al 10% de amplitud. A continuación, se separan 5 µl de muestra para realizar la cuantificación proteica y al resto se le añade un 10% de una solución de azul de bromofenol: β-mercaptoetanol en proporción 1:1 o azul de bromofenol: agua en proporción 1:1 en caso de que las muestras no requieran agente reductor. En este momento, las muestras pueden ser conservadas congelándolas a -20°C.

Una vez cuantificada la cantidad de proteína por muestra, estas se hirvieron a 95°C durante 5 minutos y las proteínas se separaron mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, a un porcentaje del 7,5%, 10% o 12% dependiendo del peso molecular de la proteína a detectar.

Para la preparación del gel se utilizó *Lower Buffer* (1), *Upper Buffer* (2), acrilamida, agua, APS (Ammonium persulfate, Sigma-Aldrich) y TEMED (Sigma-Aldrich). La electroforesis se realizó en *Runnig Buffer* (3), a un voltaje constante de 150 voltios durante 1 hora aproximadamente. Las proteínas de este gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Inmobilon, Millipore), previamente tratadas con metanol y mantenidas en tampón de transferencia 1X (100ml de tampón de transferencia 10X (4), 200ml de etanol y hasta 1000ml de H₂O) mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot Turbo (BioRad) a 25 voltios constantes, 1 Amperio durante 20 minutos.

La membrana se bloqueó con una solución PBS 0'1% Tween 20 (PBS/Tween) con 5% de leche en polvo durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana con PBS-Tween y se incubó con el anticuerpo correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente, o a 4°C durante toda la noche, en agitación. Tras la incubación con el anticuerpo, se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween durante cinco minutos cada lavado, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución PBS-Tween 5% de leche en polvo y el anticuerpo secundario correspondiente, que lleva acoplado la peroxidasa del rábano picante (HRP). De nuevo se hicieron tres lavados de cinco minutos cada uno con PBS-Tween y se incubó la membrana con el reactivo ECL (Millipore) durante cinco minutos, tras lo cual se reveló mediante quimioluminiscencia.

Tampones utilizados:

- | | |
|------------------------------|--------------------------------|
| 1) Lower Buffer 4X (pH 8,8) | 2) Upper buffer 4X |
| 90,85 g Tris-base (Roche) | 6,06g Tris-base |
| 20ml SDS 10% (Sigma-Aldrich) | 4ml SDS 10% |
| Agua hasta 500ml | Agua hasta 100ml |
| 3) Runnig Buffer 5X (pH 8,3) | 4) Buffer de transferencia 10X |
| 15g Tris-base | 58g Tris-base |
| 72g Glicina | 29g Glicina |
| 5g SDS | 3,7g SDS |
| Agua hasta 1 litro | Agua hasta 1 litro |

2.4. Producción de TRAIL recombinante

El TRAIL recombinante fue producido a partir de un plásmido cedido por la Dra. Marion MacFarlane (MCR Toxicology Unit. University of Leicester, UK) que contiene la secuencia que codifica para TRAIL recombinante (aminoácidos 95-281) insertada en BamHI/XhoI del vector pET-28b (+) con resistencia a kanamicina y una cola de seis histidinas para facilitar la purificación de la proteína recombinante (MacFarlane et al., 1997). Se transformaron bacterias BL21 con 1-2 μg de ADN por choque térmico y se crecieron en medio LB (Luria-Bertani), con 20mM de glucosa y 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina. Cuando el precultivo alcanzó la densidad óptica de 0,6-0,8 a la longitud de onda de 600nm se indujo la síntesis de la proteína recombinante añadiendo al cultivo 0,5 μM de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido). Tras tres horas de inducción a temperatura ambiente, las bacterias se recogieron por centrifugación y se lisaron, tras un lavado con PBS 1X, en un tampón de lisis que contiene 30mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150mM de NaCl, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas. Este lisado se incubó en un rotor circular durante 16 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$, en una columna de sefarosa quelada con níquel (Quelatin Sepharose Fast Flow; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suiza), a la que el TRAIL quedará unido por la cola de histidinas. Transcurrido este tiempo, se lava la columna seis veces con PBS frío antes de eluir el TRAIL con una solución 100mM de EDTA en PBS. Las fracciones más purificadas se titularon en actividad realizando un ensayo de apoptosis en células HeLa sensibles a TRAIL y se almacenaron a -80 $^{\circ}\text{C}$.

2.5. Análisis de los receptores de TRAIL en la superficie celular

Para detectar la expresión de receptores de TRAIL en la superficie celular, se utilizaron 250.000 células. Se despegaron del sustrato con un rascador en solución de PBS y, una vez lavadas, se resuspendieron en 100 μ l de PBS. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (5 μ g/ml) a 4°C, durante 30 minutos. Después de lavar con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución 1:20, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se volvieron a lavar con PBS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS. La detección de los receptores de muerte se realizó con un citómetro de flujo FACSCalibur, utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) para el análisis de los datos.

2.6. Transfección con oligos de ARN de interferencia (siRNA)

El silenciamiento transitorio de proteínas celulares mediante siRNA se llevó a cabo con el reactivo de transfección Dharmafect-1 (Dharmacon). Para ello se sembraron 250.000 células por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos, en medio completo sin antibiótico. Al día siguiente, el medio completo fue sustituido por 2 ml de medio de transfección durante 6 horas, tras las cuales este medio es aspirado y sustituido por medio de crecimiento completo que mantendremos durante 24 horas más.

El medio de transfección se compone de 50-100 nM de oligos de siRNA, 2,5 μ l de Dharmafect y 2ml de medio Optimen (Gibco-Invitrogen).

La preparación del medio de transfección consta de dos pasos. En primer lugar se mezclan durante 5 minutos a temperatura ambiente el Dharmafect con el medio Optimen. Pasado este tiempo, se añade esta mezcla a los oligos y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. En ese tiempo, se lavan los pocillos con medio Optimen y se les añade 1,6 ml del mismo a cada pocillo. Tras los 20 minutos de incubación, se añaden 400 μ l de la mezcla Optimen/Dharmafect/oligos, al pocillo correspondiente.

2.7. Producción viral

Para la producción de retrovirus y lentivirus, se utilizó la línea celular HEK293T (amablemente cedida por el Dr. Antonio Rodríguez Márquez, Universidad Autónoma de Madrid) y los siguientes plásmidos:

Plásmidos retrovirales:

El plásmido pCI-VSV-G, que codifica para la expresión del gen de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), comúnmente utilizada para el pseudotipaje de lentivirus y retrovirus, y el plásmido pVpack-GP-dl, que codifica para la expresión de los genes virales gag, pol y rev, fueron amablemente cedidos por el Dr. Antonio Rodríguez. El plásmido pBabe Puro que sirvió de base para la construcción del plásmido pBabe-FLIPL fue amablemente cedido por el Dr. Mauricio Reginato (Drexel University, Filadelfia)

Plásmidos lentivirales:

El plásmido pMD2.G, que codifica para la expresión del gen de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) comúnmente utilizada para el pseudotipaje de lentivirus y retrovirus, y el plásmido psPAX2, que codifica para la expresión de los genes virales gag, pol y rev, así como el plásmido pLVTHM que se utiliza para la inserción de la secuencia shRNA de interés y que sirvió de base para la construcción de los plásmidos pLVTHM-shTRAIL-R2/DR5 y pLVTHM-shScrambled, fueron amablemente cedidos por la Dra. Rosa M^a Ríos (CABIMER, Sevilla).

La producción de retrovirus y lentivirus se realizó mediante la transfección, con los plásmidos correspondientes, de las células HEK293T por el método del fosfato cálcico (Ausubel, F.M. et al. 1994) basado en la obtención de un precipitado de fosfato cálcico y ADN en una solución salina de fosfatos. El precipitado forma agregados que pueden ser endocitados/fagocitados por las células.

En primer lugar, se sembraron 2×10^6 células HEK293T en placas de 90 mm en 10 ml de medio completo, para que al día siguiente, al transfectar, tengan una confluencia de un 80%. 3 horas antes de la transfección se sustituyó el medio de cultivo por 8 ml de medio fresco. Las células se transfectaron con 27 μ g de ADN total en una proporción 1:2:3 de

plásmido pMD2.G (4'5 µg), plásmido psPAX2 (9 µg) y plásmido de interés pLVTHM-sh correspondiente (13'5 µg), en el caso de lentivirus; y 4'5 µg de plásmido pCI-VSV-G, 9 µg de plásmido pVpack-GP-dl y 13'5 µg de plásmido pBabe-de interés según corresponda, en el caso de retrovirus. El ADN de los tres plásmidos se mezcla suavemente y se añade gota a gota a un tubo con 0'5 ml de HBS 2X (NaCl280 nM, Hepes 100mM, Na₂HPO₄ 1,5mM, pH 5,5). Tras mezclar suavemente, se añaden, despacio y gota a gota, 30 µl de CaCl₂ 2'5M y se agita inmediatamente. Se deja incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se añaden gota a gota 0'5 ml de la mezcla a cada placa de células.

Las células se dejan en un incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante toda la noche. Tras este tiempo se retira el medio de transfección y se añaden 8 ml de medio fresco, incubándose bajo las mismas condiciones durante 24-48 horas más. Transcurrido este tiempo, se recoge el medio celular, se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm para eliminar los restos celulares y se limpia pasándolo a través de filtros de 0'45 µm. Una vez filtrado, los virus presentes en el medio celular se pueden concentrar mediante centrifugación en filtros Vivaspin 20 Polyethersulfone 100.000 MWCO (Sartorius Gropu-DICSA), a una velocidad de 1.800 x g y a una temperatura de 4°C. Los virus concentrados pueden almacenarse a -80°C.

Para conocer el título viral, se sembraron 80.000 células en pocillos de placas de 6 pocillos. A la mañana siguiente, se añadieron a cada pocillo cantidades crecientes de virus. Se completó hasta 1ml con medio fresco y se añadió Polybrene a la concentración de 8 µg/ml. Tras 48 horas, se midió el porcentaje de células positivas para GFP mediante citometría de flujo y se obtuvo una curva de infección, mediante la cual podemos conocer la cantidad de virus obtenida y el volumen de virus necesarios para infectar a un determinado número de células.

Del mismo modo, pueden emplearse los virus sin concentrar. En este caso, tras eliminar los restos celulares y purificar el medio celular con los filtros de 0.45 µm, se alícuota el sobrenadante y se mantiene a -80°C.

2.8. Infección viral

Infección retroviral:

Para la obtención de células MDA-MB231 que sobreexpresan FLIP L, se cultivaron 1.000.000 células en una placa de 90 mm. Al día siguiente se infectaron con una mezcla de 2ml de sobrenadante viral (obtenido como se comenta anteriormente en el apartado producción viral), 2 ml de medio fresco y Polybrene (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8 µg/ml. A las 6 horas de la infección se le añadieron 6ml de medio fresco y se dejaron otras 15-16 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de infección y se añadió medio fresco nuevo. Tras 48 horas, se añadió el antibiótico puromicina a una concentración de 1'5 µg/ml y se seleccionaron las células resistentes durante otras 48 horas.

Infección lentiviral:

Para la obtención de células MDA-MB468 que expresan el shRNA de TRAILR2/ DR5 o el shRNA-Scrambled se cultivaron 1.000.000 células en una placa de 90 mm. Al día siguiente se infectaron con una mezcla de 2 ml de sobrenadante viral (obtenido como se comenta anteriormente en el apartado producción viral), 2 ml de medio fresco y Polybrene (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8 µg/ml. A las 6 horas de la infección se le añadieron 6ml de medio fresco y se incubaron otras 15-16 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de infección y se añadió medio fresco nuevo. La detección del % de células positivas para la expresión de los lentivirus que expresan GFP, se realizó mediante citometría de flujo en un citómetro FACScalibur, utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) para el análisis de los datos.

2.9. RT-PCR (Transcripción reversa de ARN y amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa)

Extracción de RNA

El RNA total de las células se obtuvo utilizando el sistema de extracción de RNA RiboZol (Amresco, VWR), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para ello se aspiró el medio de cultivo de las placas que contenían las células adherentes, se añadió 1 ml de RiboZol por pocillo de placa de 6 pocillos y se recogió en tubos *ependorf* para cada condición. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se añadieron 200 µl de cloroformo (Cl₃CH), los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se dejaron reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recogió la fase acuosa (superior) en otro tubo *ependorf*. Al volumen correspondiente de la fase acuosa recogida, se le añadieron 500 µl de isopropanol que se mezclaron despacio hasta obtener una mezcla homogénea. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el sedimento de RNA fue lavado con 1 ml de etanol al 75%, centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y aspiración el sobrenadante. El sedimento de RNA obtenido se secó en una estufa a 37°C durante aproximadamente 20 minutos y cuando estuvo completamente seco se resuspendió en 12 µl de H₂O-DEPC incubando 10 minutos a 55-60°C.

RT-PCR

Partiendo de 2 µg de RNA total y utilizando un kit de transcriptasa reversa M-MLV (Gibco) se sintetizó el DNA complementario (cDNA). De este DNA se tomó 1 µl para amplificar por PCR la actina como control. Los cebadores utilizados para la amplificación de mRNAs se obtuvieron de Sigma. El programa para amplificar la actina consta de 3 fases: una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, 27 ciclos de desnaturalización 94°C-anillamiento 60°C-elongación 72°C de 40 segundos cada paso, y por último, la elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Applichem) al 1% en tampón TAE 1X con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich).

2.10. RT-Q-PCR

La PCR cuantitativa se empleó para el análisis de la expresión de RNA mensajero. Se realizó utilizando el Taqman Universal PCR Master MIX según las instrucciones del fabricante y con el sistema 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Las sondas comerciales Taqman frente al cDNA humano utilizadas fueron las siguientes:

Sonda Taqman	Referencia
CHOP	Hs01090850_m1
FIIP L	AIN1EVO
FLIP S	Ss03391532_m1
TRAIL-R2	Hs00366278_m1
GLS	Hs00248163_m1
GOT1	Hs00157798_m1
GOT2	Hs00905827_g1
GPT2	Hs00370287_m1
GS	Hs00365928_g1

2.11. Ensayo de mamíferas

El ensayo de la formación de mamíferas se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo. Se sembraron 250.000 células en placas de 6 pocillos tras lo cual fueron incubadas con diversos tratamientos. Una vez finalizados estos, se aspiró el medio de cultivo de las placas y se tripsinizaron las células. Tras ser despegadas las células, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en un medio para mamíferas (DMEM F12 con el suplemento B27, GPS y 20ng/ml de EGF). Las células de cada condición se contaron para poner el mismo número, en este caso 5000 células, en cada pocillo. Estos pocillos habían sido tratados previamente con poliHEMA disuelto en etanol 95% y secados en una estufa a 37°C durante 72 horas, para obtener una superficie no adherente en las placas. Las células se disgregaron mediante una jeringuilla con un diametro 25G obteniendo células individuales que se sembraron en los pocillos con medio para mamíferas. Las células se incubaron durante 7 días en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo se determina el número de mamíferas en cada condición mediante microscopia, considerando como mamíferas aquellas mayores de 50µm de diametro.

2.12. Medida de la síntesis de proteínas.

La síntesis de proteínas se determinó mediante incorporación de (³H)-leucina (2μCi/ml) en material insoluble en ácido tricloroacético. Tras los tratamientos correspondientes las células recibieron un pulso de dos horas de (³H)-leucina. Finalizado este tiempo se aspiró el medio y las células se lavaron 3 veces con PBS 1X. Por último, se añadió ácido tricloroacético al 5% frío durante 20 minutos, tras lo cual se hizo un lavado con este mismo ácido y dos lavados con etanol absoluto. Una vez seco, el material se disolvió en 500 μl de un buffer que contenía 0.1M de NaOH, 2% Na₂CO₃, 0.1% SDS. Tras esto, se añadió 4,5 ml de solución de centelleo líquido (Ultima Gold TM, Perkin Elmer). La radiactividad fue medida en un contador de centelleo Beckman Coulter LS6500.

2.13. Ensayo de clonogenicidad

La clonogenicidad fue determinada mediante un ensayo con cristal violeta. Las células fueron contadas después de los diversos tratamientos, y se sembraron 1000 células de cada condición en placas de 12 pocillos. Tras 7 días de crecimiento en un incubador a 37°C y 5% de CO₂, se determinó la capacidad clonogénica mediante tinción con cristal violeta. Para ello se aspiró el medio y se hicieron dos lavados con PBS. Se incubó las células a temperatura ambiente durante 20 minutos en una solución de 0,2% de cristal violeta en 2% de etanol. Finalizado este tiempo se aspiró la solución de cristal violeta, y se lavaron las placas dos veces con agua. Las placas se dejaron secar durante aproximadamente una hora tras lo cual se resuspendieron con SDS al 1%. Se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 560 nm en el lector de placas Varioskan Flash (Termo Electron Corporation).

2.14. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media ± SD de al menos 3 experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante la aplicación de la prueba T-Student. Un valor de p menor de 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

VI-Resultados

CAPÍTULO PRIMERO: Regulación de la sensibilidad a TRAIL en células tumorales de mama triple negativas (TNBC) por la glutamina extracelular.

Desde su descubrimiento en 1995, TRAIL ha sido considerado un potente ligando de muerte con potencialidad terapéutica ya que es capaz de inducir apoptosis en células tumorales sin dañar tejidos normales ((Ashkenazi et al. 1999)(Walczak et al. 1999). Estos resultados llevaron a proponer a TRAIL como una posible terapia antitumoral y, por ello, la actividad de TRAIL recombinante y de anticuerpos agonistas ha sido evaluada en diversos ensayos clínicos (Von Karstedt, Montinaro, & Walczak 2017). Sin embargo, aunque se ha observado escasa toxicidad de los agonistas de los receptores de TRAIL en estos ensayos clínicos, los tumores primarios son, en muchos casos, resistentes a la acción apoptótica de estos agonistas y, por ello, las respuestas terapéuticas han sido negativas en la mayoría de los tumores ensayados. Por tanto, es importante abordar el estudio de estas resistencias para el desarrollo de tratamientos combinados con otros agentes terapéuticos que sensibilicen a estas células tumorales a TRAIL, como ya se ha descrito al combinar TRAIL con radioterapia o quimioterapia (Palacios et al. 2014)(Lemke, et al. 2014).

1.1. Sensibilización de células tumorales triple negativas de mama a la apoptosis por TRAIL en medio de cultivo carente de glutamina.

La glutamina desempeña un papel importante en el metabolismo tumoral a través de su contribución a la homeostasis redox, la biosíntesis de macromoléculas o la señalización celular, es por ello que puede ser una potencial diana terapéutica. En este sentido, se ha descrito que las células de TNBC, con mal pronóstico y reducidas opciones terapéuticas, son altamente dependientes de la glutamina exógena necesaria para su proliferación y crecimiento (Van Geldermalsen et al. 2016) (Timmerman et al. 2013). Confirmamos estos estudios utilizando una línea celular de cada clase, la línea MDA-MB468 como representativa de las TNBC y la línea T47D de las no TNBC, y estudiamos como afectaba la privación de glutamina en el medio extracelular a la proliferación durante 5 días de cultivo. Aunque en presencia de glutamina en el medio de cultivo las células de ambas líneas proliferan de manera bastante similar, en ausencia de este aminoácido el crecimiento de las células TNBC está completamente inhibido, como se puede observar en la figura 1, lo que convierte esta dependencia en una posible diana antitumoral frente a células TNBC.

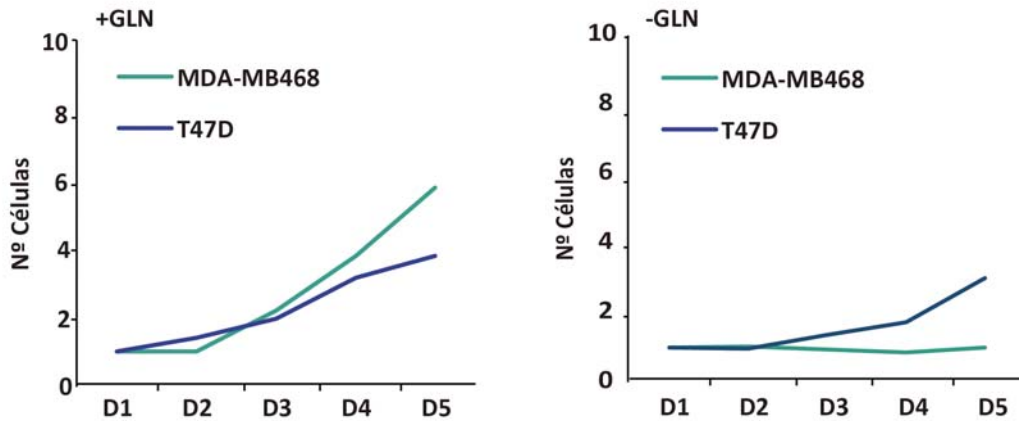


Figura 1 | Efecto de la privación de glutamina en el crecimiento celular. Las células fueron incubadas en medio con o sin glutamina durante 5 días. La proliferación celular se determinó mediante tinción con cristal violeta como se describe en Materiales y Métodos.

Dada la importancia de la glutamina en la regulación del metabolismo tumoral (DeBerardinis & Cheng 2010) (Wise & Thompson 2010), en este trabajo de tesis hemos estudiado el posible papel de la glutamina en la regulación de la sensibilidad a TRAIL de células TNBC y la posible utilización de esta dependencia de glutamina exógena como diana para la sensibilización de células TNBC a TRAIL. Para ello, hemos analizado inicialmente la regulación de la sensibilidad a TRAIL en cultivos de células TNBC y no TNBC privadas de glutamina. Como se puede ver en la figura 2 todas las líneas celulares utilizadas son muy resistentes a TRAIL, sin embargo, mientras que las células TNBC se sensibilizan tras la privación de glutamina, en el caso de las células no TNBC no se produce sensibilización a la apoptosis por TRAIL.

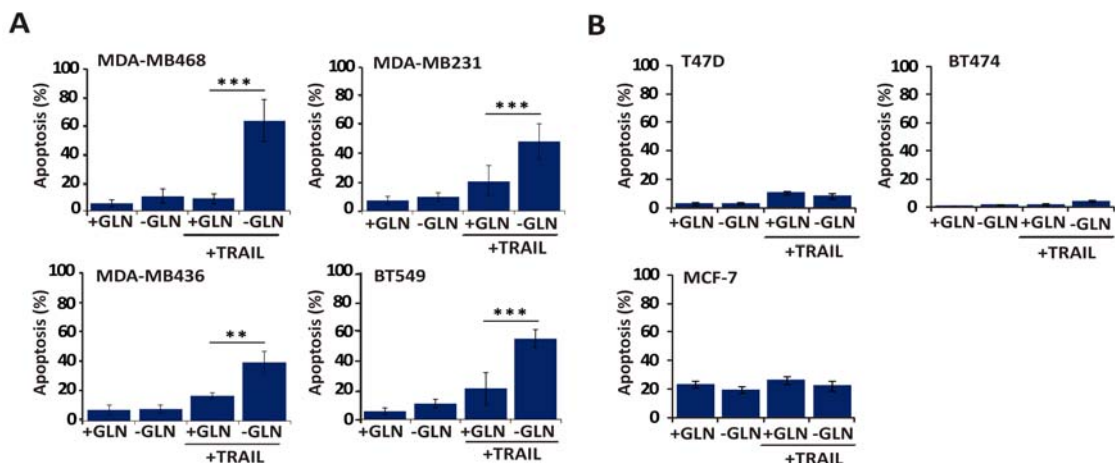


Figura 2 | Sensibilidad a TRAIL tras privación de glutamina en células TNBC y no TNBC. Células TNBC (A) y células no TNBC (B) fueron incubadas durante 24 horas en medio con o sin glutamina (2mM) tras lo cual se incubaron en el mismo medio en presencia o ausencia de TRAIL durante otras 24 horas (100ng/ml MDA-MB468, 50ng/ml MDA-MB231, 10ng/ml MDA-MB436, 100ng/ml BT549, 500ng/ml líneas no TNBC). La apoptosis se determinó como el porcentaje de células hipodiploides por citometría de flujo tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. **p<0,01, ***p<0,001.

Para caracterizar el mecanismo implicado en la apoptosis inducida por TRAIL tras privación de glutamina en las células TNBC, se examinó en primer lugar la activación de la caspasa 8, un evento bioquímico clave que se desencadena al unirse TRAIL a sus receptores proapoptóticos en la superficie celular. Para ello, determinamos el procesamiento de procaspasa 8 en sus fragmentos proteolíticos intermedios de 43/41 KDa y la generación de la subunidad mayor de 18 KDa en células tratadas con TRAIL. Comparando la línea celular TNBC MDA-MB468 con la línea no TNBC T47D se puede observar que en estas últimas no se produce el procesamiento de la procaspasa 8 tras la privación de glutamina y tratamiento con TRAIL. En cambio, en las células TNBC se observa un claro procesamiento de la procaspasa 8 tras el tratamiento con TRAIL en células cultivadas en ausencia de glutamina (Figura 3).

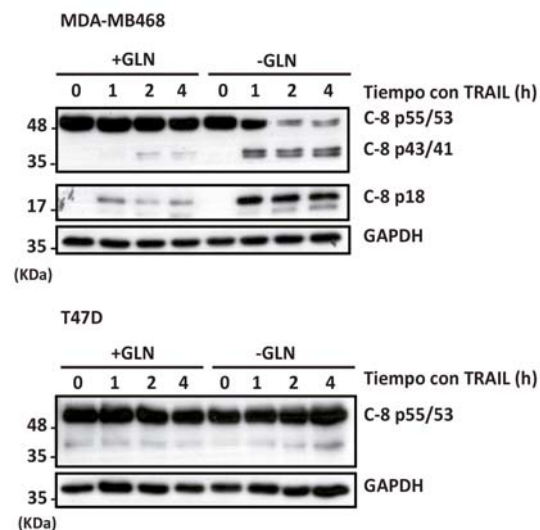


Figura 3 | Procesamiento de la procaspasa 8 tras privación de glutamina y tratamiento con TRAIL. Las células MDA-MB468 (A) y las células T47D (B) fueron incubadas durante 24 horas en medio con y sin glutamina y tratadas con TRAIL según los tiempos indicados. Los niveles proteicos de la caspasa 8 fueron determinados mediante Western Blot. GAPDH fue utilizado como control de carga de proteínas.

En la apoptosis inducida por TRAIL la caspasa 8 es reclutada y procesada en el complejo inductor de muerte celular (DISC) de manera dependiente de FADD y de receptores de TRAIL (Green & Llambi 2015) . En el complejo también se puede encontrar la proteína inhibidora de la apoptosis FLIP que compete con la caspasa 8 para su unión a FADD ya que presenta una alta homología con ella, provocando la inhibición de la apoptosis cuando los niveles de FLIP son elevados. La isoforma FLIP(L) puede también facilitar la activación controlada de caspasa-8 en el DISC (Olivier Micheau et al. 2002) permitiendo la proteólisis limitada de sustratos proteicos.

Tras demostrar que la eliminación de glutamina del medio de cultivo facilitaba la activación de caspasa-8 por TRAIL en células TNBC, estudiamos el receptor proapoptótico implicado en esta activación. Se ha descrito que en células tumorales de mama TRAIL-R2/DR5 es principalmente el receptor que transmite la señal apoptótica en la ruta extrínseca activada por TRAIL. Por ello, generamos mediante infección con vectores lentivirales de shRNA de TRAIL-R2/DR5 células que expresaran niveles reducidos de esta proteína. Como se puede observar en la figura 4A, las células infectadas con lentivirus shTRAIL-R2 expresan niveles indetectables de esta proteína cuando se comparan con células infectadas con lentivirus control (shScr). En estos modelos celulares estudiamos la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL tras la privación de glutamina. Como se observa en la figura 4B, mientras que en las células shScr la eliminación de la glutamina del medio de cultivo inducía una importante sensibilización a TRAIL, las células shTRAIL-R2 eran marcadamente resistentes al proceso de sensibilización.

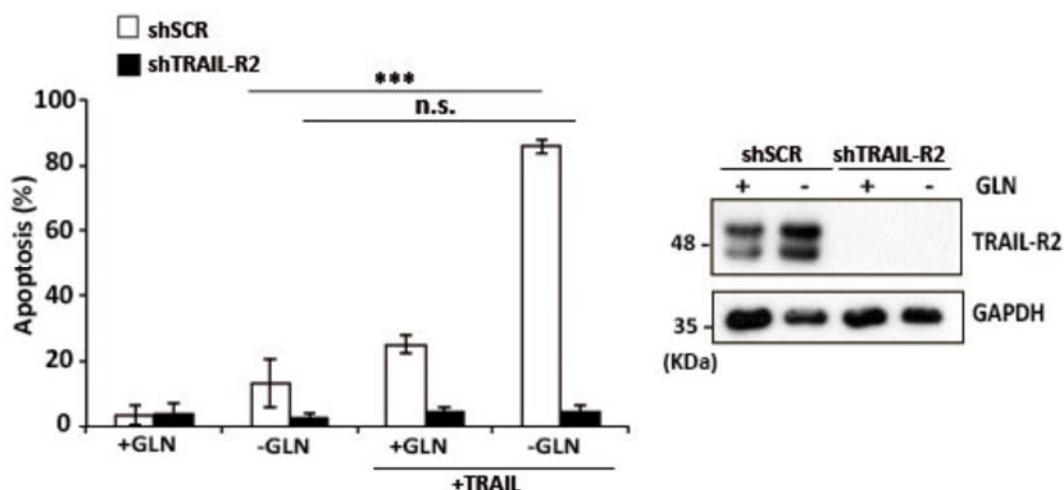


Figura 4 | TRAIL-R2 es el receptor implicado en la sensibilización a TRAIL tras privación de glutamina. Células MDA-MB468 con una inhibición estable de TRAIL-R2 o con el vector vacío fueron incubadas en un medio con o sin glutamina durante 24 horas tras lo cual se las trató en presencia o ausencia de TRAIL. La apoptosis se

midió como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. El silenciamiento de TRAIL-R2 se determinó por Western blot. Los niveles de GAPDH se utilizaron como control de carga. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. ***p<0,001, n.s. no significativo estadísticamente.

Para profundizar en el estudio del mecanismo de sensibilización a TRAIL, examinamos a continuación la expresión, en las células tumorales de mama, de los principales componentes proteicos del DISC para determinar si la privación de glutamina alteraba los niveles de los mismos de manera que explicasen la sensibilización a la apoptosis por TRAIL. Como se puede ver en la figura 5, aunque no había diferencias significativas en los niveles proteicos de FADD y de caspasa 8 (Figura 5A) tras la privación de glutamina, sí se observaba un claro aumento en los niveles de TRAIL-R2 y una importante disminución en los niveles de FLIP en la línea celular TNBC MDA-MB468. Sin embargo, estos cambios no se producían en la línea no TNBC T47D (Figura 5B).

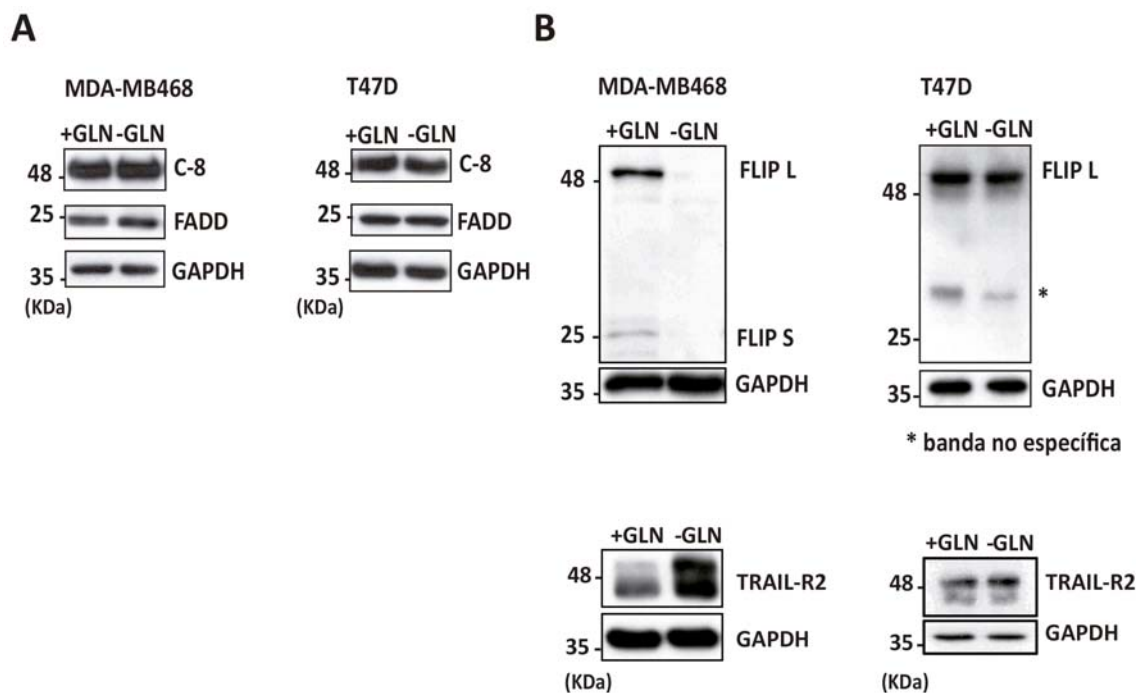


Figura 5 | Niveles celulares de componentes del DISC tras privación de glutamina.

Células MDA-MB468 (A) y células T47D (B) fueron incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de glutamina y los niveles proteicos de FADD, Caspasa-8, TRAIL-R2 y FLIP fueron determinados mediante Western blot. Los niveles celulares de GAPDH se utilizaron como control de carga de proteínas en el Western blot.

Tras observar este aumento de los niveles totales de proteína TRAIL-R2, determinamos si este aumento se producía también a nivel de expresión génica analizando los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa. Como se puede observar en la figura 6A, la eliminación de la glutamina en el medio de cultivo inducía de forma marcada la expresión del ARNm de TRAIL-R2 en las células MDA-MB468 pero no en las células T47D. Así mismo, analizamos los niveles de los receptores proapoptóticos TRAIL-R1 y TRAIL-R2 receptor en la superficie celular tanto en las células MDA-MB468 como en las células T47D privadas de glutamina (Figura 6B). Los resultados que se muestran en la figura 6B indican claramente que la falta de glutamina en el medio de cultivo induce un incremento en la expresión del receptor TRAIL-R2 en la superficie de las células MDA-MB468 pero no en la de las células T47D, confirmando los resultados obtenidos al analizar la expresión total de proteína TRAIL-R2 mediante western blot. En cambio, los niveles de TRAIL-R1 en la superficie celular no aumentan tras la incubación de las células en medio carente de glutamina (Figura 6B).

Todos estos datos sugieren que el aumento de los niveles de TRAIL-R2 tras la privación de glutamina puede ser responsable de la mayor sensibilización a TRAIL de las células TNBC.

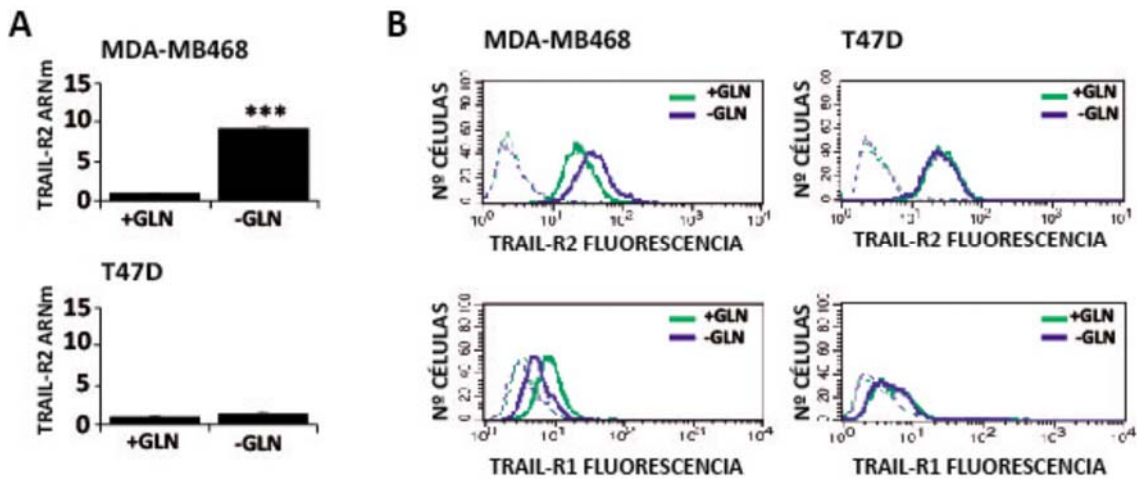


Figura 6 | La privación de glutamina aumenta los niveles de TRAIL-R2. Células MDA-MB468 y células T47D fueron incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de glutamina. (A) Los niveles de ARNm de TRAIL-R2 fueron determinados mediante qPCR. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. ***p<0,001. (B) Los niveles de TRAIL-R1 y TRAIL-R2 en la superficie celular se determinaron por citometría de flujo como se indica en Materiales y Métodos.

Ha sido descrito que las células no TNBC tienen altos niveles de glutamina sintetasa (GS) y bajos niveles de glutaminasa, lo que las hace independientes de la glutamina exógena para su viabilidad y proliferación, ya que esta enzima les permite sintetizar la glutamina necesaria para estas funciones a partir del glutamato, en una reacción inversa a la de la glutaminasa (Kung, Marks, & Chi 2011). Por este motivo, determinamos si el silenciamiento de la GS en la línea celular no TNBC T47D las hacía dependientes de glutamina y por tanto sensibles a TRAIL tras un tratamiento de privación de glutamina. Como se puede observar en la figura 7, el silenciamiento de la GS aumenta significativamente la sensibilidad a TRAIL de las células T47D.

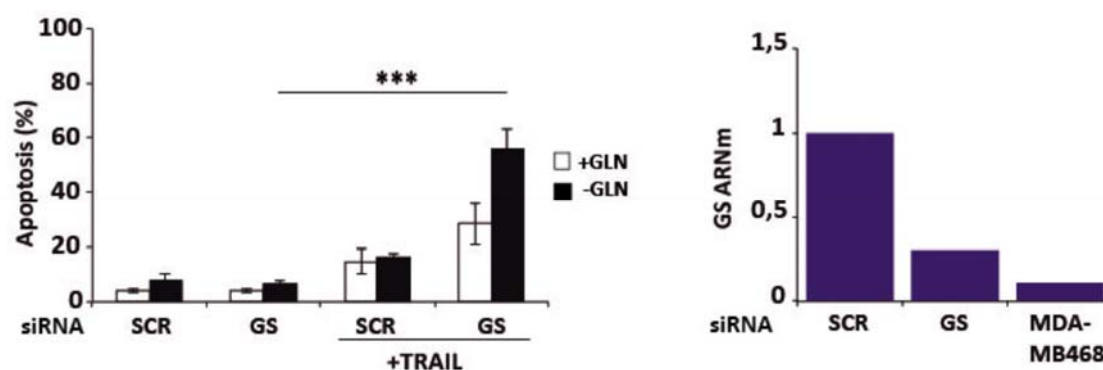


Figura 7 | Sensibilización a TRAIL tras silenciamiento de la GS en células no TNBC.

Las células MDA-MB468 se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia control y frente a GS durante 30 horas, se incubaron en presencia o ausencia de glutamina durante 24 horas. Tras esto se trataron con TRAIL (100ng/ml). La apoptosis se midió como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. *** p<0,001. Para determinar el grado de silenciamiento se midieron los niveles de ARNm de GS por RT-qPCR.

1.2. Papel de la ruta GCN2/ATF4/CHOP en la regulación de la expresión de TRAIL-R2 tras privación de glutamina.

Basándonos en los resultados anteriores, analizamos a continuación el mecanismo que regula la expresión de TRAIL-R2 tras la privación de glutamina. En este sentido, algunos datos de otros laboratorios habían descrito que la expresión de TRAIL-R2 se regula en respuesta a situaciones de estrés (Martin-Perez et al. 2014). La privación de aminoácidos y, en particular, de glutamina puede dar lugar a estrés celular y activar respuestas adaptativas para resolver este estrés. Uno de los eventos iniciales de esta respuesta adaptativa es la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α por la quinasa GCN2 o por la quinasa PERK, lo que inhibe la traducción de mensajeros dependientes de cap y, por ello, la síntesis global de proteínas (Harding et al. 2003).

Al mismo tiempo, se favorece la traducción de ARNm específicos que contienen otros marcos de lectura (uORF) en su región 5' no traducible. Entre estos ARNm, se induce la traducción del factor de transcripción ATF4, evento clave en la respuesta adaptativa a estrés, que puede inducir muerte celular a través de la activación transcripcional del gen CHOP (GADD153), que a su vez es un factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de TRAIL-R2 (P. D. Lu, Harding, and Ron 2004)(Zinszner et al. 1998). Para caracterizar el mecanismo implicado en el aumento de TRAIL-R2 tras privación de glutamina, se determinó en primer lugar el grado de fosforilación de eIF2 α y el nivel de expresión de ATF4 y CHOP en las células MDA-MB468 y T47D. Al incubar estas células en un medio sin glutamina se observó una fosforilación mayor de eIF2 α en las células MDA-MB468 que en las T47D, y en consecuencia una mayor inducción de ATF4 y CHOP, tanto a nivel de proteína (Figura 8A) como también de ARNm (Figura 8B) en el caso de CHOP. Por otra parte, el silenciamiento de la glutamina sintetasa en las células T47D que hace que estas células sean más sensibles a TRAIL (Fig. 7), permite una respuesta de estrés en respuesta a la retirada de la glutamina del medio de cultivo como se muestra en la figura 8C al analizar la expresión del factor de transcripción CHOP, aunque los niveles de inducción son considerablemente menores que los que se observan en las células TNBC (Fig. 8B), probablemente por la existencia de actividad glutamina sintetasa residual en las células T47D transfectadas con el siRNA de GS (Fig. 7)

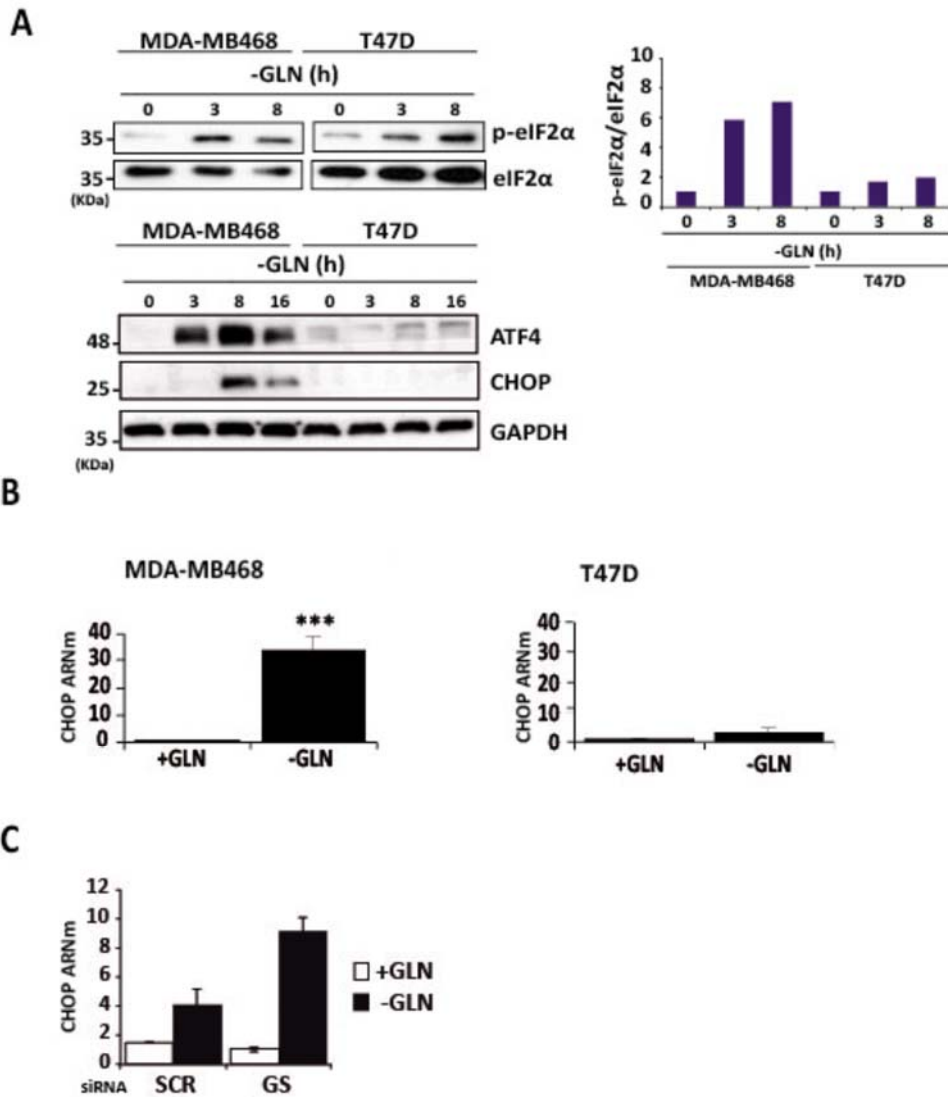


Figura 8 | Diferencias en la ruta GCN2/ATF4/CHOP tras la privación de glutamina.

(A) Las células MDA-MB468 fueron incubadas en presencia o ausencia de glutamina durante los tiempos indicados. Los niveles de proteínas se determinaron por Western blot. GAPDH fue utilizado como control de carga. Los niveles de p-eIF2 α se cuantificaron respecto a eIF2 α total. (B) Los niveles de ARNm de CHOP fueron determinados por RT-qPCR tras 16 horas de privación de glutamina en las células MDA-MB468 y T47D. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. ***p<0,001. (C) Los niveles de ARNm de CHOP fueron determinados por RT-qPCR tras 16 horas de privación de glutamina en las células T47D que habían sido transfectadas con un oligo de RNA de interferencia control y frente a GS.

El siguiente paso fue determinar la quinasa responsable de la activación de la vía en respuesta al estrés por privación de glutamina. Para ello se silenció la expresión de las quinasas GCN2 y

PERK mediante siRNA específicos y se determinaron los niveles de ARNm de CHOP y TRAIL-R2. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 9. El silenciamiento de GCN2, pero no el de PERK, reduce la activación de esta ruta de señalización (Figura 9A). Del mismo modo, observamos que la ruta de GCN2/ATF4/CHOP regula positivamente la expresión de TRAIL-R2, ya que el silenciamiento de los componentes de esta vía previene el aumento de los niveles de TRAIL-R2 tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico y en la superficie celular, tras privación de glutamina (Figura 9B). La regulación de la expresión del receptor TRAIL-R2 por privación de glutamina también se observó en las células T47D tras el silenciamiento de la expresión de la glutamina sintetasa (Fig. 9C) aunque, al igual que se observaba en el caso de CHOP, los niveles de inducción no eran comparables a los observados en las células MDA-MB468 privadas de glutamina.

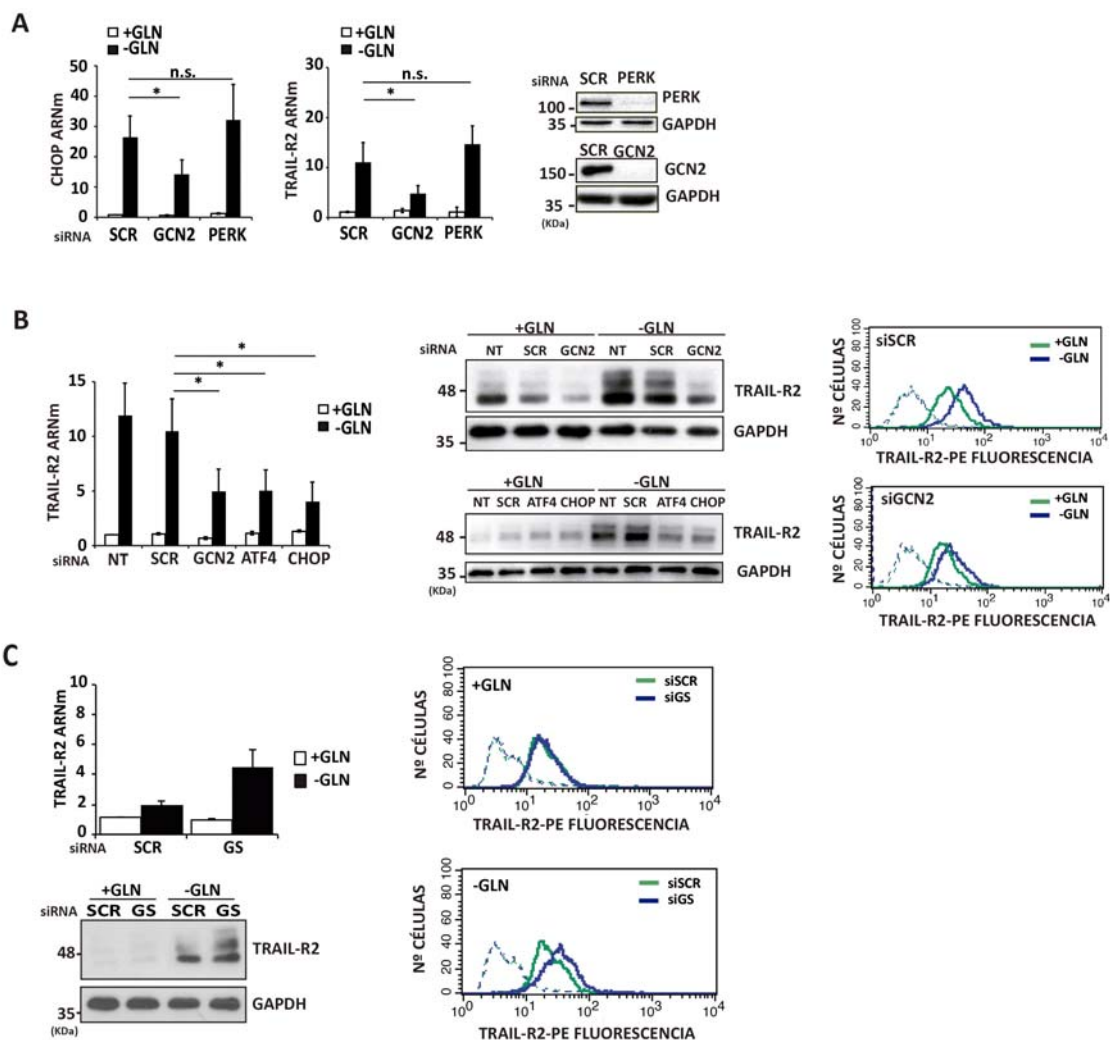


Figura 9 | El aumento de expresión de TRAIL-R2 depende de la ruta GCN2/ATF4/CHOP. Las células MDA-MB468 se transfectaron con el oligo control (SCR) ó con oligos de siRNA frente a PERK, GCN2, ATF4 o CHOP durante 30 horas.

Otros cultivos celulares no fueron tranfectados (NT). Tras la transfección, las células se incubaron en presencia o ausencia de glutamina durante 24 horas y se determinaron (A) los niveles de ARNm de CHOP y TRAIL-R2 por qPCR y los niveles de proteínas de PERK y GCN2 mediante Western blot. Los niveles de GAPDH se utilizaron como control de carga. En (B) se analizó la expresión de ARNm, proteína total y niveles en superficie de TRAIL-R2 tras el silenciamiento de GCN2, ATF4 o CHOP. Los niveles de GAPDH se utilizaron como control de carga en el Western blot. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, n.s. no significativo estadísticamente. (C) en las células T47D que habían sido transfectadas con un oligo de RNA de interferencia control y frente a GS tras 24 horas de tratamiento con y sin glutamina se determinaron los niveles de TRAIL-R2 a nivel de ARNm mediante RT-qPCR, a nivel de proteína por Western blot y a nivel de superficie celular por citometría de flujo.

1.3. La sensibilidad a TRAIL no depende del aumento de TRAIL-R2 y de la ruta GCN2/ATF4/CHOP.

Aunque como se ha mostrado en el apartado anterior la ruta de GCN2/ATF4/CHOP controla el aumento de TRAIL-R2 (Figura 9) y TRAIL-R2 es el receptor responsable de la apoptosis inducida por TRAIL en células privadas de glutamina (Figura 4), nuestro siguiente objetivo fue tratar de determinar si el incremento de expresión de TRAIL-R2 en la superficie celular era responsable de la sensibilización observada en células TNBC. Para responder a esta cuestión, se llevó a cabo la transfección de los siRNAs para silenciar la expresión de cada uno de los componentes de la ruta GCN2/ATF4/CHOP antes de la privación de glutamina y el posterior tratamiento con TRAIL. Como se puede observar en la figura 10, el silenciamiento de la expresión de GCN2, ATF4 o CHOP, que previene el aumento de expresión de TRAIL-R2 (Figura 9), no impidió la sensibilización de las células MDA-MB468 a la apoptosis por TRAIL. Por tanto, estos resultados sugieren que el aumento de TRAIL-R2 tras la privación de glutamina es prescindible para la sensibilización a TRAIL en células TNBC.

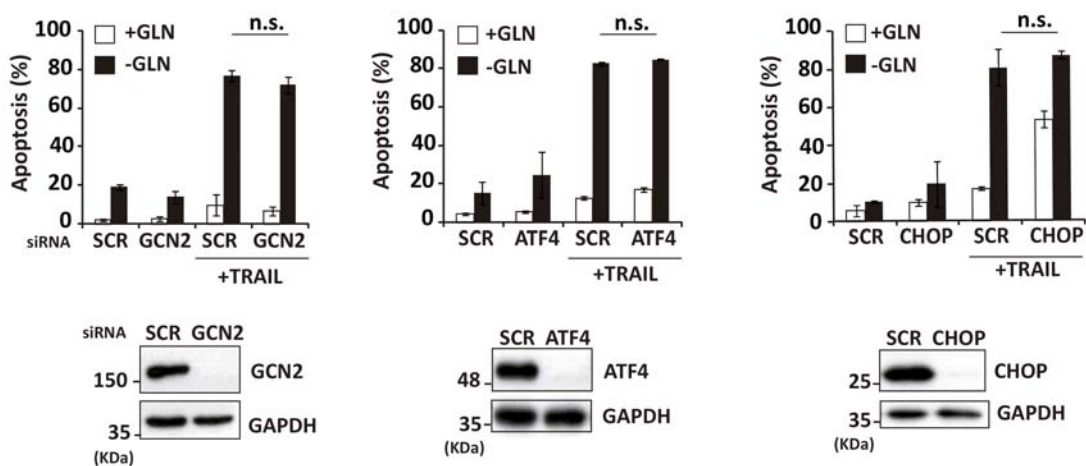


Figura 10 | El silenciamiento de los componentes de la ruta GCN2/ATF4/CHOP no afectan a la sensibilización a TRAIL inducida por la privación de glutamina. Las células MDA-MB468 se transfectaron con el oligo control (SCR) o los oligos de siRNA frente a GCN2, ATF4 o CHOP durante 30 horas. Tras esto las células se incubaron en un medio con o sin glutamina durante 24 horas y posteriormente en presencia o ausencia de TRAIL (100 ng/ml) durante 24 horas. Los niveles de GCN2, ATF4 y CHOP se determinaron por Western blot usando GAPDH como control de carga. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. n.s. no significativo estadísticamente.

1.4. La modulación de los niveles de FLIP por la glutamina regula la sensibilidad a TRAIL de las células TNBC.

Las proteínas antiapoptóticas FLIP(L) y FLIP(S) son reguladores claves de la señalización de TRAIL (Irmiler et al. 1997). Como se mostró en el primer apartado (Figura 5), en las células TNBC se produce una disminución de ambas proteínas después del tratamiento de privación de glutamina. Esto no ocurre en células no TNBC. Para demostrar la importancia de la pérdida de estas proteínas en la sensibilidad a TRAIL tras privación de glutamina silenciamos ambas formas en células MDA-MB468 y T47D con un ARN de interferencia antes del tratamiento con TRAIL. Observamos que el silenciamiento de ambas isoformas sensibilizaba notablemente a las dos líneas celulares a TRAIL (Figura 11).

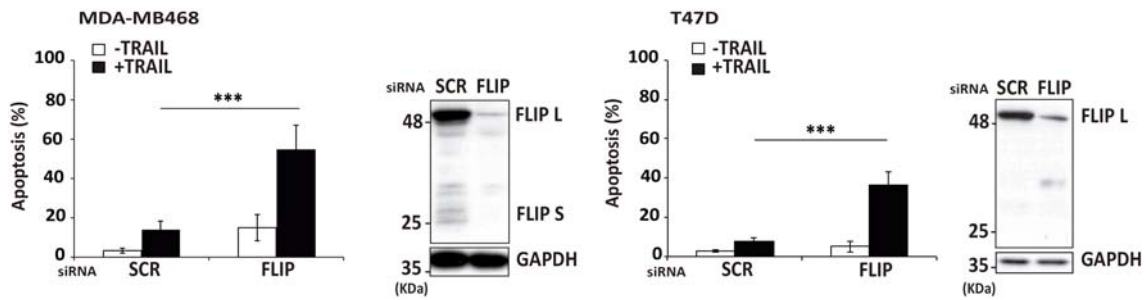


Figura 11 | El silenciamiento de la expresión de FLIP sensibiliza tanto a las células MDA-MB468 como a las células T47D a la apoptosis inducida por TRAIL. Las células fueron transfectadas con un oligo ARN control (SCR) o con un oligo de siRNA contra las dos isoformas de FLIP durante 30 horas. Tras esta incubación las células se trataron con TRAIL (100ng/ml MDA-MB468, 500ng/ml T47D). La apoptosis se determinó como el porcentaje de células hipodiploides por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. ***p<0,001. Los niveles proteicos de FLIP se determinaron mediante Western blot.

Para confirmar la importancia del descenso de los niveles de FLIP en la sensibilización a TRAIL por privación de glutamina, generamos mediante infección con un vector lentiviral células MDA-MB231 que sobreexpresaban FLIP(L). De esta manera los niveles de FLIP(L) se mantuvieron elevados a pesar del tratamiento de privación de glutamina (Figura 12A). Previamente habíamos observado que en esta línea celular TNBC también se producía una disminución en los niveles de las dos isoformas de FLIP tras privación de glutamina como se puede ver en la figura 12B. En este modelo celular llevamos a cabo los experimentos de privación de glutamina y el posterior tratamiento con TRAIL. Como se puede observar en la figura 12C, las células MDA-MB231 que sobreexpresaban FLIP(L) fueron marcadamente resistentes a la sensibilización a TRAIL inducida por privación de glutamina.

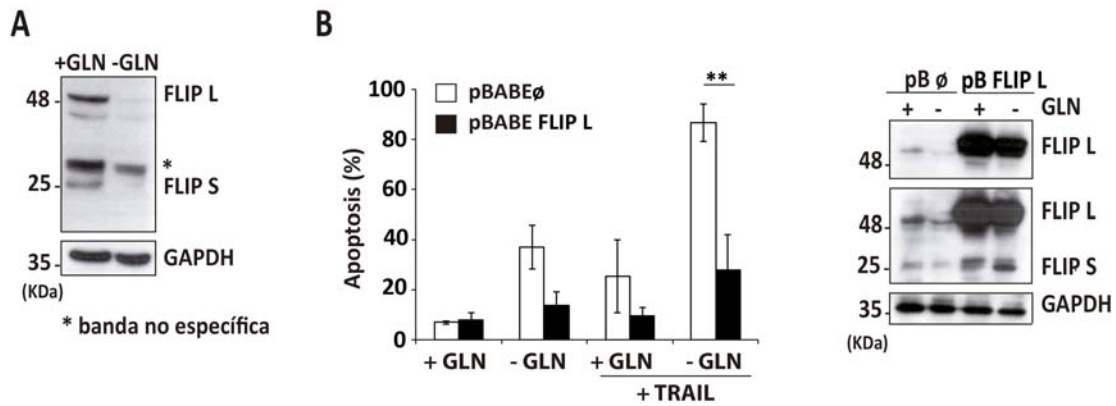


Figura 12 | La sobreexpresión de FLIP en células MDA-MB231 previene la muerte por TRAIL tras privación de glutamina. (A) Los niveles de proteínas de las dos isoformas de FLIP se determinaron mediante Western blot tras el tratamiento de 24 horas de privación de glutamina en células MDA-MB231. GAPDH se utilizó como control de carga de proteínas. (B) Las células MDA-MB231 que sobreexpresaban FLIP (pBABE FLIP L) y células control (pBABE ∅) fueron cultivadas en un medio con o sin glutamina durante 24 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o presencia de TRAIL durante 24 horas más. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores (+/- SD) de al menos tres experimentos independientes. ** p<0,01. Los niveles proteicos de FLIP se determinaron mediante Western blot.

Una vez demostrada la importancia de FLIP en el control de la sensibilización a TRAIL por privación de glutamina en el medio extracelular, se llevó a cabo el estudio del mecanismo de regulación de los niveles de FLIP en estas condiciones de estrés metabólico. La ruta de señalización de GCN2 se activa ante la falta de aminoácidos a través de la unión de ARNs de transferencia a GCN2. Al igual que con otras quinasas de eIF2 α , la activación de GCN2 conduce a la inhibición severa de la síntesis global de proteínas al tiempo que permite la traducción de ciertos ARNm regulados por estrés para restaurar la homeostasis. Para seguir caracterizando el mecanismo detrás de la regulación de FLIP por la privación de glutamina, evaluamos el papel de la ruta GCN2/ATF4/CHOP en la bajada de los niveles de FLIP en las células MDA-MB468. Para ello, silenciamos algunos componentes esenciales de la ruta y determinamos los niveles proteicos de FLIP. Observamos que el descenso de los niveles de FLIP no se veía afectado por el silenciamiento de la expresión de estas proteínas (Fig. 13) Este dato, junto con los resultados obtenidos anteriormente sugería que la activación de la quinasa GCN2 no estaba implicada en la sensibilización de las células TNBC a TRAIL después de privación de glutamina.

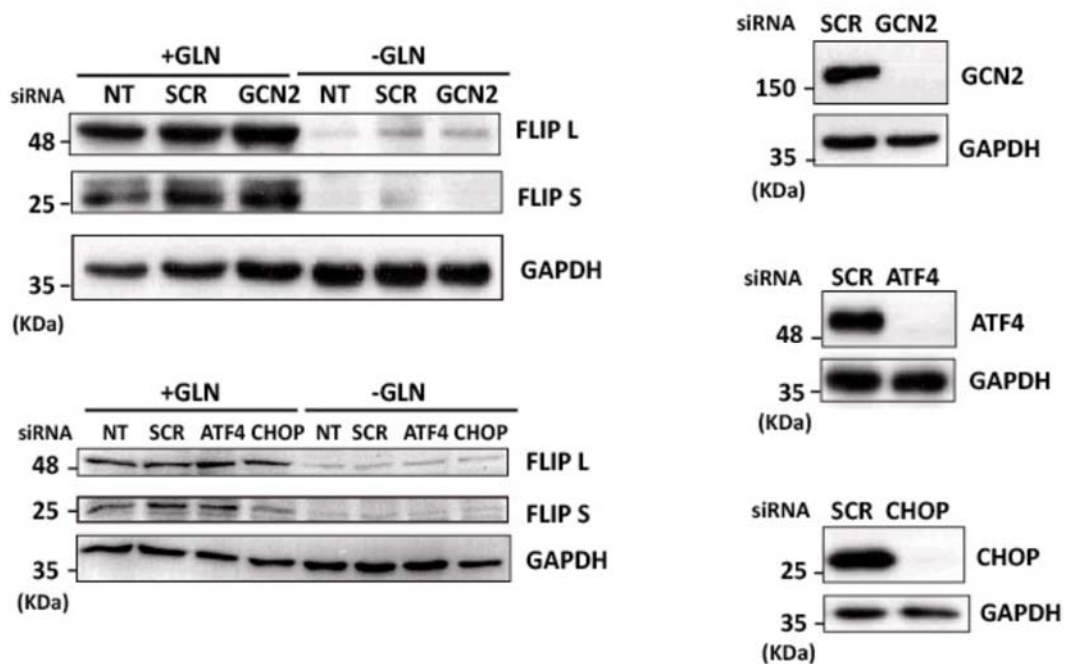


Figura 13 | La ruta de GCN2/ATF4/CHOP no regula los niveles de FLIP. Las células MDA-MB468 se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia control (SCR) y frente a PERK, GCN2, ATF4 y CHOP o no fueron transfectadas (NT) durante 30 horas, tras esto se incubaron en presencia o ausencia de glutamina durante 24 horas. Se recogieron las células y se determinaron los niveles de proteínas por Western blot. GAPDH se utilizó como control de carga.

También examinamos el papel de mTORC1, otro sensor importante de la disponibilidad de glutamina en células de mamífero (Nicklin et al. 2009), en la regulación de FLIP y la sensibilidad a TRAIL en células MDA-MB468 sometidas a privación de glutamina. Como se muestra en la figura 14A, el descenso de los niveles de FLIP tras privación de glutamina va acompañada de una inhibición de mTORC1 como se puede observar por la pérdida de fosforilación de los sustratos de mTORC1 p70S6K y 4EBP1. Sin embargo, el tratamiento de las células TNBC con el inhibidor de mTORC1/ mTORC2 Torina-1 no redujo los niveles de FLIP (Figura 14A) ni sensibilizó a estas células a la apoptosis inducida por TRAIL (Figura 14B). Del mismo modo, la inhibición de mTORC1 por la rapamicina no dió lugar a la sensibilización de estas células a TRAIL (Figura 14B) En conjunto, estos datos indican que la inhibición de mTORC1 no es responsable de la sensibilización a TRAIL en células TNBC privadas de glutamina.

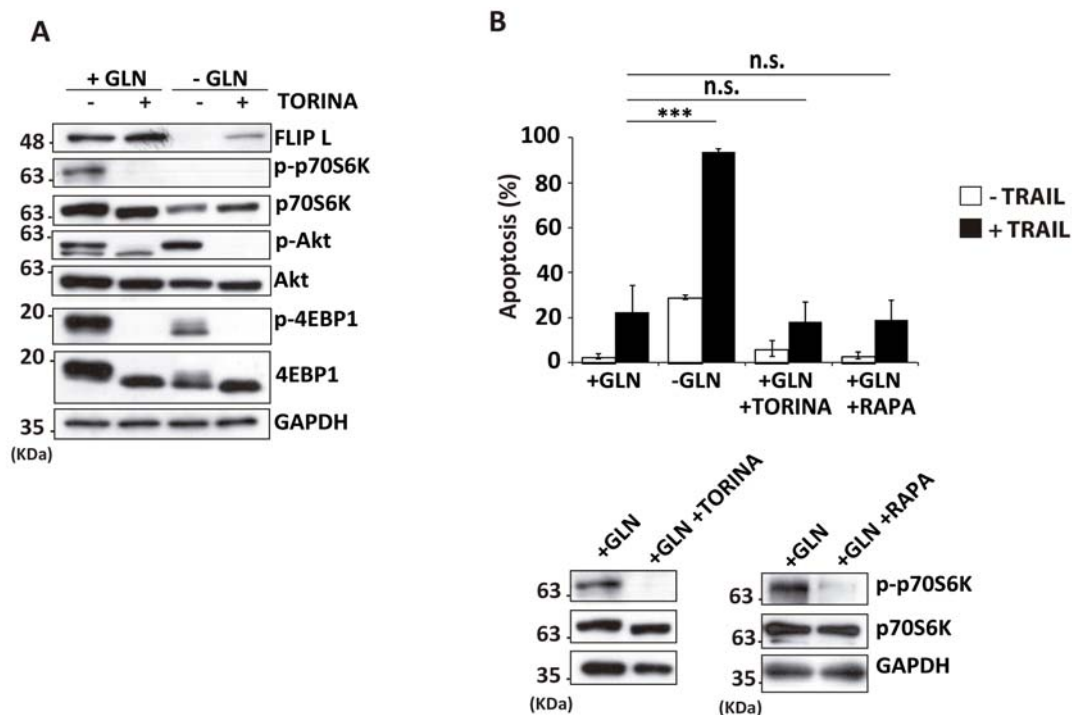


Figura 14 | Papel de mTOR en la regulación de los niveles de FLIP y la sensibilidad a TRAIL. (A) Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con o sin glutamina y en presencia o ausencia de torina-1 (250 nM) durante 24 horas. Los niveles de proteínas se detectaron por Western blot utilizando GAPDH como control de carga. (B) Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con glutamina (+GLN), sin glutamina (-GLN), con glutamina y torina-1 (+GLN +Torina) y con glutamina y rapamicina (500nM) (+GLN +Rapa) durante 24 horas antes del tratamiento en presencia o ausencia de TRAIL (100ng/ml). La apoptosis se midió como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$, n.s. no significativo estadísticamente.

Para seguir investigando el mecanismo implicado en la reducción de los niveles celulares de las proteínas anti-apoptóticas FLIP(L) y FLIP(S) en células privadas de glutamina, comenzamos analizando la cinética de reducción de la expresión de ambas isoformas de FLIP en células MDA-MB468 en condiciones de privación de glutamina. Se observó una bajada de los niveles de FLIP a las 3 horas en ausencia de glutamina y una desaparición casi completa de ambas isoformas a las 16 horas (Figura 15A). A continuación, analizamos si esta reducción en los niveles de proteínas FLIP se observaba también en los ARNm correspondientes, para lo cual realizamos ensayos de qPCR de los ARNm de FLIP en células MDA-MB468 tras 24 horas de cultivo en presencia o ausencia de glutamina. En contraste a la bajada de niveles de proteínas FLIP

observada tras la incubación de las células en un medio libre de glutamina, en el caso del ARNm no se observó una reducción sino un aumento bajo estas condiciones de cultivo. (Figura 15B). Como ambas isoformas son proteínas de vida media corta sujetas a ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Fukazawa et al. 2001) (Palacios, Yerbes, & López-Rivas 2006) (Zhang et al. 1999), determinamos si la privación de glutamina podría disminuir la vida media de las isoformas de FLIP en células MDA-MB468. Sin embargo, como se muestra en la figura 15C, la estabilidad de ambas isoformas no se ve afectada por la eliminación de la glutamina del medio de cultivo.

Dado que ni los niveles de ARNm ni la vida media de FLIP se redujeron tras la privación de glutamina, decidimos determinar si la síntesis global de proteínas estaba inhibida tras el tratamiento de privación de glutamina y, como consecuencia, los niveles de FLIP se verían también reducidos. Los datos obtenidos mostraban que la síntesis de proteínas disminuye drásticamente desde las 3 horas de incubación en un medio sin glutamina (Figura 15D), lo que además se correlaciona con la cinética de bajada de los niveles de proteína de FLIP (Figura 15A).

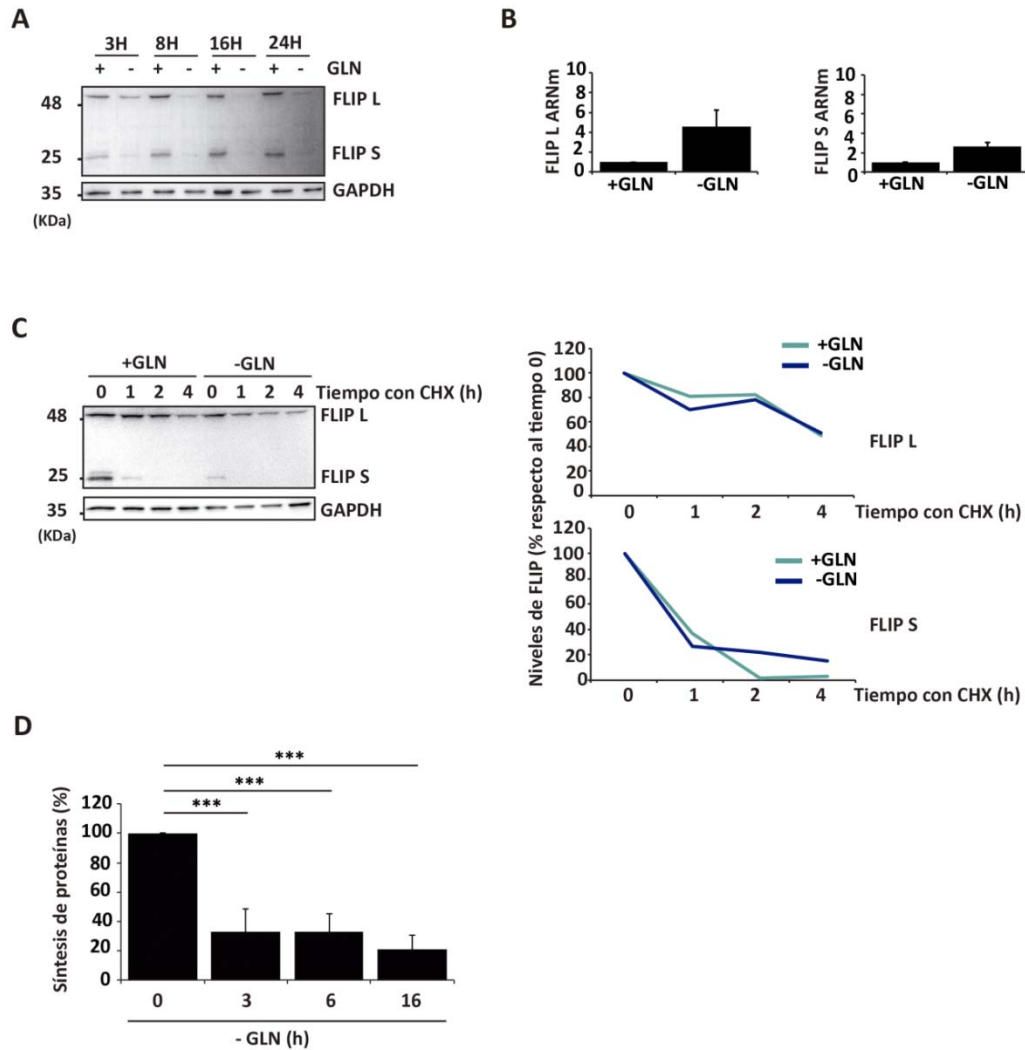


Figura 15 | La reducción en los niveles de FLIP correlaciona con la inhibición global de la síntesis de proteínas debida a la privación de glutamina. (A) Las células MDA-MB468 fueron incubadas en presencia o ausencia de glutamina durante los tiempos indicados, tras lo cual se recogieron las células y se analizaron los niveles de FLIP mediante Western blot y se cuantificaron respecto al control de carga GAPDH. (B) Las células se incubaron con o sin glutamina durante 24 horas y se determinaron los niveles de ARNm de FLIP(L) y FLIP(S) mediante una qPCR. (C) Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con o sin glutamina durante 3 horas antes de añadir cicloheximida (CHX, 5µg/ml) e incubación durante los tiempos indicados. Los niveles de FLIP se determinaron mediante Western blot. GAPDH fue usado como control de carga de proteínas. (D) La síntesis global de proteínas se determinó en células MDA-MB468 después de la privación de glutamina durante los tiempos indicados, como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. *** p<0,001.

CAPÍTULO SEGUNDO: Papel del metabolismo de la glutamina en el control de la sensibilidad a TRAIL de células tumorales triple negativas de mama.

2.1. Control de la sensibilidad a TRAIL en células TNBC por el metabolismo citosólico de la glutamina

Las alteraciones metabólicas en las células tumorales así como en las células que forman el estroma tumoral es uno de los temas de mayor interés actual en la investigación sobre el cáncer (Hanahan & Weinberg 2011). Además, las posibles vulnerabilidades derivadas de estas alteraciones está siendo objeto de numerosos trabajos encaminados a definir nuevas dianas terapéuticas frente al cáncer (Luengo, Gui, & Vander Heiden 2017). La elevada proliferación de las células tumorales hace que estas tengan unos requerimientos bioenergéticos y de síntesis de moléculas más altos por lo que el consumo de nutrientes y diversas rutas metabólicas están alteradas en estas células. Estudios recientes muestran como las células tumorales utilizan, además de la glucosa, fuentes alternativas de energía y precursores para la síntesis de nucleótidos, lípidos y proteínas como por ejemplo, la glutamina, para satisfacer las demandas metabólicas derivadas de su elevada proliferación (DeBerardinis and Cheng 2010)(Medina et al. 1992). Por este motivo, el metabolismo de la glutamina se ha convertido en una diana para posibles tratamientos antitumorales. A este respecto, se han propuesto diversos enfoques terapéuticos como la reducción de glutamina en sangre, el bloqueo de su transporte al interior de las células tumorales o la inhibición de enzimas implicadas en la síntesis de la glutamina o en su catabolismo (Altman, Stine, & Dang 2016).

El catabolismo de la glutamina comienza con su conversión en glutamato en reacciones que producen la transferencia del grupo amino gamma de la glutamina para la síntesis de nucleótidos y hexosaminas o mediante reacciones catalizadas por glutaminasas (GLS) en la mitocondria que liberan amonio (Hensley, Wasti, & Deberardinis 2013). El glutamato puede, por una parte, dar lugar a glutatión, uno de los antioxidantes celulares principales (Lu 2009), o convertirse en α -cetoglutarato (α -KG) por deaminación oxidativa a través de la glutamato deshidrogenasa (GDH) en la mitocondria o por transaminación, produciendo aminoácidos no esenciales, tanto en el citosol como en la mitocondria (Zhang, Pavlova, & Thompson 2017). A su vez, el α -KG puede entrar en el ciclo de Krebs o participar en diversos procesos como sustrato de dioxigenasas que modifican diversas proteínas o el ADN y en señalización celular (Xiao et al. 2016). Se han identificado diversos inhibidores para cada uno de estos pasos del metabolismo de la glutamina (Altman, Stine, & Dang 2016).

Una vez descartado el papel de la ruta de GCN2/ATF4/CHOP así como mTORC1 en el mecanismo de sensibilización a TRAIL tras privación de glutamina, decidimos estudiar el papel del metabolismo de la glutamina como regulador de la señalización apoptótica del receptor TRAIL-R2 de TRAIL. Como hemos mencionado, la conversión de glutamina a glutamato puede aportar nitrógeno para la formación de nucleótidos y hexosaminas, por lo que la privación de glutamina podría estar inhibiendo la síntesis de estos compuestos, permitiendo la apoptosis de las células TNBC tras la adición de TRAIL (Evans, Jones, & Ziegler 2005) Por ello, incubamos a las células MDA-MB468 en medio sin glutamina en la presencia de nucleósidos o glucosamina como precursores en la síntesis de nucleótidos o hexosaminas, respectivamente. Tras esta incubación, las células fueron tratadas con TRAIL para analizar el proceso de sensibilización. Sin embargo, como se puede observar en la figura 16, ninguna de las adiciones previno la sensibilización a TRAIL por privación de glutamina. Además, en los experimentos con glucosamina observamos que esta adición facilitaba la apoptosis por TRAIL, incluso en el medio con glutamina (Fig. 16).

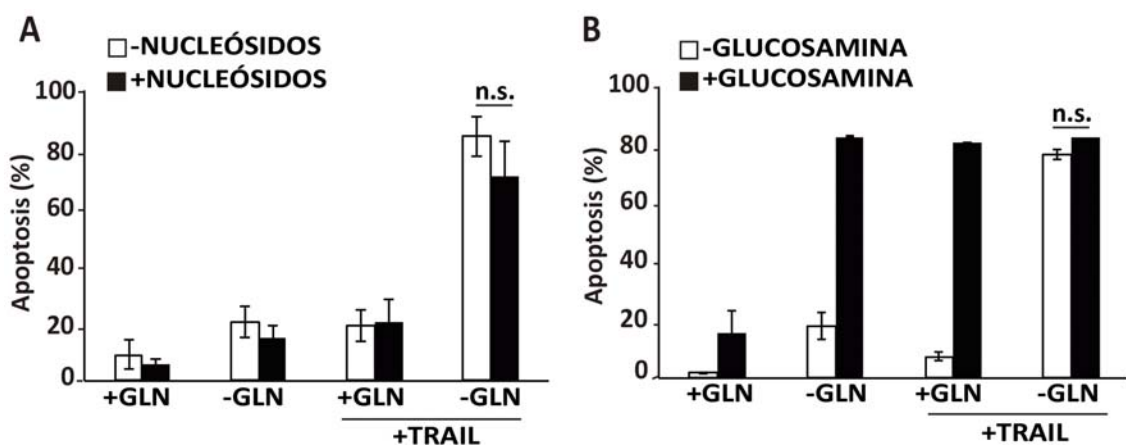


Figura 16 | Papel de las rutas de síntesis de las hexosaminas y de los nucleótidos en la sensibilidad a TRAIL. Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con o sin glutamina y en presencia o ausencia de (A) una solución de nucleósidos 1X o (B) de glucosamina (20mM) durante 24 horas. Tras esto se trató a las células en presencia o ausencia de TRAIL (100ng/ml). La apoptosis se midió como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. n.s. no significativo estadísticamente.

Por otra parte, dado que el metabolismo de la glutamina produce glutamato y éste participa en la síntesis de glutatión, analizamos también el posible papel de los niveles celulares de glutatión y, por lo tanto, de especies reactivas de oxígeno en la sensibilización a TRAIL tras incubación en

medio sin glutamina. Para ello, las células fueron privadas de glutamina en ausencia o presencia del antioxidante N-acetilcisteína (NAC), utilizado con frecuencia en estudios para determinar la implicación de especies reactivas de oxígeno en procesos de señalización de muerte celular. En estos experimentos, observamos que este antioxidante inhibía significativamente la sensibilización a TRAIL (Fig. 17). Sin embargo, a pesar de la inhibición de la sensibilización a TRAIL, la adición de NAC no prevenía los cambios inducidos por la privación de glutamina en los niveles de TRAIL-R2 y de FLIP en las células MDA-MB468 (Figura 17).

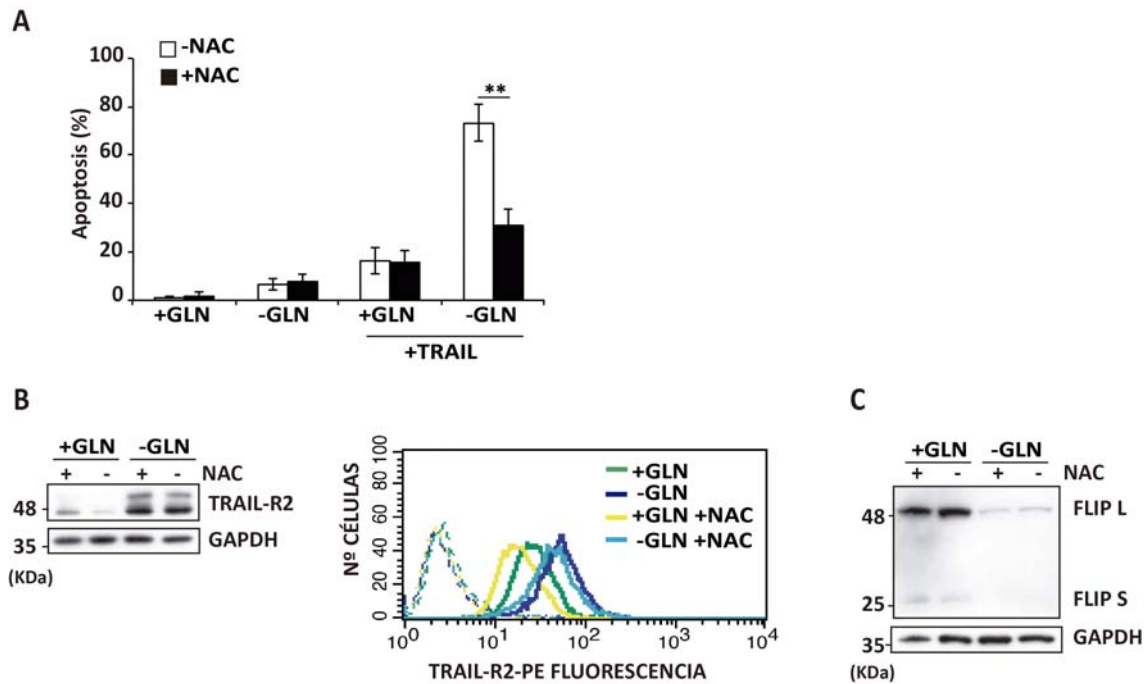


Figura 17 | NAC previene la sensibilización a TRAIL pero no el aumento de TRAIL-R2 ni el descenso de los niveles celulares de FLIP en células privadas de glutamina. Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con o sin glutamina y en presencia o ausencia de NAC (10 mM) durante 24 horas. Tras esta incubación (A) las células se trataron en presencia o ausencia de TRAIL (100ng/ml) y se determinó la apoptosis mediante citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. ** p<0,01. En (B) se determinaron los niveles de proteína de TRAIL-R2 por Western blot y los niveles en superficie celular por citometría como se describe en Material y Métodos. (C) Se analizaron los niveles de FLIP por Western blot. GAPDH fue utilizado como control de carga.

2.2. La inhibición farmacológica y genética del metabolismo de la glutamina baja los niveles de FLIP y sensibilizan a TRAIL a las células TNBC.

La observación de que las rutas metabólicas analizadas no estaban implicadas en el control de los niveles de FLIP, el principal determinante de la sensibilidad a TRAIL en las células TNBC y no TNBC (Fig. 11), y dado que gran parte del catabolismo de la glutamina conduce a la formación de glutamato y este, a su vez produce α -KG, determinamos el efecto que la adición del análogo permeable del α -KG, dimetil-alfa-cetoglutarato (DM- α -KG), tenía en el control de los niveles de FLIP y la sensibilización a TRAIL en células MDA-MB468 privadas de glutamina. Como se muestra en la figura 18, la adición de α -KG al medio de cultivo carente de glutamina previno significativamente tanto la reducción de los niveles de FLIP (Figura 18A) como la sensibilización a la apoptosis por TRAIL (Figura 18B).

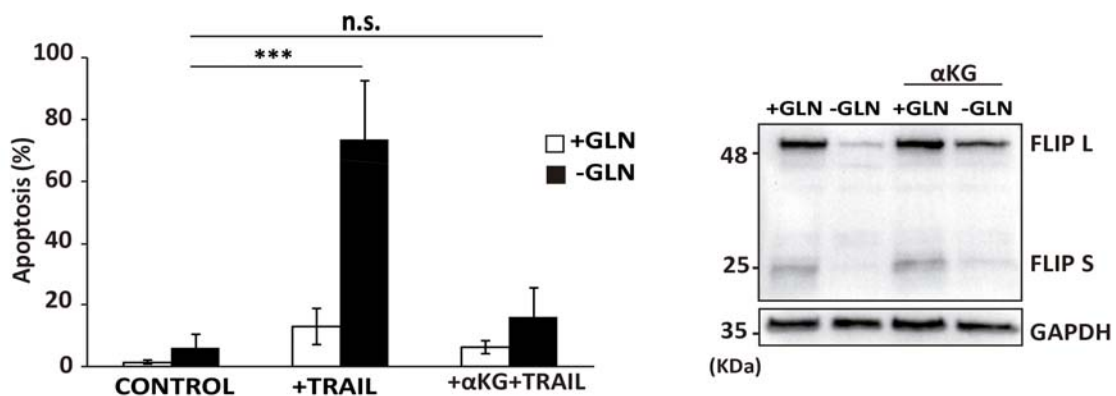


Figura 18 | Papel del α -KG en la sensibilidad a TRAIL. Las células MDA-MB468 fueron cultivadas en medio con o sin glutamina y en presencia o ausencia de α -KG (5 mM) durante 24 horas y se trataron con TRAIL (100 ng/ml) durante 24 horas antes de determinar la apoptosis por citometría de flujo. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$, n.s. no significativo estadísticamente. Se analizaron los niveles de FLIP por Western blot usando GAPDH como control de carga.

Como indicamos anteriormente, la conversión de glutamina en glutamato puede tener lugar a través de la acción de glutaminasas, codificadas en humanos por los genes GLS y GLS2 (Curthoys 1995), Particularmente, la actividad de las isoenzimas GLS correlaciona estrechamente con el crecimiento y la malignidad en tumores y su silenciamiento o inhibición farmacológica retrasa la progresión tumoral (J. Wang et al. 2010). En este sentido, las células TNBC son dependientes de la glutamina y muestran altos grados de expresión de la GLS (Kung, Marks, & Chi 2011). Partiendo de estos datos, llevamos a cabo experimentos para silenciar su expresión o inhibir su

actividad y determinar sus efectos en la resistencia de estas células a TRAIL. Como se muestra en la figura 19A, el silenciamiento de la expresión de GLS con dos oligonucleótidos de siRNA diferentes no resultó en un aumento significativo en la sensibilidad de células MDA-MB468 a TRAIL. Del mismo modo, la incubación de estas células en presencia de los inhibidores de GLS BPTES o 968 en medio con glutamina ni redujo los niveles de proteínas FLIP ni sensibilizó a las células de manera significativa a la apoptosis inducida por TRAIL (Fig. 19B).

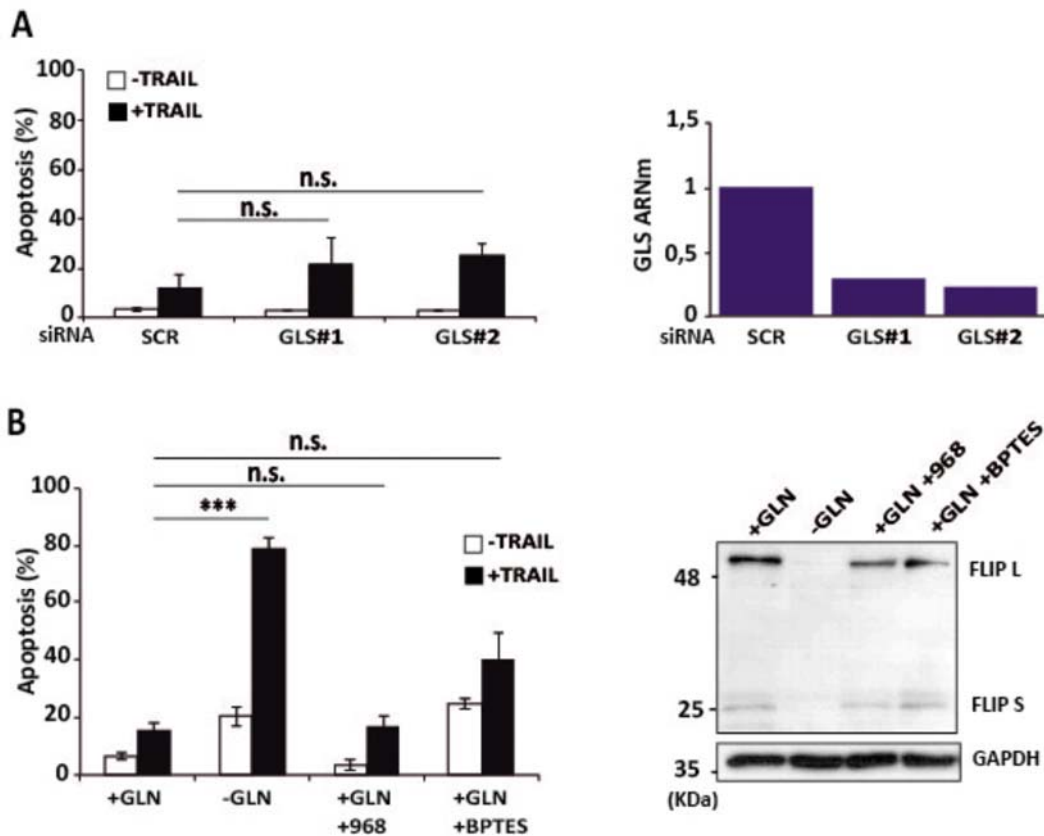


Figura 19 | Efecto del silenciamiento de GLS o la inhibición de la actividad glutaminasa en la sensibilidad a TRAIL. (A) Las células MDA-MB468 se transfectaron bien con un oligonucleótido de RNA control o con dos oligos diferentes de siRNA de GLS durante 30 horas. Tras esta incubación las células se trataron en presencia o ausencia de TRAIL durante 24 horas. Para determinar el grado de silenciamiento se midieron los niveles de ARNm de GLS por RT-qPCR. (B) Las células MDA-MB468 fueron incubadas en presencia o ausencia de los inhibidores 968 (10 μ M) o BPTES (20 μ M) durante 24 horas antes del tratamiento con TRAIL (100ng/ml) Se determinaron los niveles de proteínas de FLIP por Western blot. GAPDH se utilizó como control de carga. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. *** p<0,01, n.s. no significativo estadísticamente.

Como hemos indicado, además de la glutaminólisis catalizada por las glutaminasas mitocondriales, otras rutas metabólicas como la biosíntesis de nucleótidos y la síntesis de hexosaminas, utilizan la glutamina como donador de grupos amino, generando glutamato. Aunque, como se ha demostrado anteriormente en esta tesis, la producción de intermediarios de estas rutas metabólicas no parece ser relevante en la regulación de la sensibilidad a TRAIL en células TNBC, la inhibición de la producción de glutamato y consecuentemente de la generación de α -KG a través de estas vías metabólicas podría desempeñar un papel en la sensibilización a la apoptosis por TRAIL. Para responder a estas cuestiones se llevaron a cabo experimentos con análogos de la glutamina como la acivicina y el DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleucina) que inhiben la conversión de glutamina en glutamato (Ahluwalia et al. 1990). Con ambos inhibidores se observó la sensibilización a TRAIL en presencia de glutamina en el medio de cultivo, acompañada de la reducción en los niveles de FLIP, comparable a la del tratamiento con privación de glutamina (Figura 20A y 20B). De nuevo, la presencia en el medio de cultivo de intermediarios de la ruta de las pirimidinas y purinas como la inosina y el orotato, no inhibieron la sensibilización observada a TRAIL. Estos resultados sugerían que la inhibición de la producción de glutamato a través de estas rutas citosólicas podría ser la responsable de la sensibilización inducida por estos inhibidores del metabolismo de la glutamina.

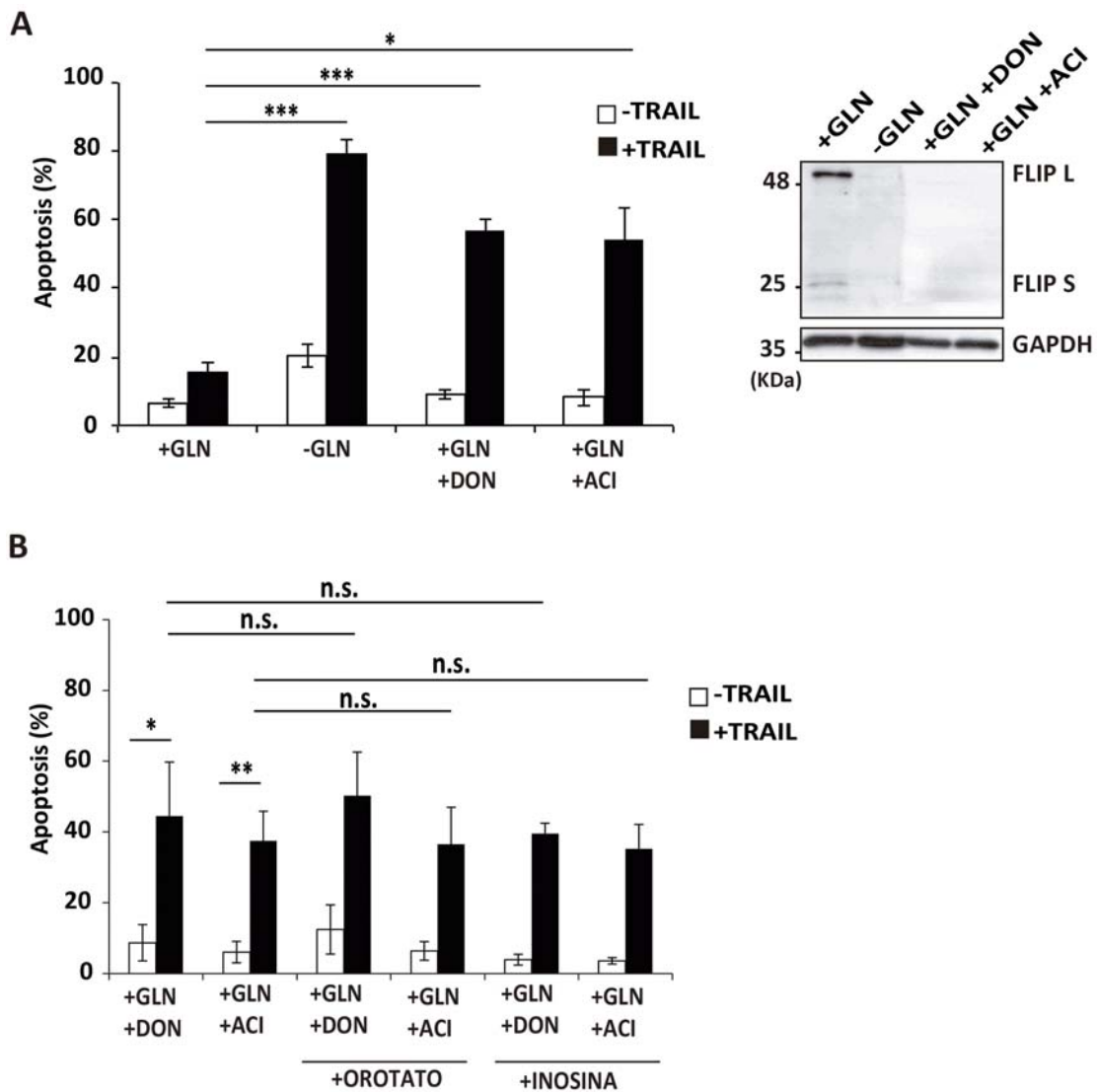


Figura 20 | Efecto de la inhibición de la formación de glutamato en la sensibilización a TRAIL. (A) Las células MDA-MB468 fueron incubadas en presencia o ausencia de los inhibidores DON (50 μ M) o Acivicina (450 μ M) durante 24 horas antes del tratamiento con TRAIL (100ng/ml) Se determinaron los niveles de proteínas de FLIP por Western blot. GAPDH se utilizó como control de carga. (B) Las células MDA-MB468 fueron incubadas en presencia o ausencia de los inhibidores DON o Acivicina y con inosina (2,5mM) o orotato (2,5mM) durante 24 horas antes del tratamiento con TRAIL (100ng/ml) La apoptosis se midió como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $< 0,01$, *** $p < 0,001$, n.s. no significativo estadísticamente.

2.3. La inhibición farmacológica y genética de transaminasas reduce los niveles de FLIP y sensibilizan a TRAIL a las células TNBC.

Los resultados presentados en esta tesis indican que la ruta anaplerótica del metabolismo de la glutamina tiene un papel regulador de la sensibilidad a TRAIL en células TNBC (Fig. 18 y 20). En esta ruta, la conversión de glutamato en α -KG puede ser catalizada tanto por transaminasas, que se encuentran tanto en el citosol como en la mitocondria, como por la glutamato deshidrogenasa (GDH) mitocondrial. Para determinar la ruta metabólica responsable de controlar la sensibilidad a TRAIL en células TNBC, utilizamos aminoxiacetato (AOA), inhibidor específico de las transaminasas, y el galato epigallocatequina (EGCG), como inhibidor de la GDH. Tras el tratamiento de las células MDA-MB468 con estos inhibidores observamos que el AOA sensibilizaba a las células a TRAIL mientras que el EGCG no producía ningún efecto (Figura 21A). Además, como se muestra en la figura 21B el AOA también aumentó la sensibilidad a TRAIL en otras líneas celulares TNBC pero no en las células de las líneas no TNBC.

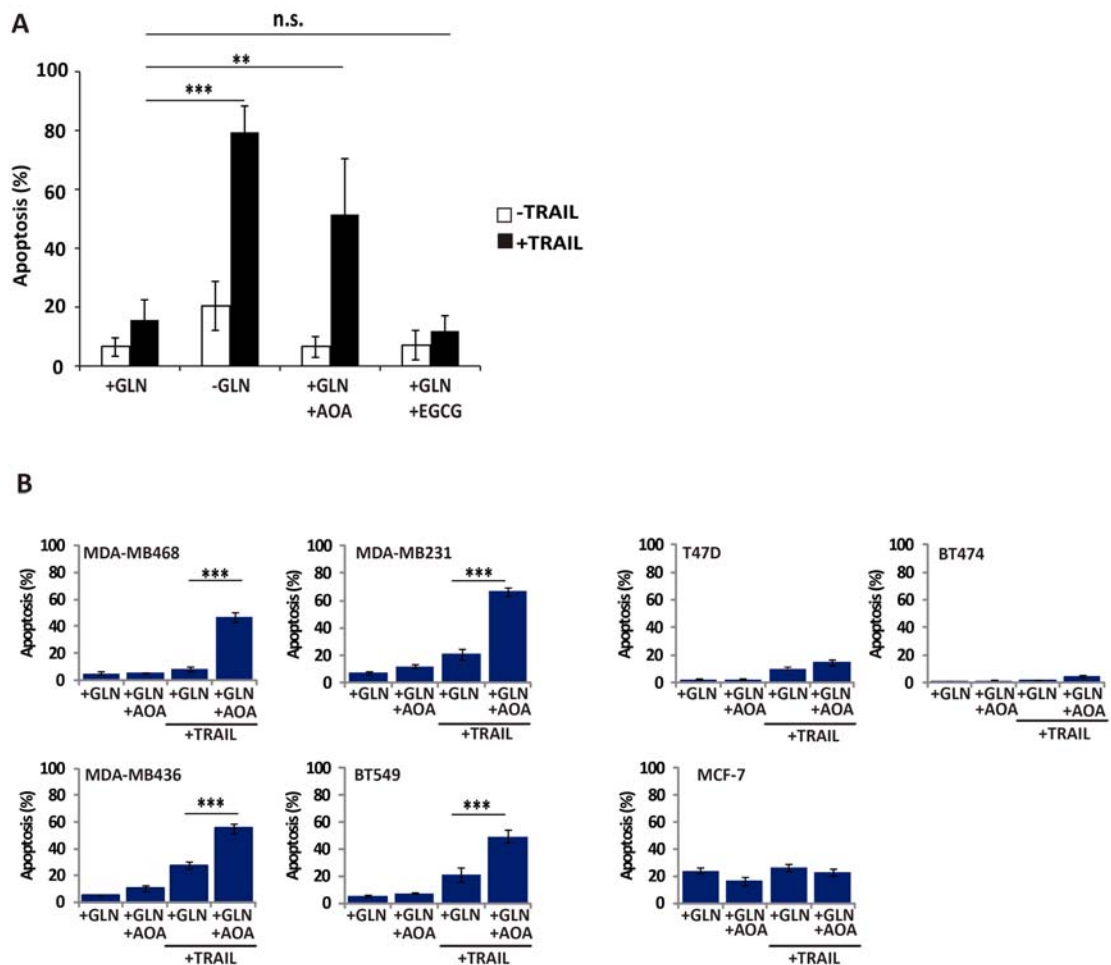


Figura 21 | Efecto de la inhibición farmacológica de las transaminasas en la sensibilización a TRAIL. (A) Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con glutamina en presencia o ausencia de los inhibidores AOA (1mM) o EGCG (50µM) durante 24 horas antes del tratamiento con TRAIL (100ng/ml) durante 24 horas. En (B) las células TNBC y las células no TNBC fueron incubadas 24 horas con o sin AOA en presencia de glutamina, tras esto se trataron con TRAIL durante 24 horas (100ng/ml MDA-MB468, 50ng/ml MDA-MB231, 10ng/ml MDA-MB436, 100ng/ml BT549, 500ng/ml líneas no TNBC) La apoptosis se determinó como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. ** p<0,01, *** p<0,001, n.s. no significativo estadísticamente.

Para confirmar la participación de las transaminasas en la regulación de la sensibilización a TRAIL de las células TNBC, llevamos a cabo la inhibición genética de diferentes transaminasas utilizando ARN de interferencia en células MDA-MB468. En la figura 22A se puede ver que el silenciamiento de la transaminasa glutámico-oxalacética 1 (GOT1), una forma citoplasmática que transfiere nitrógenos del glutamato al oxalacetato (OAA) para producir aspartato y α KG, resulta en una significativa sensibilización a TRAIL en estas células. Este resultado se confirmó utilizando tres secuencias diferentes de GOT1. Por el contrario, el silenciamiento de las transaminasas mitocondriales, la transaminasa glutámico-oxalacética 2 (GOT2) y la transaminasa glutámico-pirúvica 2 (GPT2) no sensibilizaron a TRAIL a las células TNBC (Figura 22A). Además, la sensibilización de estas células a la apoptosis inducida por TRAIL tras el silenciamiento de GOT1 estuvo precedida por el descenso de los niveles de FLIP y el aumento de expresión del receptor TRAIL-R2 (Figura 22B).

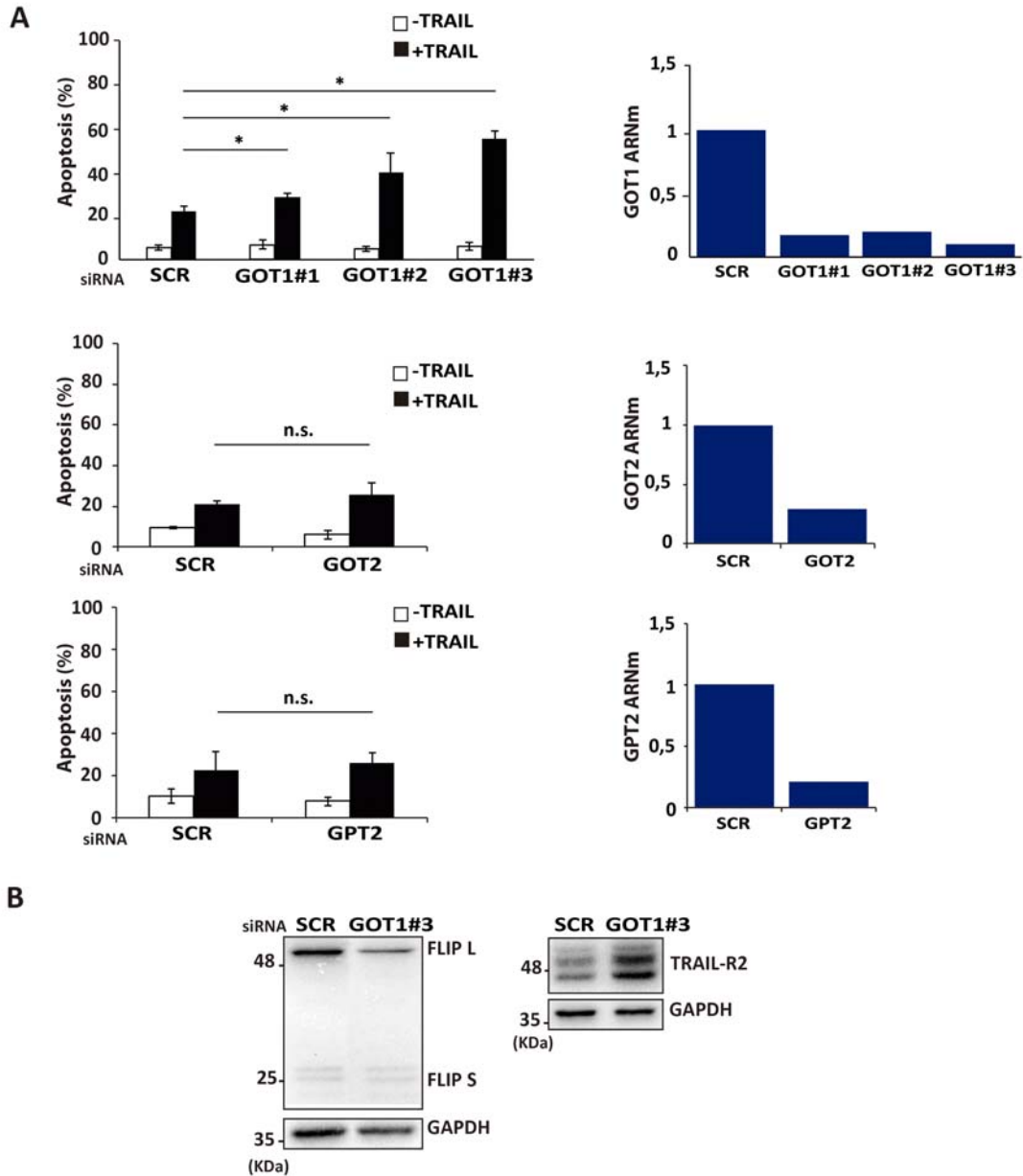


Figura 22 | La inhibición genética de GOT1 baja los niveles de FLIP y sensibiliza a las células TNBC a TRAIL. (A) Las células MDA-MB468 se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia control, frente a tres secuencias diferentes de GOT1, GOT2 y GPT2 durante 30 horas, tras esto las células se incubaron en presencia o ausencia de TRAIL durante 24 horas. Para determinar el grado de silenciamiento se midieron los niveles de ARNm de transaminasas por RT-qPCR. La apoptosis se determinó como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, n.s. no significativo estadísticamente. (B) Las células MDA-MB468 se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia control o frente a GOT1 durante 30 horas. Los niveles de FLIP y TRAIL-R2 fueron determinados por Western blot. GAPDH se utilizó como control de carga.

Como se ha indicado anteriormente, el paso de glutamato a α -KG catalizado por las transaminasas permite la formación de aminoácidos no esenciales (NEAA). Por esta razón, analizamos el efecto que la suplementación del medio de cultivo con NEAA tenía sobre la sensibilización observada en los tratamientos con el AOA y TRAIL. Como se muestra en la figura 23, la adición de NEAA prevenía completamente el efecto de sensibilización a TRAIL del AOA (Fig. 23A), lo que indica un papel de la biosíntesis de NEAA en la regulación de la sensibilidad a TRAIL en las células TNBC. A continuación, estudiamos el mecanismo que subyace a la sensibilización a TRAIL mediada por AOA. Para ello determinamos los niveles de TRAIL-R2 y FLIP en células tratadas con AOA. Como se puede ver en la figura 23B, el tratamiento con AOA indujo un aumento de los niveles de TRAIL-R2 tanto a nivel de proteína como en la superficie celular así como un descenso importante en los niveles celulares de FLIP. Esta disminución en los niveles de FLIP no se observó al incubar las células en presencia del inhibidor EGCG de la GDH (Fig. 23B). Estos resultados sugieren que la inhibición de la biosíntesis de NEAA mediada por transaminasas en células TNBC puede activar una respuesta a estrés que conduce a la regulación positiva de TRAIL-R2. Esta hipótesis se confirmó al observar que la adición de NEAA al medio cultivo inhibió completamente la inducción de ATF4, CHOP y TRAIL-R2 provocada por el tratamiento con AOA (Figura 23C). En cuanto a la reducción de los niveles de FLIP, es importante destacar que la suplementación con NEAA previno completamente la inhibición en la síntesis de proteínas y la regulación negativa de FLIP inducidas por AOA (Figura 23D), lo que apoyaba el papel de la biosíntesis de NEAA en el control de la síntesis global de proteínas y por tanto de los niveles de FLIP en células TNBC.

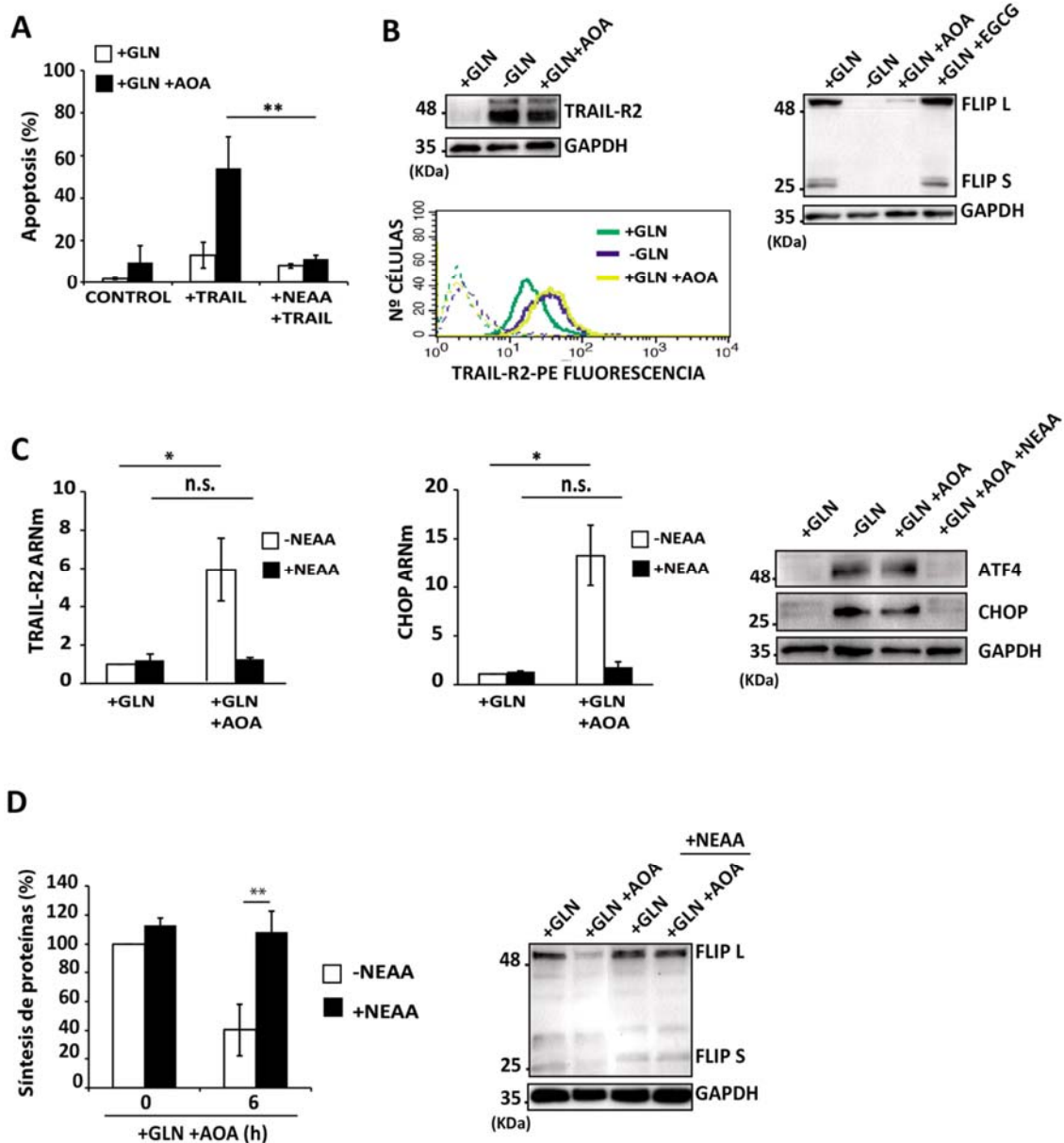


Figura 23 | La adición de NEAA revierte el efecto sobre la sensibilización a TRAIL de la inhibición de las transaminasas. Las células MDA-MB468 fueron tratadas durante 24 horas con los inhibidores AOA o EGCG en presencia de glutamina y, en los casos indicados, se añadió una mezcla de NEAA (solución 1X) al medio de cultivo. (A) Tras el tratamiento se incubaron las células en presencia o ausencia de TRAIL (100ng/ml). La apoptosis se midió como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. (B) Se determinaron los niveles de TRAIL-R2 y FLIP por Western blot y en la superficie celular por citometría. (C) Los niveles de ARNm de TRAIL-R2 y CHOP se analizaron por RT-qPCR, los niveles de ATF4 y CHOP se determinaron por Western blot (D) La síntesis de proteínas se determinó según se describe en Material y Métodos tras la incubación de 6 horas con los tratamientos indicados. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n.s. no significativo estadísticamente.

CAPÍTULO TERCERO: El metabolismo de la glutamina como diana antitumoral en combinación con TRAIL.

3.1. La L-Asparraginasas sensibiliza a las células TNBC a la apoptosis inducida por TRAIL.

Las células tumorales reprograman su metabolismo para obtener la energía y los precursores biosintéticos que necesitan para su supervivencia y proliferación. Se producen modificaciones en el transporte de glucosa, la cadena transportadora de electrones, la ruta de las pentosas fosfato o la glutaminólisis, llegando a mostrar una dependencia de la glutamina que se convierte en una importante fuente de energía e intermediarios en la síntesis de macromoléculas. Por tanto, el metabolismo de la glutamina se convierte en un punto clave en la progresión tumoral. Es por ello que en la actualidad un gran número de estrategias antitumorales se han centrado en el metabolismo tumoral y concretamente en el metabolismo de la glutamina como diana terapéutica.

Se han realizado numerosos estudios del efecto de la modulación del metabolismo de la glutamina en tratamientos clínicos. Estos enfoques han incluido la inhibición de la glutaminólisis mediante inhibidores de GLS (Wang et al. 2010) (Robinson et al. 2007), supresión de la expresión de c-MYC (Niu et al. 2015), bloqueo de la captación de glutamina (Hassanein et al. 2013) o el uso de miméticos de glutamina (Ortlund et al. 2000). Sin embargo, muchas de estos ensayos iniciales han revelado una toxicidad sistémica inaceptable para su aplicación en la clínica.

A pesar de estos inconvenientes, la dependencia de las células tumorales del aporte de glutamina sigue siendo una vulnerabilidad de estas células con posibilidades terapéuticas para el tratamiento de pacientes con cáncer. En este sentido, otra de las estrategias empleadas en terapia del cáncer ha sido la de reducir o eliminar la concentración de glutamina en sangre. Para ello se ha descrito que la enzima L-Asparraginasas (L-ASNasa), obtenida de diversas fuentes bacterianas, cataliza la deaminación de la asparragina en amonio y ácido aspártico y de la glutamina en amonio y ácido glutámico, por tanto reduce los niveles de estos dos aminoácidos en sangre (Grigoryan et al. 2004)(Lukey, Wilson, & Cerione 2013). En la clínica, esta enzima se utiliza en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda donde ya se ha descrito la bajada de los niveles de glutamina en sangre así como de los niveles de glutamina almacenados (Ollenschlager et al. 1988). En cultivo, la asparraginasas inhibe el crecimiento celular y provoca la muerte de células de cáncer de páncreas. Este efecto puede revertirse mediante la reintroducción de pequeñas cantidades de glutamina (Wu, Arimura, & Yunis 1978).

Por estos antecedentes, decidimos probar esta enzima, con una larga trayectoria en tratamientos clínicos, para comprobar si su capacidad de depleción de la glutamina del medio podía sensibilizar a las células TNBC a TRAIL y abrir la posibilidad de utilizar su efecto combinado con TRAIL como un posible tratamiento antitumoral. Primero determinamos el efecto del tratamiento de la L-ASNasa sobre la respuesta a estrés. Para ello, las células MDA-MB468 se incubaron en un medio de cultivo con glutamina pero también con L-ASNasa. Los resultados indican la inducción de ATF4, CHOP y TRAIL-R2 similar al observado en medio sin glutamina (Fig. 24A y 24B). También pudimos observar que el tratamiento con L-ASNasa reducía los niveles de expresión de FLIP (Figura 24C). Además, la adición de glutamina en las últimas 6 horas de tratamiento con L-ASNasa inhibía estas respuestas, lo que indica que es la actividad glutaminasa de la L-ASNasa la que provocaba los efectos observados.

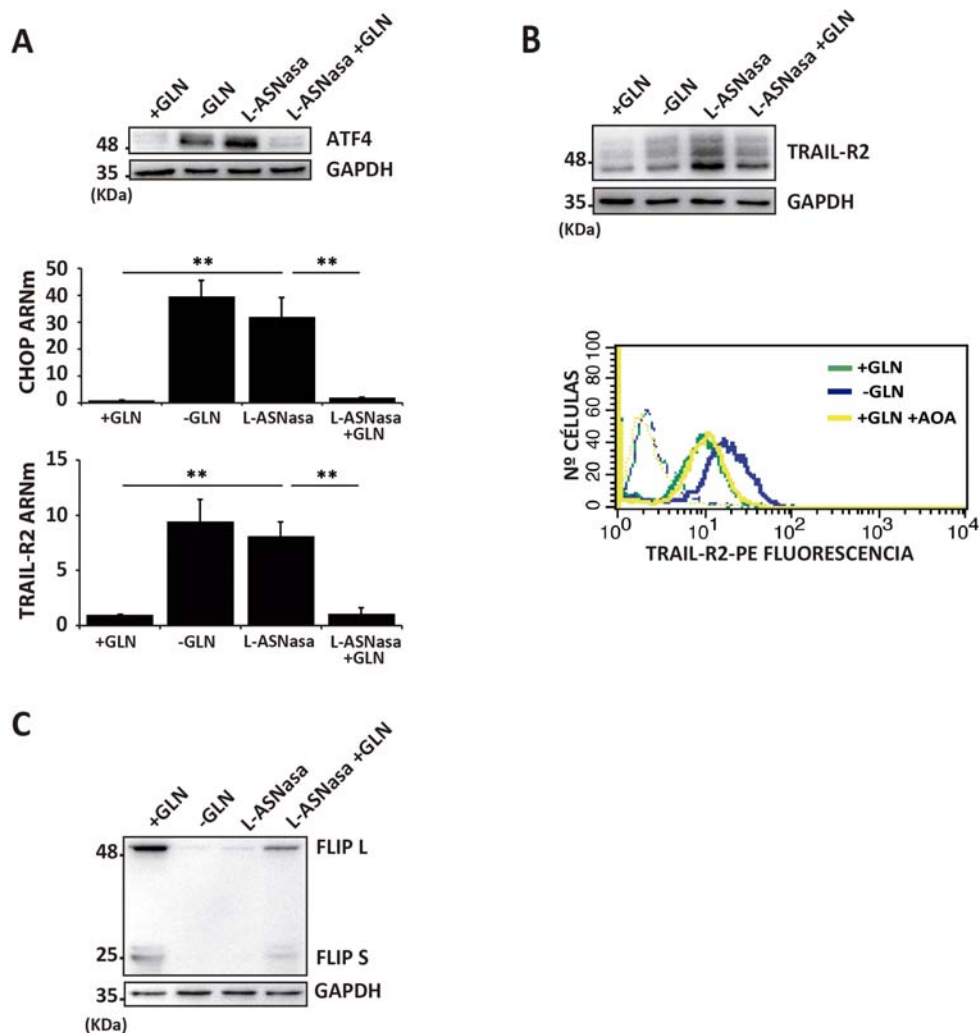


Figura 24 | Efecto de la L-asparaginasa en la respuesta a estrés y en los niveles de FLIP. Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con glutamina (+GLN), sin glutamina (-GLN) y con glutamina y L-Asparaginasa (L-ASNasa, 0.5 U/ml) durante 48 horas. Se añadió glutamina en algunos pocillos

durante las 6 horas finales de tratamiento (L-ASNasa + GLN). Trás estos tratamientos, las células se incubaron en presencia o ausencia de TRAIL (100ng/ml). (A) Se determinó ATF4 mediante Western blot y los niveles de ARNm de CHOP y TRAIL-R2 mediante RT-qPCR. En (B) se determinaron los niveles proteicos de TRAIL-R2 mediante Western blot y a nivel de superficie celular por citometría de flujo como se describe en Material y Métodos. (C) Los niveles de FLIP se determinaron mediante Western blot. GAPDH fue utilizado como control de carga. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. ** p<0,01.

Estos resultados nos llevaron a investigar si el tratamiento con L-ASNasa sensibilizaría a las células TNBC a la apoptosis inducida por TRAIL. La incubación de células MDA-MB468 con L-ASNasa en medio que contiene glutamina sensibilizó fuertemente a estas células a la apoptosis inducida por TRAIL. Esta sensibilización se anuló completamente con la adición tardía de glutamina pero no así con la adición de asparragina, lo que demuestra claramente que es la actividad glutaminasa de la L-ASNasa la que tiene un efecto sinérgico con TRAIL en la activación de un proceso apoptótico en células TNBC (Fig. 25).

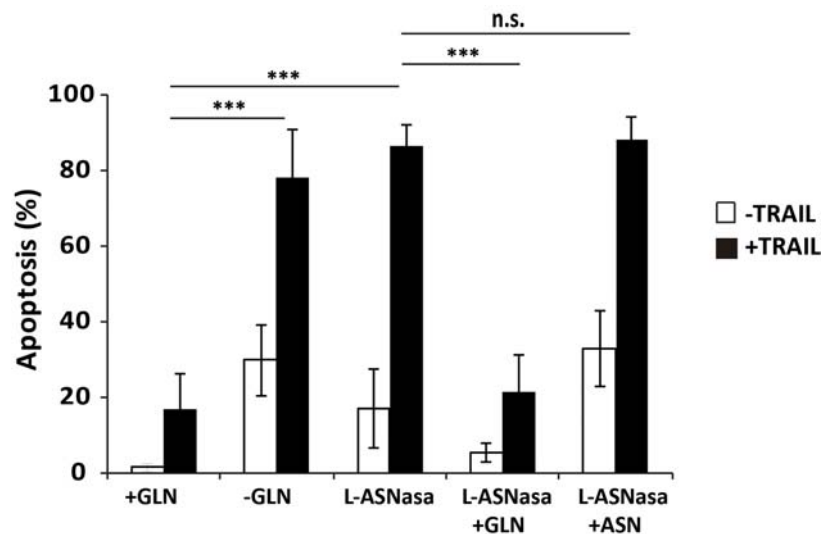


Figura 25 | Efecto de la L-asparraginasa en la sensibilidad a TRAIL. Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con glutamina (+GLN), sin glutamina (-GLN) y con glutamina y L-Asparraginasa (L-ASNasa) durante 48 horas. Se añadió glutamina en algunos pocillos durante las 6 horas finales de tratamiento (L-ASNasa + GLN) o asparragina (L-ASNasa +ASN). Después del tratamiento se trataron a las células 24 horas con TRAIL (100ng/ml) y la apoptosis se determinó como el porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Las gráficas muestran los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. *** p<0,001, n.s. no significativo estadísticamente.

Aunque el análisis de la inducción de apoptosis en un tiempo determinado es una manera frecuentemente utilizada de analizar la respuesta a tratamientos antitumorales, la heterogeneidad en el tiempo en que este proceso de muerte celular puede ocurrir en las células de una misma población nos llevó a analizar la fracción de células que sobreviven al tratamiento de L-ASNasa y TRAIL utilizando un ensayo de clonogenicidad (Franken et al. 2006). Este ensayo permite determinar la capacidad de las células individuales de proliferar y llegar a formar una colonia de 50 células o más. Como puede verse en la figura 26, el tratamiento de privación de glutamina o con L-ASNasa el efecto se mantiene en las células tratadas con respecto al control, ya que se forman menos clones. Además se ve un efecto sinérgico entre estos tratamientos y TRAIL, ya que en los pocillos en los que se combinan ambos tratamientos el número de colonias es menor. Por último, el efecto de la L-ASNasa es revertido cuando se reintroduce glutamina en el medio y el número de colonias aumenta hasta los niveles del control, también en el tratamiento combinado con TRAIL.

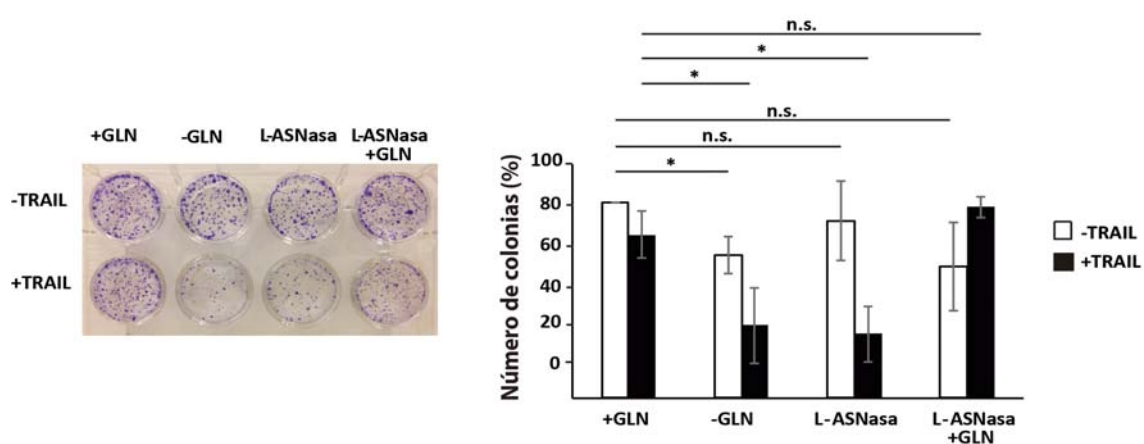


Figura 26 | La L-ASNasa mantiene su efecto después del tratamiento en las células TNBC. Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con glutamina (+GLN), sin glutamina (-GLN) y con glutamina y L-Asparaginasa (L-ASNasa) durante 48 horas. Se añadió glutamina en algunos pocillos durante las 6 horas finales de tratamiento (L-ASNasa + GLN), tras estos tratamientos se incubaron las células en presencia o ausencia de TRAIL (100ng/ml). Finalizados los tratamientos, se sembró el mismo número de células y se dejaron crecer en su medio de crecimiento durante 7 días. Se determinó el número de clones mediante cristal violeta como se describe en el apartado de Material y Métodos.

3.2. Efecto de la privación de glutamina en la sensibilidad a TRAIL de células madre de cáncer de mama.

Numerosas evidencias indican que las células madre tumorales o células iniciadoras de tumores juegan un papel importante en la recurrencia del tumor y la resistencia a los medicamentos, y por tanto representan un importante reto en la terapia actual frente al cáncer. Estas células iniciadoras son responsables de la formación y progresión del tumor y presentan, además, propiedades progenitoras, entre las que destaca su capacidad de autorenovación, la cual junto con el limitado número de células presentes en el conjunto del tumor permite explicar su habilidad para escapar de las terapias convencionales y provocar la reaparición de tumor (Ponti et al. 2006)(Al-Hajj et al. 2003). El microambiente tumoral, como los factores de crecimiento, los nutrientes y el oxígeno, afectan a la generación y proliferación de las células madre del cáncer al proporcionarles las fuentes de energía y las señales de crecimiento necesarias. Por ello, es importante conocer el metabolismo y, en particular, el metabolismo de la glutamina, de estas células ya que puede representar una diana de estrategias terapéuticas que permita vencer su resistencia a tratamientos.

Por este motivo, hemos querido analizar el efecto de la privación de glutamina y el efecto del tratamiento con la L-ASNasa en las células madre de cáncer de mama. Para ello, realizamos cultivos de mamíferas tal y como se detalla en material y métodos. Las mamíferas son conjuntos esféricos no adherentes de células, enriquecidas en células madre del cáncer y que se obtienen en condiciones selectivas de cultivo. Como mostramos en la figura 27, el número de mamíferas disminuyó significativamente con los tratamientos de privación de glutamina y L-ASNasa, y este efecto es aún mayor en combinación con TRAIL. Estos datos sugieren una mayor sensibilidad de las células madre del cáncer a estos tratamientos que el resto de la población de células tumorales existentes en el cultivo. Además, al igual que ocurre cuando se determina la apoptosis en estos tratamientos (Fig.25), la readición de glutamina a las células tratadas con L-ASNasa y TRAIL previno el efecto de este tratamiento sobre la formación de mamíferas (Fig. 27), de nuevo indicando que los efectos observados se deben a la actividad glutaminasa de la L-ASNasa y, por lo tanto, a la privación de glutamina en el medio de cultivo.

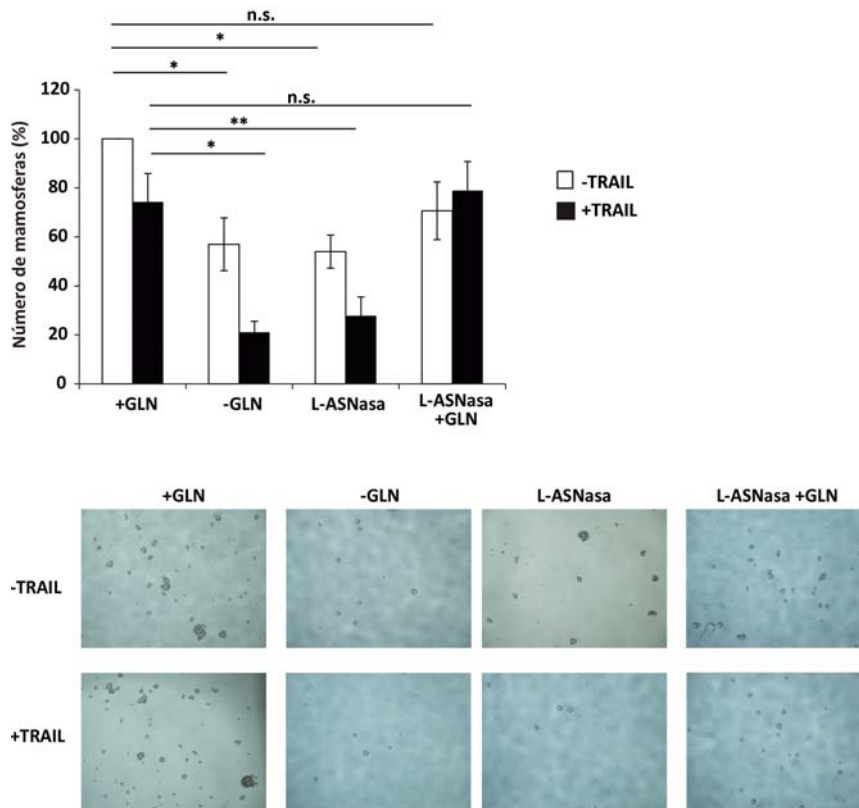


Figura 27 | Efecto de la L-ASNasa en el tratamiento de células madre del cáncer de mama. Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con glutamina (+GLN), sin glutamina (-GLN) y con glutamina y L-Asparraginasa (L-ASNasa) durante 48 horas. Se añadió glutamina en algunos pocillos durante las 6 horas finales de tratamiento (L-ASNasa + GLN), tras estos tratamientos se incubaron las células en presencia o ausencia de TRAIL (100ng/ml) durante 24 horas. Finalizados estos tratamientos las células se contaron y se sembraron 5000 células por pocillo en medio de mamoferas en placas tratadas con poliHEMA. Se determinó el número de mamoferas a los 7 días de incubación. La gráfica muestra los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n.s. no significativo estadísticamente. En el panel inferior se muestran fotos representativas de los resultados obtenidos en los experimentos.

Del mismo modo, analizamos el efecto de la inhibición de las transaminasas con AOA en las células madre del cáncer, ya que como hemos visto en el capítulo anterior este inhibidor de las transaminasas tenía un claro efecto sensibilizador en la inducción de apoptosis por TRAIL en TNBC. Para este estudio también se realizaron ensayos de mamoferas y como se ve en la figura 28 el tratamiento con AOA disminuye el número de estas. El efecto combinado de AOA y TRAIL produce un efecto más acusado en la bajada del número de mamoferas, indicando una mayor

sensibilidad a los tratamientos de las células iniciadoras del cáncer con respecto al resto de la población de células TNBC.

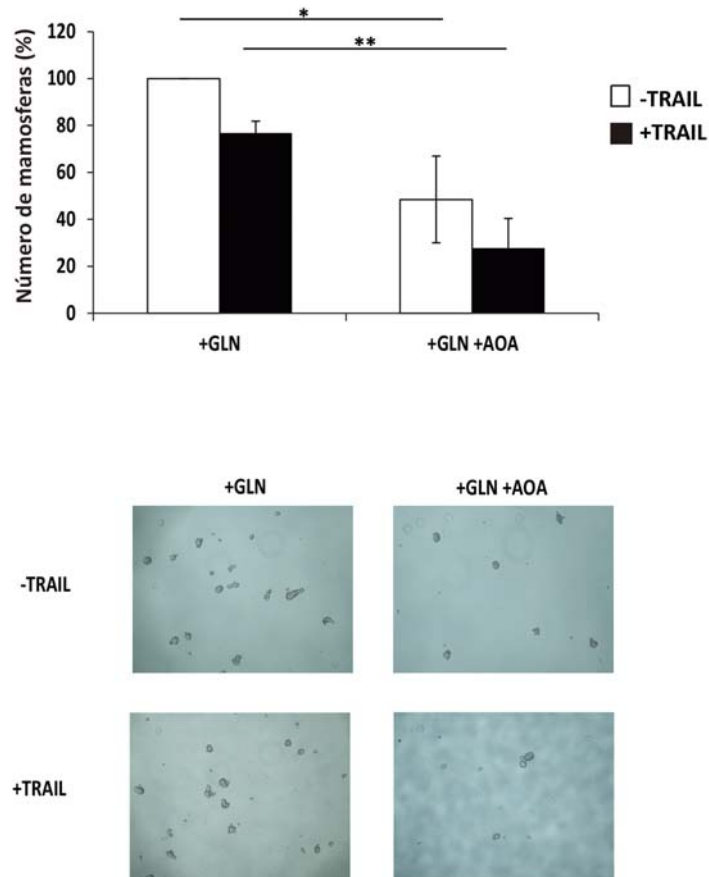


Figura 28 | Efecto del AOA en el tratamiento de células madre del cáncer de mama. Las células MDA-MB468 fueron incubadas en medio con glutamina y en presencia o ausencia de AOA durante 24 horas, tras este tratamiento las células se incubaron en presencia o ausencia de TRAIL (100ng/ml) durante 24 horas. Finalizados estos tratamientos las células se contaron y se sembraron 5000 células por pocillo en medio de mammosferas en placas tratadas con poliHEMA. Se determinó el número de mammosferas a los 7 días de incubación. La gráfica muestra los valores +/- SD de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. En el panel inferior se muestran fotos de un experimento representativo.

VII-Discusión

CAPÍTULO PRIMERO: Regulación de la sensibilidad a TRAIL en células tumorales de mama triple negativas (TNBC) por la glutamina extracelular.

El cáncer de mama triple negativo muestra una gran heterogeneidad agrupando, bajo esta denominación, a diversos subtipos atendiendo a criterios histológicos y moleculares. Además, al estar definido por la ausencia de marcadores moleculares utilizados como dianas terapéuticas, el cáncer TNBC es resistente a tratamientos como la terapia anti hormonal o terapias contra HER2, utilizadas en otros tipos de cáncer de mama (Tomao et al. 2015). Hasta el momento, la quimioterapia es el tratamiento establecido para pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC), aunque solo es efectivo en determinados casos. Por ello, junto con la heterogeneidad clínica y molecular, la falta de dianas terapéuticas y el mal pronóstico de estos pacientes, hacen necesario la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de esta neoplasia (Bianchini et al. 2016).

Una amplia variedad de líneas tumorales muestra sensibilidad a la privación de glutamina, incluyendo glioblastoma multiforme, leucemia mieloide aguda o cáncer de mama. En este último caso, numerosas líneas celulares de cáncer de mama triple negativo muestran una marcada adicción a la glutamina extracelular, a pesar de ser este un aminoácido considerado como no esencial ya que puede ser sintetizado a partir de glucosa. Sin embargo, los cambios metabólicos así como la elevada proliferación de estas células tumorales aumentan los requerimientos de nutrientes como glucosa, glutamina, cisteína y asparragina del medio extracelular (DeBerardinis et al. 2008) (Iglehart et al. 1977) (Asselin et al. 1989). Recientes evidencias han indicado que el incremento de la captación de glutamina y su metabolismo en las células TNBC permite a estas células la síntesis de nucleótidos y proteínas, la homeostasis redox y la energía mitocondrial necesarios para su elevada capacidad proliferativa (Timmerman et al. 2013)(Van Geldermalsen et al. 2016)(Kung, Marks, and Chi 2011). A este respecto, la dependencia de glutamina de las células TNBC ha convertido al metabolismo de este aminoácido en una potencial diana terapéutica (Timmerman et al. 2013)(Gross et al. 2014). Sin embargo, estudios clínicos iniciales con monoterapias que controlan el metabolismo de la glutamina han revelado una actividad tumoral limitada y una toxicidad sistémica excesiva sugiriendo la necesidad de evaluar tratamientos combinados con dosis no tóxicas de estos compuestos junto otras terapias antitumorales.

Se han observado diferencias en la dependencia a glutamina entre líneas luminales y basales (Timmerman et al. 2013)(Van Geldermalsen et al. 2016)(Kung, Marks, & Chi 2011). Además, estudios recientes habían sugerido un posible papel del metabolismo de la glutamina en el

control de la expresión del receptor proapoptótico TRAIL-R2 y de la sensibilidad a TRAIL de diferentes células tumorales, aunque el mecanismo detrás de esta relación seguía sin estar determinado (Qin, Xin, & Nickoloff 2010) (Dilshara et al. 2017). Los resultados expuestos en esta tesis muestran claramente como la inhibición de la utilización de la glutamina en células TNBC con un fenotipo basal disminuye la proliferación celular e incrementa su sensibilidad a la inducción de apoptosis por TRAIL. En contraste, células tumorales de mama no TNBC con un fenotipo luminal son menos dependientes de la glutamina extracelular para la proliferación y no muestran esta sensibilización a TRAIL tras privación de glutamina o inhibición de su metabolismo. La independencia a la glutamina de las líneas celulares de cáncer de mama con un fenotipo luminal está asociado con una expresión elevada de glutamina sintetasa (GS) lo que les permite sintetizar glutamina a partir de glutamato en una reacción inversa a la de la glutaminasa (GLS), cuya expresión se mantiene en niveles reducidos en estas células (Kung et al., 211). En este sentido, es importante destacar que se han descrito diferencias en la expresión de GS y GLS entre muestras de tumores primarios de fenotipos luminal A y basal (Kung, Marks, & Chi 2011). Nuestros resultados demuestran que al silenciar la expresión de la GS en células lumbales no TNBC, los niveles de GS se redujeron hasta niveles próximos a los de las células TNBC, lo que permitió revertir la resistencia a la sensibilización a TRAIL por privación de glutamina. Durante esta tesis hemos demostrado también que los niveles celulares de TRAIL-R2 y FLIP están regulados críticamente por el metabolismo de la glutamina en células TNBC, aunque por diferentes mecanismos. Mientras que el aumento de la expresión de TRAIL-R2 tras privación de glutamina depende de la activación de la ruta de señalización mediada por GCN2, la disminución de los niveles de FLIP responde a un mecanismo independiente de la ruta de GCN2 en el que está implicada una bajada general de la síntesis de proteínas como consecuencia de la falta de aminoácidos no esenciales provocada por la privación de glutamina (Ji Zhang, Pavlova, & Thompson 2017). Previamente a estos resultados habíamos descartado el papel de mTORC1 en la regulación de FLIP y la sensibilidad de TRAIL. mTORC1 es un importante sensor de la disponibilidad de nutrientes entre ellos la glutamina, que regula la traducción de proteínas, el crecimiento celular y la autofagia (Nicklin et al. 2009). La actividad de mTORC1 es especialmente sensible a la disponibilidad de fuentes de nitrógeno como la glutamina de modo que en su ausencia se inhibe el crecimiento celular y se activa otras formas de obtener nitrógeno como por ejemplo, a través de la autofagia. En nuestros datos observamos que el tratamiento con inhibidores de mTORC1 no reduce los niveles de FLIP ni sensibiliza a estas células a la apoptosis inducida por TRAIL.

Para determinar el papel de los dos eventos que se observaban claramente tras la privación de glutamina, esto es el aumento de los niveles de TRAIL-R2 y la bajada de FLIP, en la sensibilización a TRAIL, realizamos en primer lugar experimentos con ARN de interferencia frente a TRAIL-R2 comprobando que era el principal receptor implicado en esta muerte. Datos previos del grupo habían demostrado que en células MCF10A que sobreexpresaban una forma mutada y constitutivamente activa del oncogén ErbB2 se produce un aumento de TRAIL-R2 a través de la ruta PERK/ATF4/CHOP en respuesta a estrés en el retículo, lo que conduce a una mayor activación de la ruta apoptótica (Martin-Perez et al. 2014). Sin embargo, el silenciamiento de esta ruta en nuestro caso mediada por GCN2 y responsable del aumento de los niveles de este receptor no revertía la muerte indicando que su aumento no es suficiente para que se produzca la muerte. En los datos mostrados se puede observar como la bajada de FLIP es suficiente para que se produzca la sensibilidad a TRAIL tras privación de glutamina, hecho corroborado mediante la sobreexpresión de FLIP que revierte la sensibilidad, o su silenciamiento que sensibiliza a ambos tipos de células, TNBC y no TNBC, a TRAIL. Sin embargo, esta bajada no se observa en las células no TNBC sensibilizadas a TRAIL tras el silenciamiento de GS, en este caso el aumento de TRAIL-R2 podría ser suficiente para producir la muerte tras privación de glutamina.

Estos datos sugieren que la privación de glutamina sensibiliza a TRAIL a las células TNBC, no así a las células no TNBC por su independencia a la glutamina debido sus altos niveles de GS que les permite obtener este aminoácido a partir de glutamato y no depender de los niveles extracelulares. Esta sensibilización se produce por la bajada de los niveles de FLIP consecuencia de una inhibición global de la síntesis de proteínas, sin embargo, aunque la subida de TRAIL-R2 no sea suficiente para producir la sensibilización no se puede descartar por completo su papel en esta muerte.

CAPÍTULO SEGUNDO: Papel del metabolismo de la glutamina en el control de la sensibilidad a TRAIL de células tumorales triple negativas de mama.

La reprogramación metabólica para mantener la supervivencia y la alta tasa de proliferación de las células tumorales es una de las características del cáncer (Hanahan & Weinberg 2011) y como tal se presenta como una importante diana terapéutica. Dado los altos requerimientos energéticos de las células tumorales, estas muestran alto grado de consumo de nutrientes como la glutamina, que se convierte en ciertos tumores en una de las fuentes principales de energía. Por ello en los últimos años el metabolismo de este aminoácido está suscitando multitud de investigaciones. Hay un gran número de estrategias para modular o bloquear el metabolismo de la glutamina en las diferentes etapas del mismo, lo que permite su estudio y una posible diana terapéutica (Ji Zhang, Pavlova, & Thompson 2017).

La segunda parte de esta tesis tenía como objetivo abordar el impacto de la inhibición del metabolismo de la glutamina en la sensibilidad a TRAIL a través de la bajada de los niveles de FLIP, para ello estudiamos los diferentes pasos en el catabolismo de la glutamina mediante su inhibición farmacológica o genética.

El catabolismo de la glutamina comienza con su conversión enzimática a glutamato en reacciones que permiten la donación de nitrógeno para la síntesis de hexosaminas y nucleótidos a nivel citosólico (Hensley, Wasti, & Deberardinis 2013), por lo que la privación de glutamina podría estar inhibiendo la formación de estos compuestos y produciendo la muerte tras la adición de TRAIL. Nuestros datos demuestran que tras la adición en el medio de nucleósidos y glucosamina como precursores de la síntesis de nucleótidos o hexosaminas no se revierte la muerte. Es más, en el caso de la glucosamina se produce sensibilización a TRAIL incluso en presencia de glutamina. Diversos estudios demuestran que la adición al medio de glucosamina aumenta el flujo de la ruta de las hexosaminas lo que finalmente aumenta la glicosilación de proteínas. TRAIL-R2 también aumenta su O-glicosilación lo que favorece su agregación y activación, y sensibiliza a estas células a TRAIL (Liang et al. 2018). Este efecto de aumento de la O-glicosilación y por tanto aumento de la agregación de los receptores proapoptóticos TRAIL-R2 y TRAIL-R1 se ha descrito con otros intermediarios de la ruta de las hexosaminas (Wagner et al. 2007).

El glutamato producido tras las primeras reacciones del metabolismo de la glutamina puede dar lugar a glutatión, un importante antioxidante. El agotamiento de glutatión es un evento temprano en la progresión de la muerte celular. Aunque la reducción del glutatión se ha

relacionado con su oxidación por las especies reactivas de oxígeno (ROS), hoy se sabe que su agotamiento se debe a una variedad de mecanismos, en muchos casos es independiente de un estrés oxidativo y precede a la acumulación de ROS (Franco & Cidlowski 2012). Por esta razón mediante los experimentos con N-acetilcisteína (NAC) quisimos comprobar la importancia de las especies reactivas de oxígeno en la sensibilización. A pesar de observar una reversión de la muerte, el tratamiento con NAC no revertía los efectos observados en los niveles FLIP y TRAIL-R2, es decir que se mantenía la bajada de FLIP y la subida tanto a nivel de proteína como a nivel de membrana del receptor. Esto nos lleva a pensar que esta protección de la muerte se produce por mecanismos independientes de las alteraciones en los niveles de estos importantes elementos en la señalización de apoptosis por TRAIL.

Gran parte del catabolismo de la glutamina conduce a la formación de glutamato y este, a su vez produce α -cetoglutarato. Nuestros datos muestran que la adición de este metabolito previene por completo la bajada en los niveles de FLIP y la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL. La conversión de glutamina a glutamato es llevada a cabo por la acción de las glutaminasas en la mitocondria. Se han descrito dos isoformas, GLS1 y GLS2, ambas tienen papeles opuestos en la tumorigénesis. GLS1 se relaciona estrechamente con el crecimiento y malignidad tumoral y su silenciamiento o inhibición retrasa la progresión tumoral (Wang et al. 2010). GLS2 por su parte suprime la metástasis a través de la inhibición de Snail y de la actividad GTPasa de Rac en células de carcinoma hepático (Kuo et al. 2017)(Zhang et al. 2016) Debido a estos datos realizamos una inhibición, tanto farmacológica con los inhibidores BPTES y 968 como mediante su silenciamiento con ARN de interferencia, de la GLS1. No observamos la sensibilidad a TRAIL que se observa tras privación de glutamina, a pesar de que en las células TNBC los niveles de GLS están elevados frente a otras líneas no dependientes de glutamina (Kung, Marks, & Chi 2011). Además de la glutaminólisis mitocondrial, en el citosol también se produce la catálisis de glutamina a glutamato con el aporte de nitrógeno para las rutas de la hexosaminas y nucleótidos. Ya que previamente habíamos descartado la implicación de estas rutas mediante sus precursores, utilizamos dos inhibidores del paso de glutamina a glutamato, la acivicina y el DON. Estudios previos muestran como la apoptosis producida por TRAIL tras privación de la glutamina o con el uso de acivicina es revertida con la adición al medio de dos precursores de la ruta de las purinas y pirimidinas, la inosina y el orotato, en células epiteliales de colon (Evans, Jones, and Ziegler 2005). Observamos una sensibilización a TRAIL y bajada de FLIP que no fue revertida con la presencia de precursores de la ruta de las purinas y pirimidinas confirmando que era la producción de glutamato a través de estas rutas citosólicas la responsable de la sensibilización. Finalmente observamos que el catabolismo del glutamato a través de las

transaminasas pero no a través de la glutamato deshidrogenasa produce el efecto anteriormente observado con la privación de glutamina de descenso de los niveles de FLIP y sensibilidad a TRAIL. Nuestros resultados muestran que la aspartato aminotransferasa citosólica GOT1, enzima que está elevada en las líneas TNBC (Thornburg et al. 2008), está envuelta en el mantenimiento de los niveles de FLIP y TRAIL-R2 en las células TNBC cultivadas en medio con glutamina. Juntos, estos resultados indican el papel clave de las transaminasas en el control de la ruta extrínseca de la apoptosis en células TNBC. Es interesante mencionar, como se ha descrito recientemente, la fuerte correlación entre la actividad de las transaminasas y la proliferación en tumores de mama (Coloff et al. 2016). Además, estudios recientes muestran como los reguladores transcripcionales YAP y TAZ promueven la dependencia a glutamina en células de cáncer de mama a través del aumento en la expresión de las transaminasas, en concreto GOT1 y PSAT1, para mantener el crecimiento tumoral, siendo inhibido este crecimiento con el inhibidor general de transaminasas AOA (Yang et al. 2018). Por lo tanto, el acoplamiento de la anaplerosis de la glutamina a la síntesis de NEAA es un importante paso en la reprogramación del metabolismo que sustenta las demandas biosintéticas debidas a la alta proliferación de los tumores de cáncer de mama (Coloff et al. 2016). Por ello, las transaminasas han sido propuestas como una potencial diana terapéutica en tratamientos contra el cáncer de mama (Korangath et al. 2015)(Thornburg et al. 2008)(Yang et al. 2018). Sin embargo, la redundancia metabólica entre las transaminasas y las glutamato deshidrogenasas para producir el intermedio anaplerótico α -cetoglutarato conduce al desarrollo de resistencia por parte del tumor a los inhibidores de las transaminasas en monoterapia (Coloff et al. 2016). En relación con estos datos, nuestros resultados sugieren que la reducción de los niveles de FLIP por la inhibición de las transaminasas y la activación simultánea de los receptores proapoptóticos de TRAIL puede inducir apoptosis en las células TNBC, facilitando la supresión tumoral.

CAPÍTULO TERCERO: El metabolismo de la glutamina como diana antitumoral en combinación con TRAIL.

TRAIL ha sido descrito desde su descubrimiento como un potencial agente terapéutico debido a su capacidad para ser activamente tóxico frente a células transformadas o tumorales pero no contra la mayoría de las células normales (Ashkenazi et al. 1999). Estas observaciones fueron además confirmadas en estudios in vivo en los que TRAIL fue efectivo reduciendo el crecimiento del tumor sólido e induciendo la regresión tumoral en xenoinjertos (Walczak et al. 1999), sin la toxicidad sistémica observada con TNF α y FAS/CD95. Sin embargo en muchos estudios preclínicos se ha observado que, con frecuencia, los tumores primarios muestran resistencia a TRAIL (Nguyen, Zhang, & Hersey 2001) (Koschny et al. 2007), por lo que se ha hecho necesaria la búsqueda de tratamientos combinados con otros agentes antitumorales que activen la ruta de TRAIL. A pesar de los posibles problemas de toxicidad hepática con el TRAIL con cola de histidina (Jo et al. 2000), otras versiones de TRAIL recombinante y de anticuerpos agonistas contra los receptores proapoptóticos de TRAIL han sido usados en ensayos clínicos, con una amplia tolerancia (Von Karstedt, Montinaro, & Walczak 2017). Desafortunadamente, los beneficios clínicos de estas estrategias terapéuticas están bastante limitadas debido probablemente, entre otras razones, a la baja actividad agonística de estos agentes y a la resistencia que presentan frente a ellos gran cantidad de tumores primarios (Lemke, et al. 2014). Pero tras estos datos, una segunda generación de TRAIL está siendo producida para aumentar su actividad agonista (De Miguel et al. 2016).

En esta tesis se ha investigado la posible utilización del metabolismo de la glutamina en combinación con TRAIL como posible agente terapéutico. Para profundizar en este tema utilizamos la L-Asparaginasa (L-ASNasa) una enzima cuyo uso está ampliamente extendido en clínica desde hace décadas, ya en 1953 fue descrito su potencial antitumoral (Kidd 1953). Aunque in vitro se ha demostrado la sensibilidad a la L-ASNasa en células procedentes de diferentes tumores sólidos, su uso clínico se ha restringido a pacientes pediátricos y adultos con leucemia linfática aguda (ALL) y otras enfermedades linfoides (Emadi, Zokaee, & Sausville 2014). A este respecto, nuestros datos demuestran que la actividad glutaminasa de la L-ASNasa de *E.coli* es responsable de aumento de los niveles de TRAIL-R2, el descenso de FLIP y la sensibilización a la muerte inducida por TRAIL en células TNBC tratadas con esta enzima. Consistente con nuestros datos obtenidos in vitro en células TNBC, estudios clínicos han indicado que la actividad glutaminasa de la L-ASNasa correlaciona con los efectos positivos observados en pacientes con ALL (Emadi, Zokaee, and Sausville 2014). Aunque se han descrito efectos

adversos a largo plazo en los tratamientos con L-ASNasa (Lanvers-Kaminsky 2017), el sinergismo con TRAIL demostrado en nuestro estudio puede potencialmente reducir la duración de los tratamientos con L-ASNasa y de esta manera minimizar el riesgo de efectos indeseados en los pacientes. Además, este tratamiento combinado mantiene su efecto en el tiempo, como se ha determinado mediante ensayos de clonogenicidad, reduciéndose significativamente el crecimiento tumoral a pesar de volver a condiciones óptimas de crecimiento una vez realizado el tratamiento.

Otro punto a tener en cuenta para poder determinar si este tratamiento combinado puede ser usado a nivel clínico es la heterogeneidad del tumor. Dentro del tumor se pueden diferenciar distintas poblaciones, entre ellas las llamadas células madre del cáncer (CSCs). Se trata de células indiferenciadas y resistentes a multitud de las terapias tradicionales lo que permite la reaparición del tumor y su diseminación (Peiris-Pages et al. 2016). Es por ello que la eliminación específica de las CSCs representa uno de los grandes retos de la investigación actual. Por esta razón, el último objetivo de esta tesis fue determinar cómo afectaba la inhibición del metabolismo de la glutamina a la población de CSCs. Anteriormente se había descrito que la inhibición de la glutaminasa o de las transaminasas GOT reducían la autorenovación de estas células y las sensibilizaban a radioterapia en tumores pancreáticos (D. Li et al. 2015). En nuestro caso utilizamos el inhibidor de transaminasa AOA y la L-ASNasa para determinar mediante ensayos de mamíferas el efecto en las CSCs en combinación con TRAIL. Observamos que estos tratamientos eran eficaces en la población de CSCs, ya que el número de mamíferas disminuía significativamente respecto al control.

Todos estos datos en conjunto muestran una regulación del sistema TRAIL por el metabolismo de la glutamina en células TNBC y una posible aplicación clínica. Nuestro estudio refuerza datos anteriores y refuerza la continuación de más estudios para determinar la viabilidad de la utilización en terapias clínicas de la inhibición del metabolismo de la glutamina en células TNBC, en combinación con los nuevos agonistas de los receptores proapoptóticos de TRAIL.

VIII-Conclusiones

1. La privación de glutamina sensibiliza a las células tumorales triple negativas (TNBC) de cáncer de mama a la apoptosis inducida por el ligando de muerte celular TRAIL.
2. La expresión de niveles más elevados de glutamina sintetasa en células tumorales de mama no TNBC hace a estas células más resistentes a la acción apoptótica de TRAIL en ausencia de glutamina extracelular.
3. En células TNBC, la privación de glutamina aumenta los niveles del receptor proapoptótico TRAIL-R2 y produce un descenso de la proteína antiapoptótica FLIP. El aumento de la expresión de TRAIL-R2 depende de la activación de la ruta de señalización mediada por GCN2/ATF4/CHOP. La reducción de los niveles de FLIP es independiente de la activación de la ruta de GCN2.
4. La bajada de los niveles celulares de FLIP tras privación de glutamina es suficiente para la sensibilización a TRAIL de las células TNBC.
5. La reducción en los niveles de FLIP en la ausencia de glutamina extracelular es una consecuencia de la inhibición de la síntesis general de proteínas.
6. En las células TNBC, la inhibición farmacológica del catabolismo del glutamato a través de las transaminasas, pero no a través de la glutamato deshidrogenasa, reproduce los efectos de la privación de glutamina en cuanto a inhibición de la síntesis general de proteínas, disminución de los niveles de FLIP y sensibilidad a TRAIL.
7. La adición de aminoácidos no esenciales al medio de cultivo previene los efectos que, sobre la sensibilización a TRAIL de las células TNBC, tiene la inhibición de las transaminasas.
8. La transaminasa citosólica GOT1, con expresión elevada en las células TNBC, es responsable del mantenimiento de los niveles de FLIP y TRAIL-R2 en estas células.
9. La actividad glutaminasa de la L-asparaginasa exógena sensibiliza a las células TNBC a TRAIL mediante los mismos mecanismos descritos en la privación de glutamina.

10. La población de células TNBC con características de células iniciadoras de tumores muestran dependencia de la glutamina extracelular para formar mamíferos y sensibilidad a TRAIL en ausencia de este aminoácido.

11. En resumen, el metabolismo de la glutamina se perfila como una potencial diana terapéutica en tratamiento combinado con TRAIL en cáncer de mama triple negativo.

IX-Bibliografía

- Ahluwalia, Gurpreet S., Jean L. Grem, Zhang Hao, and David A. Cooney. 1990. "Metabolism and Action of Amino Acid Analog Anti-Cancer Agents." *Pharmacology and Therapeutics* 46 (2): 243–71. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90094-l](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90094-l).
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke. 2003. "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (7): 3983–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>.
- Almasan, Alexandru, and Avi Ashkenazi. 2003. "Apo2L/TRAIL: Apoptosis Signaling, Biology, and Potential for Cancer Therapy." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 14 (3–4): 337–48. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00029-7).
- Altman, Brian J, Zachary E Stine, and Chi V Dang. 2016. "From Krebs to Clinic: Glutamine Metabolism to Cancer Therapy." *Nature Reviews. Cancer* 16 (10): 619–34. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>.
- Alvarado-Kristensson, Maria, Fredrik Melander, Karin Leandersson, Lars Rönstrand, Christer Wernstedt, and Tommy Andersson. 2004. "P38-MAPK Signals Survival by Phosphorylation of Caspase-8 and Caspase-3 in Human Neutrophils." *The Journal of Experimental Medicine* 199 (4): 449–58. <https://doi.org/10.1084/jem.20031771>.
- Ashkenazi, Avi. 2008. "Directing Cancer Cells to Self-Destruct with pro-Apoptotic Receptor Agonists." *Nature Reviews Drug Discovery* 7 (12): 1001–12. <https://doi.org/10.1038/nrd2637>.
- Ashkenazi, Avi. 2015. "Targeting the Extrinsic Apoptotic Pathway in Cancer : Lessons Learned and Future Directions." *J Clin Invest.* 125 (2): 487–489. <https://doi.org/10.1172/JCI80420.normal>.
- Ashkenazi, Avi, Roger C. Pai, Sharon Fong, Susan Leung, David A. Lawrence, Scot A. Marsters, Christine Blackie, et al. 1999. "Safety and Antitumor Activity of Recombinant Soluble Apo2 Ligand." *Journal of Clinical Investigation* 104 (2): 155–62. <https://doi.org/10.1172/JCI6926>.
- Asselin, B L, D Ryan, C N Frantz, S D Bernal, P Leavitt, S E Sallan, and H J Cohen. 1989. "In Vitro and in Vivo Killing of Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by L-Asparaginase." *Cancer Research* 49 (15): 4363–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2743326>.
- Audeh, M. William, James Carmichael, Richard T. Penson, Michael Friedlander, Bethan Powell, Katherine M. Bell-McGuinn, Clare Scott, et al. 2010. "Oral Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib in Patients with BRCA1 or BRCA2 Mutations and Recurrent Ovarian Cancer: A Proof-of-Concept Trial." *The Lancet* 376 (9737): 245–51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60893-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60893-8).
- Austin, C. D., D. A. Lawrence, A. A. Peden, E. E. Varfolomeev, K. Totpal, A. M. De Maziere, J. Klumperman, et al. 2006. "Death-Receptor Activation Halts Clathrin-Dependent Endocytosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (27): 10283–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604044103>.
- Bensaad, Karim, Atsushi Tsuruta, Mary A. Selak, M. Nieves Calvo Vidal, Katsunori Nakano, Ramon Bartrons, Eyal Gottlieb, and Karen H. Vousden. 2006. "TIGAR, a P53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis." *Cell* 126 (1): 107–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.036>.

- Berghe, Tom Vanden, Andreas Linkermann, Sandrine Jouan-Lanhouet, Henning Walczak, and Peter Vandenabeele. 2014. "Regulated Necrosis: The Expanding Network of Non-Apoptotic Cell Death Pathways." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (2): 135–47. <https://doi.org/10.1038/nrm3737>.
- Bianchini, Giampaolo, Justin M Balko, Ingrid A Mayer, Melinda E Sanders, and Luca Gianni. 2016. "Triple-Negative Breast Cancer: Challenges and Opportunities of a Heterogeneous Disease." *Nature Reviews Clinical Oncology* 13 (May): 674. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>.
- Bodmer, Jean L., Pierre Meier, Jürg Tschopp, and Pascal Schneider. 2000. "Cysteine 230 Is Essential for the Structure and Activity of the Cytotoxic Ligand TRAIL." *Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20632–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909721199>.
- Bodmer, Jean Luc, Pascal Schneider, and Jürg Tschopp. 2002. "The Molecular Architecture of the TNF Superfamily." *Trends in Biochemical Sciences* 27 (1): 19–26. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01995-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01995-8).
- Boya, Patricia, Fulvio Reggiori, and Patrice Codogno. 2013. "Emerging Regulation and Functions of Autophagy." *Nature Cell Biology* 15 (7): 713–20. <https://doi.org/10.1038/ncb2788>.
- Brenton, James D, Lisa A Carey, Ahmed Ashour Ahmed, and Carlos Caldas. 2005. "Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application?" *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (29): 7350–60. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.3845>.
- Broer, Angelika, Farid Rahimi, and Stefan Broer. 2016. "Deletion of Amino Acid Transporter ASCT2 (SLC1A5) Reveals an Essential Role for Transporters SNAT1 (SLC38A1) and SNAT2 (SLC38A2) to Sustain Glutaminolysis in Cancer Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 291 (25): 13194–205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700534>.
- Broome, J D. 1963. "Evidence That the L-Asparaginase of Guinea Pig Serum Is Responsible for Its Antilymphoma Effects. I. Properties of the L-Asparaginase of Guinea Pig Serum in Relation to Those of the Antilymphoma Substance." *The Journal of Experimental Medicine* 118 (July): 99–120.
- Brown, D. A., and E. London. 1998. "Functions of Lipid Rafts in Biological Membranes." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14 (1): 111–36. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.111>.
- Bryant, Kirsten L, Joseph D Mancias, Alec C Kimmelman, and Channing J Der. 2014. "KRAS: Feeding Pancreatic Cancer Proliferation." *Trends in Biochemical Sciences* 39 (2): 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004>.
- Budd, Ralph C., Wen Chen Yeh, and Jürg Tschopp. 2006. "CFLIP Regulation of Lymphocyte Activation and Development." *Nature Reviews Immunology* 6 (3): 196–204. <https://doi.org/10.1038/nri1787>.
- Cacace, A., M. Sboarina, T. Vazeille, and P. Sonveaux. 2017. "Glutamine Activates STAT3 to Control Cancer Cell Proliferation Independently of Glutamine Metabolism." *Oncogene* 36 (15): 2074–84. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.364>.
- Cao, M D, S Lamichhane, S Lundgren, A Bofin, H Fjosne, G F Giskeodegard, and T F Bathen. 2014. "Metabolic Characterization of Triple Negative Breast Cancer." *BMC Cancer* 14: 941. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-941>.

- Chan, Francis Ka-Ming. 2007. "Three Is Better than One: Pre-Ligand Receptor Assembly in the Regulation of TNF Receptor Signaling." *Cytokine* 37 (2): 101–7. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.03.005>.
- Chang, Lufen, Hideaki Kamata, Giovanni Solinas, Jun-Li Luo, Shin Maeda, K Venuprasad, Yun-Cai Liu, and Michael Karin. 2006. "The E3 Ubiquitin Ligase Itch Couples JNK Activation to TNF α -Induced Cell Death by Inducing c-FLIP(L) Turnover." *Cell* 124 (3): 601–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.021>.
- Chanvorachote, Pithi, Ubonthip Nimmannit, Liying Wang, Christian Stehlik, Bin Lu, Neelam Azad, and Yon Rojanasakul. 2005. "Nitric Oxide Negatively Regulates Fas CD95-Induced Apoptosis through Inhibition of Ubiquitin-Proteasome-Mediated Degradation of FLICE Inhibitory Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (51): 42044–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510080200>.
- Chen, Bing Jia, Yan Ling Wu, Yoshimasa Tanaka, and Wen Zhang. 2014. "Small Molecules Targeting C-Myc Oncogene: Promising Anti-Cancer Therapeutics." *International Journal of Biological Sciences* 10 (10): 1084–96. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10190>.
- Chen, Jane-Jane. 2007. "Regulation of Protein Synthesis by the Heme-Regulated EIF2 α Kinase: Relevance to Anemias." *Blood* 109 (7): 2693–99. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-041830>.
- Chipuk, Jerry E, Tudor Moldoveanu, Fabien Llambi, Melissa J Parsons, and Douglas R Green. 2010. "The BCL-2 Family Reunion." *Molecular Cell* 37 (3): 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.025>.
- Choi, Young Eun, Michael Butterworth, Srinivas Malladi, Colin S. Duckett, Gerald M. Cohen, and Shawn B. Bratton. 2009. "The E3 Ubiquitin Ligase CIAP1 Binds and Ubiquitinates Caspase-3 and -7 via Unique Mechanisms at Distinct Steps in Their Processing." *Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 12772–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807550200>.
- Clancy, L., K. Mruk, K. Archer, M. Woelfel, J. Mongkolsapaya, G. Screaton, M. J. Lenardo, and F. K.-M. Chan. 2005. "Preligand Assembly Domain-Mediated Ligand-Independent Association between TRAIL Receptor 4 (TR4) and TR2 Regulates TRAIL-Induced Apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (50): 18099–104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507329102>.
- Cole, James L. 2007. "Activation of PKR: An Open and Shut Case?" *Trends in Biochemical Sciences* 32 (2): 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.12.003>.
- Coloff, Jonathan L., J. Patrick Murphy, Craig R. Braun, Isaac S. Harris, Laura M. Shelton, Kenjiro Kami, Steven P. Gygi, Laura M. Selfors, and Joan S. Brugge. 2016. "Differential Glutamate Metabolism in Proliferating and Quiescent Mammary Epithelial Cells." *Cell Metabolism* 23 (5): 867–80. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.016>.
- Cox, Andrew G, Katie L Hwang, Kristin K Brown, Kimberley Evason, Sebastian Beltz, Allison Tsomides, Keelin O'Connor, et al. 2016. "Yap Reprograms Glutamine Metabolism to Increase Nucleotide Biosynthesis and Enable Liver Growth." *Nature Cell Biology* 18 (8): 886–96. <https://doi.org/10.1038/ncb3389>.
- Curthoys, N. P. 1995. "Regulation of Glutaminase Activity and Glutamine Metabolism." *Annual Review of Nutrition* 15 (1): 133–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.15.1.133>.
- Dai, Xiaofeng, Ting Li, Zhonghu Bai, Yankun Yang, Xiuxia Liu, Jinling Zhan, and Bozhi Shi. 2015.

- "Breast Cancer Intrinsic Subtype Classification, Clinical Use and Future Trends." *American Journal of Cancer Research* 5 (10): 2929–43.
- DeBerardinis, Ralph J., and Tzuling Cheng. 2010. "Q's next: The Diverse Functions of Glutamine in Metabolism, Cell Biology and Cancer." *Oncogene* 29 (3): 313–24. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.358.Q>.
- DeBerardinis, Ralph J., Julian J. Lum, Georgia Hatzivassiliou, and Craig B. Thompson. 2008. "The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation." *Cell Metabolism* 7 (1): 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>.
- Degterev, Alexei, and Junying Yuan. 2008. "Expansion and Evolution of Cell Death Programmes." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (5): 378–90. <https://doi.org/10.1038/nrm2393>.
- Deval, Christiane, Cédric Chaveroux, Anne Catherine Maurin, Yoan Cherasse, Laurent Parry, Valérie Carraro, Dragan Milenkovic, et al. 2009. "Amino Acid Limitation Regulates the Expression of Genes Involved in Several Specific Biological Processes through GCN2-Dependent and GCN2-Independent Pathways." *FEBS Journal* 276 (3): 707–18. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06818.x>.
- Dickens, Laura S, Robert S Boyd, Rebekah Jukes-Jones, Michelle A Hughes, Gemma L Robinson, Louise Fairall, John WR Schwabe, Kelvin Cain, and Marion MacFarlane. 2012. "A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death." *Molecular Cell* 47 (2–2): 291–305. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.004>.
- Dillon, Christopher P., Bart Tummers, Katherine Baran, and Douglas R. Green. 2016. "Developmental Checkpoints Guarded by Regulated Necrosis." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (11–12): 2125–36. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2188-z>.
- Dilshara, Matharage Gayani, Jin Woo Jeong, Rajapaksha Gedara Prasad Tharanga Jayasooriya, Ilandarage Menu Neelaka Molagoda, Seunghoon Lee, Sang Rul Park, Yung Hyun Choi, and Gi Young Kim. 2017. "Glutamine Deprivation Sensitizes Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells to TRIAL-Mediated Apoptosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 485 (2): 440–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.059>.
- Djerbi, M, T Darreh-Shori, B Zhivotovsky, and A Grandien. 2001. "Characterization of the Human FLICE-Inhibitory Protein Locus and Comparison of the Anti-Apoptotic Activity of Four Different Flip Isoforms." *Scandinavian Journal of Immunology* 54 (1–2): 180–89.
- Donnelly, Neysan, Adrienne M. Gorman, Sanjeev Gupta, and Afshin Samali. 2013. "The EIF2 α Kinases: Their Structures and Functions." *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (19): 3493–3511. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1252-6>.
- Durán, Raúl V., Wolfgang Oppliger, Aaron M. Robitaille, Lisa Heiserich, Roswitha Skendaj, Eyal Gottlieb, and Michael N. Hall. 2012. "Glutaminolysis Activates Rag-MTORC1 Signaling." *Molecular Cell* 47 (3): 349–58. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.043>.
- Ea, Chee Kwee, Li Deng, Zong Ping Xia, Gabriel Pineda, and Zhijian J. Chen. 2006. "Activation of IKK by TNF α Requires Site-Specific Ubiquitination of RIP1 and Polyubiquitin Binding by NEMO." *Molecular Cell* 22 (2): 245–57. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.026>.
- Eckelman, Brendan P., Guy S. Salvesen, and Fiona L. Scott. 2006. "Human Inhibitor of Apoptosis Proteins: Why XIAP Is the Black Sheep of the Family." *EMBO Reports* 7 (10): 988–94.

<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400795>.

Ellis, H M, and H R Horvitz. 1986. "Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *C. Elegans*." *Cell* 44 (6): 817–29. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8).

Ellis, Ronald E, and H Robert Horvitz. 1991. "Two *C. Elegans* Genes Control the Programmed Deaths of Specific Cells in the Pharynx." *Development (Cambridge, England)* 112: 591–603.

Emadi, Ashkan, Hania Zokaee, and Edward A. Sausville. 2014. "Asparaginase in the Treatment of Non-ALL Hematologic Malignancies." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 73 (5): 875–83. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2402-3>.

Emery, John G, Peter McDonnell, Michael Brigham Burke, Keith C Deen, Sally Lyn, Carol Silverman, Edward Dul, et al. 1998. "Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL.Pdf" 273 (23): 14363–67.

Evans, Mary E, Dean P Jones, and Thomas R Ziegler. 2005. "Glutamine Inhibits Cytokine-Induced Apoptosis in Human Colonic Epithelial Cells via the Pyrimidine Pathway." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 289 (3): G388-96. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00072.2005>.

Fadok, V A, D R Voelker, P A Campbell, J J Cohen, D L Bratton, and P M Henson. 1992. "Exposure of Phosphatidylserine on the Surface of Apoptotic Lymphocytes Triggers Specific Recognition and Removal by Macrophages." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148 (7): 2207–16. <https://doi.org/1550-6606>.

Fadok, Valerie A., Donna L. Bratton, Anatole Konowal, Peter W. Freed, Jay Y. Westcott, and Peter M. Henson. 1998. "Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF- β , PGE2, and PAF." *Journal of Clinical Investigation* 101 (4): 890–98. <https://doi.org/10.1172/JCI1112>.

Fan, Cheng, Daniel S Oh, Lodewyk Wessels, Britta Weigelt, Dimitry S A Nuyten, Andrew B Nobel, Laura J van't Veer, and Charles M Perou. 2006. "Concordance among Gene-Expression-Based Predictors for Breast Cancer." *The New England Journal of Medicine* 355 (6): 560–69. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052933>.

Fanger, Neil A, Charles R Maliszewski, Ken Schooley, and Thomas S Griffith. 1999. "Human Dendritic Cells Mediate Cellular Apoptosis via Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand (Trail)." *The Journal of Experimental Medicine* 190 (8): 1155–64. <https://doi.org/10.1084/jem.190.8.1155>.

Feoktistova, Maria, and Martin Leverkus. 2015. "Programmed Necrosis and Necroptosis Signalling." *FEBS Journal* 282 (1): 19–31. <https://doi.org/10.1111/febs.13120>.

Ferlay, J, M Colombet, I Soerjomataram, T Dyba, G Randi, M Bettio, A Gavin, O Visser, and F Bray. 2018. "Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries and 25 Major Cancers in 2018." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, August. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005>.

Franco, Rodrigo, and John A. Cidlowski. 2012. "Glutathione Efflux and Cell Death." *Antioxidants & Redox Signaling* 17 (12): 1694–1713. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4553>.

Franken, Nicolaas A P, Hans M. Rodermond, Jan Stap, Jaap Haveman, and Chris van Bree. 2006.

- “Clonogenic Assay of Cells in Vitro.” *Nature Protocols* 1 (5): 2315–19.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- Fukazawa, T, T Fujiwara, F Uno, F Teraishi, Y Kadowaki, T Itoshima, Y Takata, et al. 2001.
 “Accelerated Degradation of Cellular FLIP Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway in P53-Mediated Apoptosis of Human Cancer Cells.” *Oncogene* 20 (37): 5225–31.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204673>.
- Gaglio, Daniela, Chiara Soldati, Marco Vanoni, Lilia Alberghina, and Ferdinando Chiaradonna. 2009.
 “Glutamine Deprivation Induces Abortive S-Phase Rescued by Deoxyribonucleotides in K-Ras Transformed Fibroblasts.” *PLoS ONE* 4 (3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004715>.
- Galluzzi, L., J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, E. S. Alnemri, et al. 2015. “Essential versus Accessory Aspects of Cell Death: Recommendations of the NCCD 2015.” *Cell Death and Differentiation* 22 (1): 58–73.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, et al. 2012. “Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012.” *Cell Death and Differentiation* 19 (1): 107–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>.
- Galluzzi, Lorenzo, Catherine Brenner, Eugenia Morselli, Zahia Touat, and Guido Kroemer. 2008.
 “Viral Control of Mitochondrial Apoptosis.” *PLoS Pathogens* 4 (5).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000018>.
- Galluzzi, Lorenzo, Ilio Vitale, Stuart A. Aaronson, John M. Abrams, Dieter Adam, Patrizia Agostinis, Emad S. Alnemri, et al. 2018. “Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.” *Cell Death and Differentiation* 25 (3): 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- Gao, Ping, Et Al. 2009. “C-Myc Suppression of MiR-23 Enhances Mitochondrial Glutaminase and Glutamine Metabolism.” *Nature* 458 (7239): 762–65.
<https://doi.org/10.1038/nature07823.c-Myc>.
- Geldermalsen, M. Van, Q. Wang, R. Nagarajah, A. D. Marshall, A. Thoeng, D. Gao, W. Ritchie, et al. 2016. “ASCT2/SLC1A5 Controls Glutamine Uptake and Tumour Growth in Triple-Negative Basal-like Breast Cancer.” *Oncogene* 35 (24): 3201–8.
<https://doi.org/10.1038/onc.2015.381>.
- Golks, Alexander, Dirk Brenner, Cornelius Fritsch, Peter H. Krammer, and Inna N. Lavrik. 2005.
 “C-FLIPR, a New Regulator of Death Receptor-Induced Apoptosis.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (15): 14507–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414425200>.
- Golstein, Pierre, and Guido Kroemer. 2007. “Cell Death by Necrosis: Towards a Molecular Definition.” *Trends in Biochemical Sciences* 32 (1): 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>.
- Green, Douglas R, and Fabien Llambi. 2015. “Cell Death Signaling.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>.
- Grigoryan, Rita S, Eduard H Panosyan, Nita L Seibel, Paul S Gaynon, Ioannis a Avramis, and Vassilios I Avramis. 2004. “Changes of Amino Acid Serum Levels in Pediatric Patients with Higher-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia (CCG-1961).” *In Vivo (Athens, Greece)* 18 (2):

- 107–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113036>.
- Grimsley, Cynthia, and Kodi S. Ravichandran. 2003. "Cues for Apoptotic Cell Engulfment: Eat-Me, Don't Eat-Me and Come-Get-Me Signals." *Trends in Cell Biology* 13 (12): 648–56. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.10.004>.
- Gross, M. I., S. D. Demo, J. B. Dennison, L. Chen, T. Chernov-Rogan, B. Goyal, J. R. Janes, et al. 2014. "Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Triple-Negative Breast Cancer." *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (4): 890–901. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0870>.
- Guo, L, L Fan, J Ren, Z Pang, Y Ren, J Li, Z Wen, et al. 2012. "Combination of TRAIL and Actinomycin D Liposomes Enhances Antitumor Effect in Non-Small Cell Lung Cancer." *Int J Nanomedicine* 7: 1449–60. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24711\rijn-7-1449> [pii].
- Haider, Syed, Alan McIntyre, Ruud G.P.M. van Stiphout, Laura M. Winchester, Simon Wigfield, Adrian L. Harris, and Francesca M. Buffa. 2016. "Genomic Alterations Underlie a Pan-Cancer Metabolic Shift Associated with Tumour Hypoxia." *Genome Biology* 17 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0999-8>.
- Halestrap, Andrew P., and Philippe Pasdois. 2009. "The Role of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in Heart Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787 (11): 1402–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.12.017>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Harding, Heather P., Yuhong Zhang, Huiqing Zeng, Isabel Novoa, Phoebe D. Lu, Marcella Calfon, Navid Sadri, et al. 2003. "An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress." *Molecular Cell* 11 (3): 619–33. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00105-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00105-9).
- Harding, Heather P, Yuhong Zhang, and David Ron. 1999. "Protein Translation and Folding Are Coupled by an Endoplasmic-Reticulum-Resident Kinase." *Nature* 397 (6716): 271–74. <https://doi.org/10.1038/16729>.
- Hassanein, Mohamed, Megan D Hoeksema, Masakazu Shiota, Jun Qian, Bradford K Harris, Heidi Chen, Jonathan E Clark, William E Alborn, Rosana Eisenberg, and Pierre P Massion. 2013. "SLC1A5 Mediates Glutamine Transport Required for Lung Cancer Cell Growth and Survival." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (3): 560–70. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2334>.
- He, Ming-Xiao, and You-Wen He. 2015. "C-FLIP Protects T Lymphocytes from Apoptosis in the Intrinsic Pathway." *The Journal of Immunology* 194 (7): 3444–51. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400469>.
- Hensley, Christopher T, Ajla T Wasti, and Ralph J Deberardinis. 2013. "Glutamine and Cancer : Cell Biology , Physiology , and Clinical Opportunities" 123 (9). <https://doi.org/10.1172/JCI69600.3678>.
- Henson, Peter M., Donna L. Bratton, and Valerie A. Fadok. 2001. "Apoptotic Cell Removal." *Current Biology* 11 (19): 795–805. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00474-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00474-2).
- Herranz, Daniel, Alberto Ambesi-Impiombato, Jessica Sudderth, Marta Sanchez-Martin, Laura Belver, Valeria Tosello, Luyao Xu, et al. 2015. "Metabolic Reprogramming Induces

- Resistance to Anti-NOTCH1 Therapies in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Nature Medicine* 21 (10): 1182–89. <https://doi.org/10.1038/nm.3955>.
- Hess, Douglas T, Akio Matsumoto, Sung-Oog Kim, Harvey E Marshall, and Jonathan S Stamler. 2005. "Protein S-Nitrosylation: Purview and Parameters." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (2): 150–66. <https://doi.org/10.1038/nrm1569>.
- Hoeflich, Klaus P., Carol O'Brien, Zachary Boyd, Guy Cavet, Steve Guerrero, Kenneth Jung, Tom Januario, et al. 2009. "In Vivo Antitumor Activity of MEK and Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors in Basal-like Breast Cancer Models." *Clinical Cancer Research* 15 (14): 4649–64. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0317>.
- Holler, Nils, Rossana Zaru, Olivier Micheau, Margot Thome, Antoine Attinger, Salvatore Valitutti, Jean Luc Bodmer, Pascal Schneider, Brian Seed, and Jürg Tschopp. 2000. "Fas Triggers an Alternative, Caspase-8-Independent Cell Death Pathway Using the Kinase RIP as Effector Molecule." *Nature Immunology* 1 (6): 489–95. <https://doi.org/10.1038/82732>.
- Hu, Hai, Ashish Juvekar, Costas A Lyssiotis, Evan C Lien, John G Albeck, Doogie Oh, Gopal Varma, et al. 2016. "Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin Cytoskeleton." *Cell* 164 (3): 433–46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.042>.
- Hu, Wenwei, Cen Zhang, Rui Wu, Yvonne Sun, Arnold Levine, and Zhaohui Feng. 2010. "Energy Metabolism and Antioxidant Function," no. 8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001006107>.
- Hu, Zhiyuan, Cheng Fan, Daniel S Oh, J S Marron, Xiaping He, Bahjat F Qaqish, Chad Livasy, et al. 2006. "The Molecular Portraits of Breast Tumors Are Conserved across Microarray Platforms." *BMC Genomics* 7 (April): 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-96>.
- Hughes, Michelle A., Ian R. Powley, Rebekah Jukes-Jones, Sebastian Horn, Maria Feoktistova, Louise Fairall, John W.R. Schwabe, Martin Leverkus, Kelvin Cain, and Marion MacFarlane. 2016. "Co-Operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate." *Molecular Cell* 61 (6): 834–49. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.023>.
- Humphreys, Luke, Margarita Espona-Fiedler, and Daniel B Longley. 2018. "FLIP as a Therapeutic Target in Cancer." *The FEBS Journal*, May. <https://doi.org/10.1111/febs.14523>.
- Hymowitz, Sarah G, Mark P O'Connell, Mark H Ultsch, Amy Hurst, Klara Totpal, Avi Ashkenazi, Abraham M de Vos, and Robert F Kelley. 2000. "A Unique Zinc-Binding Site Revealed by a High-Resolution X-Ray Structure of Homotrimeric Apo2L/TRAIL." *Biochemistry* 39 (4): 633–40. <https://doi.org/10.1021/bi992242l>.
- Ibrahim, Yasir H, Celina Garcia-Garcia, Violeta Serra, Lei He, Kristine Torres-Lockhart, Aleix Prat, Pilar Anton, et al. 2012. "PI3K Inhibition Impairs BRCA1/2 Expression and Sensitizes BRCA-Proficient Triple-Negative Breast Cancer to PARP Inhibition." *Cancer Discovery* 2 (11): 1036–47. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0348>.
- Iglehart, J. D., R. M. York, A. P. Modest, H. Lazarus, and D. M. Livingston. 1977. "Cystine Requirement of Continuous Human Lymphoid Cell Lines of Normal and Leukemic Origin." *Journal of Biological Chemistry* 252 (20): 7184–91.
- Irmeler, Martin, Margot Thome, Michael Hahne, Pascal Schneider, Kay Hofmann, Véronique Steiner, Jean Luc Bodmer, et al. 1997. "Inhibition of Death Receptor Signals by Cellular

- FLIP." *Nature* 388 (6638): 190–95. <https://doi.org/10.1038/40657>.
- J Riedl, Stefan, and Yigong Shi. 2004. *Riedl SJ, Shi Y.. Molecular Mechanisms of Caspase Regulation during Apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 897-907. Nature Reviews. Molecular Cell Biology. Vol. 5.* <https://doi.org/10.1038/nrm1496>.
- Jin, Zhaoyu, Yun Li, Robert Pitti, David Lawrence, Victoria C. Pham, Jennie R. Lill, and Avi Ashkenazi. 2009. "Cullin3-Based Polyubiquitination and P62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling." *Cell* 137 (4): 721–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.015>.
- Jo, M, T H Kim, D W Seol, J E Esplen, K Dorko, T R Billiar, and S C Strom. 2000. "Apoptosis Induced in Normal Human Hepatocytes by Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand." *Nature Medicine* 6 (5): 564–67. <https://doi.org/10.1038/75045>.
- Karstedt, Silvia Von, Antonella Montinaro, and Henning Walczak. 2017. "Exploring the TRAILs Less Travelled: TRAIL in Cancer Biology and Therapy." *Nature Reviews Cancer* 17 (6): 352–66. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.28>.
- Kaunisto, A, V Kochin, T Asaoka, A Mikhailov, M Poukkula, A Meinander, and J E Eriksson. 2009. "PKC-Mediated Phosphorylation Regulates c-FLIP Ubiquitylation and Stability." *Cell Death and Differentiation* 16 (9): 1215–26. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.35>.
- Kayagaki, N, N Yamaguchi, M Nakayama, K Takeda, H Akiba, H Tsutsui, H Okamura, K Nakanishi, K Okumura, and H Yagita. 1999. "Expression and Function of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand on Murine Activated NK Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (4): 1906–13. https://doi.org/ji_v163n4p1906 [pii].
- Kerr, J F, A H Wyllie, and A R Currie. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26 (4): 239–57.
- Kidd, JG. 1953. "Regression of Transplanted Lymphomas Induced in Vivo by Means of Normal Guinea Pig Serum." *J Exp Med* 98: 565–82.
- Kilberg, M S, Y-X Pan, H Chen, and V Leung-Pineda. 2005. "Nutritional Control of Gene Expression: How Mammalian Cells Respond to Amino Acid Limitation." *Annual Review of Nutrition* 25: 59–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132145>.
- Kim, H.-E., F. Du, M. Fang, and X. Wang. 2005. "Formation of Apoptosome Is Initiated by Cytochrome C-Induced DATP Hydrolysis and Subsequent Nucleotide Exchange on Apaf-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (49): 17545–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507900102>.
- Kim, Sung Ouk, Koh Ono, and Jiahuai Han. 2001. "Apoptosis by Pan-Caspase Inhibitors in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 281 (5): L1095–1105. <http://ajplung.physiology.org/content/281/5/L1095%5Cnhttp://ajplung.physiology.org/content/281/5/L1095.full.pdf>.
- Kinnaird, Adam, Steven Zhao, Kathryn E. Wellen, and Evangelos D. Michelakis. 2016. "Metabolic Control of Epigenetics in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 16 (11): 694–707. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.82>.
- Kischkel, F C, D A Lawrence, A Chuntharapai, P Schow, K J Kim, and A Ashkenazi. 2000. "Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death

- Receptors 4 and 5." *Immunity* 12 (6): 611–20.
- Kohlhaas, Susan L., Andrew Craxton, Xiao-Ming Sun, Michael J. Pinkoski, and Gerald M. Cohen. 2007. "Receptor-Mediated Endocytosis Is Not Required for Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Induced Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 282 (17): 12831–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700438200>.
- Komander, David, Michael J Clague, and Sylvie Urbe. 2009. "Breaking the Chains: Structure and Function of the Deubiquitinases." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (8): 550–63. <https://doi.org/10.1038/nrm2731>.
- Korangath, Preethi, Wei Wen Teo, Helen Sadik, Liangfeng Han, Noriko Mori, Charlotte M Huijts, Flonne Wildes, et al. 2015. "Targeting Glutamine Metabolism in Breast Cancer with Aminooxyacetate." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (14): 3263–73. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1200>.
- Koromilas, Antonis E. 2015. "Roles of the Translation Initiation Factor EIF2 α Serine 51 Phosphorylation in Cancer Formation and Treatment." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1849 (7): 871–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.12.007>.
- Koschny, Ronald, Tom M. Ganten, Jaromir Sykora, Tobias L. Haas, Martin R. Sprick, Armin Kolb, Wolfgang Stremmel, and Henning Walczak. 2007. "TRAIL/Bortezomib Cotreatment Is Potentially Hepatotoxic but Induces Cancer-Specific Apoptosis within a Therapeutic Window." *Hepatology* 45 (3): 649–58. <https://doi.org/10.1002/hep.21555>.
- Krajcovic, M., S. Krishna, L. Akkari, J. A. Joyce, and M. Overholtzer. 2013. "MTOR Regulates Phagosome and Entotic Vacuole Fission." *Molecular Biology of the Cell* 24 (23): 3736–45. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-07-0408>.
- Krishnapura, Prajna Rao, Prasanna D Belur, and Sandeep Subramanya. 2016. "A Critical Review on Properties and Applications of Microbial L-Asparaginases." *Critical Reviews in Microbiology* 42 (5): 720–37. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1022505>.
- Kroemer, Guido, and Beth Levine. 2008. "Autophagic Cell Death: The Story of a Misnomer." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (12): 1004–10. <https://doi.org/10.1038/nrm2527>.
- Kung, Hsiu-Ni, Jeffrey R Marks, and Jen-Tsan Chi. 2011. "Glutamine Synthetase Is a Genetic Determinant of Cell Type-Specific Glutamine Independence in Breast Epithelia." *PLOS Genetics* 7 (8): e1002229. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002229>.
- Kuo, Tsang Chih, Chi Kuan Chen, Kuo Tai Hua, Pei Yu, Wei Jiunn Lee, Min Wei Chen, Yung Ming Jeng, et al. 2017. "Glutaminase 2 Stabilizes Dicer to Repress Snail and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma Cells." *Cancer Letters* 393 (2): 130–31. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.01.021>.
- Lacey, David L., William J. Boyle, W. Scott Simonet, Paul J. Kostenuik, William C. Dougall, John K. Sullivan, Javier San Martin, and Roger Dansey. 2012. "Bench to Bedside: Elucidation of the OPG-RANK-RANKL Pathway and the Development of Denosumab." *Nature Reviews Drug Discovery* 11 (5): 401–19. <https://doi.org/10.1038/nrd3705>.
- Lanvers-Kaminsky, Claudia. 2017. "Asparaginase Pharmacology: Challenges Still to Be Faced." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 79 (3): 439–50.

<https://doi.org/10.1007/s00280-016-3236-y>.

- Le, Anne, Andrew N Lane, Max Hamaker, Sminu Bose, Arvin Gouw, Joseph Barbi, Takashi Tsukamoto, et al. 2012. "Glucose-Independent Glutamine Metabolism via TCA Cycling for Proliferation and Survival in B Cells." *Cell Metabolism* 15 (1): 110–21. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.009>.
- Lee, Jong-Soo, Qinglin Li, June-Yong Lee, Sun-Hwa Lee, Joseph H Jeong, Hye-Ra Lee, Heesoon Chang, et al. 2009. "FLIP-Mediated Autophagy Regulation in Cell Death Control." *Nature Cell Biology* 11 (11): 1355–62. <https://doi.org/10.1038/ncb1980>.
- Lehmann, Brian D Bd, Joshua a Ja Bauer, Xi Chen, Melinda E Sanders, a Bapsi Chakravarthy, Yu Shyr, and Jennifer a Pietenpol. 2011. "Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies." *Journal of Clinical Investigation* 121 (7): 2750–67. <https://doi.org/10.1172/JCI45014DS1>.
- Lemke, J., S. Von Karstedt, J. Zinngrebe, and H. Walczak. 2014. "Getting TRAIL Back on Track for Cancer Therapy." *Cell Death and Differentiation* 21 (9): 1350–64. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.81>.
- Lemke, J, S von Karstedt, M Abd El Hay, A Conti, F Arce, A Montinaro, K Papenfuss, M A El-Bahrawy, and H Walczak. 2014. "Selective CDK9 Inhibition Overcomes TRAIL Resistance by Concomitant Suppression of CFLIP and Mcl-1." *Cell Death and Differentiation* 21 (3): 491–502. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.179>.
- Li, Doudou, Zhiqiang Fu, Ruiwan Chen, Xiaohui Zhao, Yu Zhou, Bing Zeng, Min Yu, et al. 2015. "Inhibition of Glutamine Metabolism Counteracts Pancreatic Cancer Stem Cell Features and Sensitizes Cells to Radiotherapy." *Oncotarget* 6 (31): 31151–63. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5150>.
- Li, J., and J. Yuan. 2008. "Caspases in Apoptosis and Beyond." *Oncogene* 27 (48): 6194–6206. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>.
- Liang, Ye, Wenhua Xu, Shihai Liu, Jingwei Chi, Jisheng Zhang, Aihua Sui, Liping Wang, et al. 2018. "N-Acetyl-Glucosamine Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Activating Death Receptor 5." *Cellular Physiology and Biochemistry* 45 (5): 2054–70. <https://doi.org/10.1159/000488042>.
- Linkermann, Andreas, and Douglas R Green. 2014. "Necroptosis." *The New England Journal of Medicine* 370 (5): 455–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1310050>.
- Llambi, Fabien, Tudor Moldoveanu, Stephen W G Tait, Lisa Bouchier-Hayes, Jamshid Temirov, Laura L McCormick, Christopher P Dillon, and Douglas R Green. 2011. "A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria." *Molecular Cell* 44 (4): 517–31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.001>.
- Lockshin, R.A., and CM Williams. 1964. "Programmed Cell Death-II. Endocrine Potentiation of the Breakdown of the Intersegmental Muscles of Silkworms." *Journal of Insect Physiology* 10: 643–49.
- Loo, G. van, M. van Gurp, B. Depuydt, S. M. Srinivasula, I. Rodriguez, E. S. Alnemri, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, W. Declercq, and P. Vandenabeele. 2002. "The Serine Protease Omi/HtrA2 Is Released from Mitochondria during Apoptosis. Omi Interacts with Caspase-Inhibitor XIAP and Induces Enhanced Caspase Activity." *Cell Death and Differentiation* 9 (1): 20–26. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400970>.

- Lorenzi, P L, W K Chan, A Anishkin, P Purwaha, D M Rogers, S Sukharev, S B Rempe, and J N Weinstein. 2013. "The Glutaminase Activity Of L-Asparaginase Is Not Required For Anticancer Activity Against Asns-Negative Cell Lines." *Blood* 122 (21): 1. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535112.W.K.C>.
- Lorsch, Jon R., and Thomas E. Dever. 2010. "Molecular View of 43 S Complex Formation and Start Site Selection in Eukaryotic Translation Initiation." *Journal of Biological Chemistry* 285 (28): 21203–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.119743>.
- Lu, Linrong, An-ping Han, and Jane-jane Chen. 2001. "Translation Initiation Control by Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase in Erythroid Cells under Cytoplasmic Stresses Translation Initiation Control by Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase in Erythroid Cells under Cytopl." *Mol Cell Biol* 21 (23): 7971–80. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.7971>.
- Lu, Min, Scot Marsters, Xiaofen Ye, Elizabeth Luis, Lino Gonzalez, and Avi Ashkenazi. 2014. "E-Cadherin Couples Death Receptors to the Cytoskeleton to Regulate Apoptosis." *Molecular Cell* 54 (6): 987–98. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.029>.
- Lu, Phoebe D., Heather P. Harding, and David Ron. 2004. "Translation Reinitiation at Alternative Open Reading Frames Regulates Gene Expression in an Integrated Stress Response." *Journal of Cell Biology* 167 (1): 27–33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408003>.
- Lu, Shelly C. 2009. "Regulation of Glutathione Synthesis." *Molecular Aspects of Medicine* 30 (1–2): 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>.
- Luengo, Alba, Dan Y. Gui, and Matthew G. Vander Heiden. 2017. "Targeting Metabolism for Cancer Therapy." *Cell Chemical Biology* 24 (9): 1161–80. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.08.028>.
- Lukey, Michael J., Kristin F. Wilson, and Richard A. Cerione. 2013. "Therapeutic Strategies Impacting Cancer Cell Glutamine Metabolism." *Future Medicinal Chemistry* 5 (14): 1685–1700. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.130>.
- Mahalingam, D, A Natoni, M Keane, A Samali, and E Szegezdi. 2010. "Early Growth Response-1 Is a Regulator of DR5-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells." *British Journal of Cancer* 102 (4): 754–64. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605545>.
- Malladi, Srinivas, Howard O Fearnhead, and Shawn B Bratton. 2009. "The Apaf1-ProCaspase9 Apoptosome Complex Functions as a Proteolytic-Based Molecular Timer." *The EMBO Journal* 28 (13): 1916–25. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.152>.
- Martin-Perez, Rosa, Carmen Palacios, Rosario Yerbés, Ana Cano-Gonzalez, Daniel Iglesias-Serret, Joan Gil, Mauricio J Reginato, and Abelardo Lopez-Rivas. 2014. "Activated ERBB2/HER2 Licenses Sensitivity to Apoptosis upon Endoplasmic Reticulum Stress through a PERK-Dependent Pathway." *Cancer Research* 74 (6): 1766–77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1747>.
- Matthess, Y., M. Raab, M. Sanhaji, I. N. Lavrik, and K. Strebhardt. 2010. "Cdk1/Cyclin B1 Controls Fas-Mediated Apoptosis by Regulating Caspase-8 Activity." *Molecular and Cellular Biology* 30 (24): 5726–40. <https://doi.org/10.1128/MCB.00731-10>.
- Medina, M. Á., F Sánchez-Jiménez, J Márquez, A. R. Quesada, and I. Núñez de Castro. 1992. "Relevance of Glutamine Metabolism to Tumor Cell Growth." *Molecular and Cellular*

Biochemistry 113: 1–15. <https://doi.org/10.1007/BF00230880>.

- Metallo, Christian M., Paulo A. Gameiro, Eric L. Bell, Katherine R. Mattaini, Juanjuan Yang, Karsten Hiller, Christopher M. Jewell, et al. 2012. "Reductive Glutamine Metabolism by IDH1 Mediates Lipogenesis under Hypoxia." *Nature* 481 (7381): 380–84. <https://doi.org/10.1038/nature10602>.
- Micheau, O, S Lens, O Gaide, K Alevizopoulos, and J Tschopp. 2001. "NF-KappaB Signals Induce the Expression of c-FLIP." *Molecular and Cellular Biology* 21 (16): 5299–5305. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5299-5305.2001>.
- Micheau, Olivier, Margot Thome, Pascal Schneider, Nils Holler, Jürg Tschopp, Donald W. Nicholson, Christophe Briand, and Markus G. Grütter. 2002. "The Long Form of FLIP Is an Activator of Caspase-8 at the Fas Death-Inducing Signaling Complex." *Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 45162–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206882200>.
- Miguel, D. De, J. Lemke, A. Anel, H. Walczak, and L. Martinez-Lostao. 2016. "Onto Better TRAILs for Cancer Treatment." *Cell Death and Differentiation* 23 (5): 733–47. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.174>.
- Miyashita, T., A. Kawakami, T. Nakashima, S. Yamasaki, M. Tamai, F. Tanaka, M. Kamachi, et al. 2004. "Osteoprotegerin (OPG) Acts as an Endogenous Decoy Receptor in Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Mediated Apoptosis of Fibroblast-like Synovial Cells." *Clinical and Experimental Immunology* 137 (2): 430–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02534.x>.
- Morizane, Yoshihito, Reiko Honda, Kiyoko Fukami, and Hideyo Yasuda. 2005. "X-Linked Inhibitor of Apoptosis Functions as Ubiquitin Ligase toward Mature Caspase-9 and Cytosolic Smac/DIABLO." *Journal of Biochemistry* 137 (2): 125–32. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi029>.
- Mullen, Andrew R., William W. Wheaton, Eunsook S. Jin, Pei Hsuan Chen, Lucas B. Sullivan, Tzuling Cheng, Youfeng Yang, W. Marston Linehan, Navdeep S. Chandel, and Ralph J. Deberardinis. 2012. "Reductive Carboxylation Supports Growth in Tumour Cells with Defective Mitochondria." *Nature* 481 (7381): 385–88. <https://doi.org/10.1038/nature10642>.
- Neophytou, Christiana, Panagiotis Boutsikos, and Panagiotis Papageorgis. 2018. "Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutic Targets of Triple-Negative Breast Cancer Metastasis." *Frontiers in Oncology* 8 (February). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00031>.
- Nguyen, T. Van, J. Eugene Lee, Michael J. Sweredoski, Seung Joo Yang, Seung Je Jeon, Joseph S. Harrison, Jung Hyuk Yim, et al. 2016. "Glutamine Triggers Acetylation-Dependent Degradation of Glutamine Synthetase via the Thalidomide Receptor Cereblon." *Molecular Cell* 61 (6): 809–20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.032>.
- Nguyen, T, X D Zhang, and P Hersey. 2001. "Relative Resistance of Fresh Isolates of Melanoma to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Induced Apoptosis." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 7 (3 Suppl): 966s–973s.
- Nicklin, Paul, Philip Bergman, Bailin Zhang, Ellen Triantafellow, Henry Wang, Beat Nyfeler, Haidi Yang, et al. 2009. "Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates MTOR and

- Autophagy." *Cell* 136 (3): 521–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044>.
- Niu, Zhaoxia, Huaying Liu, Ming Zhou, Heran Wang, Yukun Liu, Xiayu Li, Wei Xiong, Jian Ma, Xiaoling Li, and Guiyuan Li. 2015. "Knockdown of C-Myc Inhibits Cell Proliferation by Negatively Regulating the Cdk / Rb / E2F Pathway in Nasopharyngeal Carcinoma Cells" 47 (January 2015): 183–91. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmu129>.
- Nutt, Leta K, Marisa R Buchakjian, Eugene Gan, Rashid Darbandi, Sook-Young Yoon, Judy Q Wu, Yuko J Miyamoto, et al. 2009. "Metabolic Control of Oocyte Apoptosis Mediated by 14-3-3zeta-Regulated Dephosphorylation of Caspase-2." *Developmental Cell* 16 (6): 856–66. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.04.005>.
- Ollenschläger, G., E. Roth, W. Linkesch, S. Jansen, A. Simmel, and B. Modder. 1988. "Asparaginase-induced Derangements of Glutamine Metabolism: The Pathogenetic Basis for Some Drug-related Side-effects." *European Journal of Clinical Investigation* 18 (5): 512–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1988.tb01049.x>.
- Ortlund, Eric, Michael W Lacount, Krzysztof Lewinski, and Lukasz Lebioda. 2000. "Reactions of Pseudomonas 7A Glutaminase-Asparaginase with Diazo Analogues of Glutamine and Asparagine Result in Unexpected Covalent Inhibitions and Suggests an Unusual Catalytic Triad Thr-Tyr-Glu,." *Biochemistry* 39 (6): 1199–1204. <https://doi.org/10.1021/bi991797d>.
- Palacios, Carmen, Rosario Yerbes, and Abelardo López-Rivas. 2006. "Flavopiridol Induces Cellular FLICE-Inhibitory Protein Degradation by the Proteasome and Promotes TRAIL-Induced Early Signaling and Apoptosis in Breast Tumor Cells." *Cancer Research* 66 (17): 8858–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0808>.
- Panayotova-Dimitrova, Diana, Maria Feoktistova, Michaela Ploesser, Beate Kellert, Mike Hupe, Sebastian Horn, Roman Makarov, et al. 2013. "CFLIP Regulates Skin Homeostasis and Protects against TNF-Induced Keratinocyte Apoptosis." *Cell Reports* 5 (2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.035>.
- Parzych, Katherine R., and Daniel J. Klionsky. 2014. "An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation." *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (3): 460–73. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>.
- Pattabiraman, Diwakar R, and Robert A Weinberg. 2014. "Tackling the Cancer Stem Cells - What Challenges Do They Pose?" *Nature Reviews. Drug Discovery*. England. <https://doi.org/10.1038/nrd4253>.
- Peiris-Pages, Maria, Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Richard G. Pestell, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. 2016. "Cancer Stem Cell Metabolism." *Breast Cancer Research* 18 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0712-6>.
- Perou, C.M. Charles M., Therese Sørile, M.B. Michael B. Eisen, Matt van de Rijn, Stefanie S.S. Jeffrey, C.A. Christian A. Rens, J.R. Jonathan R. Pollack, et al. 2000. "Molecular Portraits of Human Breast Tumours." *Nature* 406 (6797): 747–52. <https://doi.org/10.1038/35021093>.
- Pistritto, G, M Jost, S M Srinivasula, R Baffa, J-L Poyet, C Kari, Y Lazebnik, U Rodeck, and E S Alnemri. 2002. "Expression and Transcriptional Regulation of Caspase-14 in Simple and Complex Epithelia." *Cell Death and Differentiation* 9 (9): 995–1006. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401061>.
- Ponti, Dario, Nadia Zaffaroni, Chiara Capelli, and Maria Grazia Daidone. 2006. "Breast Cancer Stem Cells: An Overview." *European Journal of Cancer* 42 (9): 1219–24.

- <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.031>.
- Pop, Cristina, and Guy S. Salvesen. 2009. "Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation." *Journal of Biological Chemistry* 284 (33): 21777–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800084200>.
- Proud, C G. 2001. "Regulation of Eukaryotic Initiation Factor EIF2B." *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 26: 95–114.
- Qin, J. Z., H. Xin, and B. J. Nickoloff. 2010. "Targeting Glutamine Metabolism Sensitizes Melanoma Cells to TRAIL-Induced Death." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398 (1): 146–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.057>.
- Ricci, M Stacey, Zhaoyu Jin, Michael Dews, Duonan Yu, Andrei Thomas-Tikhonenko, David T Dicker, and Wafik S El-Deiry. 2004. "Direct Repression of FLIP Expression by C-Myc Is a Major Determinant of TRAIL Sensitivity." *Molecular and Cellular Biology* 24 (19): 8541–55. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8541-8555.2004>.
- Robinson, Mary M., Steven J. McBryant, Takashi Tsukamoto, Camilo Rojas, Dana V. Ferraris, Sean K. Hamilton, Jeffrey C. Hansen, and Norman P. Curthoys. 2007. "Novel Mechanism of Inhibition of Rat Kidney-Type Glutaminase by Bis-2-(5-Phenylacetamido-1,2,4-Thiadiazol-2-Yl)Ethyl Sulfide (BPTES)." *Biochemical Journal* 406 (3): 407–14. <https://doi.org/10.1042/BJ20070039>.
- Rossin, Aurélie, Mathieu Derouet, Fadi Abdel-Sater, and Anne-Odile Hueber. 2009. "Palmitoylation of the TRAIL Receptor DR4 Confers an Efficient TRAIL-Induced Cell Death Signalling." *Biochemical Journal* 419 (1): 185 LP-194. <http://www.biochemj.org/content/419/1/185.abstract>.
- Safa, A R. 2012. "C-FLIP, a Master Anti-Apoptotic Regulator." *Experimental Oncology* 34 (3): 176–84.
- Salon, C, B Eymin, O Micheau, L Chaperot, J Plumas, C Brambilla, E Brambilla, and S Gazzeri. 2006. "E2F1 Induces Apoptosis and Sensitizes Human Lung Adenocarcinoma Cells to Death-Receptor-Mediated Apoptosis through Specific Downregulation of c-FLIP(Short)." *Cell Death and Differentiation* 13 (2): 260–72. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401739>.
- Saunders, J.W. 1966. "Death in Embryonic Systems." *Science* 154.
- Schröder, Martin, and Randal J. Kaufman. 2005. "The Mammalian Unfolded Protein Response." *Annual Review of Biochemistry* 74 (1): 739–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>.
- Shah, Sohrab P, Andrew Roth, Rodrigo Goya, Arusha Oloumi, Gavin Ha, Yongjun Zhao, Gulisa Turashvili, et al. 2012. "The Clonal and Mutational Evolution Spectrum of Primary Triple-Negative Breast Cancers." *Nature* 486 (7403): 395–99. <https://doi.org/10.1038/nature10933>.
- Shalini, S., L. Dorstyn, S. Dawar, and S. Kumar. 2015. "Old, New and Emerging Functions of Caspases." *Cell Death and Differentiation* 22 (4): 526–39. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>.
- Simons, Kai, and Elina Ikonen. 1997. "Functional Rafts in Cell Membranes." *Nature* 387 (6633): 569–72. <https://doi.org/10.1038/42408>.

- Skurk, Carsten, Henrike Maatz, Hyo-Soo Kim, Jiang Yang, Md Ruhul Abid, William C Aird, and Kenneth Walsh. 2004. "The Akt-Regulated Forkhead Transcription Factor FOXO3a Controls Endothelial Cell Viability through Modulation of the Caspase-8 Inhibitor FLIP." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2): 1513–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304736200>.
- Sorlie, T, C M Perou, R Tibshirani, T Aas, S Geisler, H Johnsen, T Hastie, et al. 2001. "Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19): 10869–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.
- Sotiriou, Christos, Soek-Ying Neo, Lisa M McShane, Edward L Korn, Philip M Long, Amir Jazaeri, Philippe Martiat, Steve B Fox, Adrian L Harris, and Edison T Liu. 2003. "Breast Cancer Classification and Prognosis Based on Gene Expression Profiles from a Population-Based Study." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (18): 10393–98. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100>.
- Stalneck, Clint A., Scott M. Ulrich, Yunxing Li, Sekar Ramachandran, Mary Kate McBrayer, Ralph J. DeBerardinis, Richard A. Cerione, and Jon W. Erickson. 2015. "Mechanism by Which a Recently Discovered Allosteric Inhibitor Blocks Glutamine Metabolism in Transformed Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (2): 394–99. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414056112>.
- Still, Emma R., and Mariia O. Yuneva. 2017. "Hopefully Devoted to Q: Targeting Glutamine Addiction in Cancer." *British Journal of Cancer* 116 (11): 1375–81. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.113>.
- Strasser, Andreas, Suzanne Cory, and Jerry M. Adams. 2011. "Deciphering the Rules of Programmed Cell Death to Improve Therapy of Cancer and Other Diseases." *EMBO Journal* 30 (18): 3667–83. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.307>.
- Tait, Stephen W. G., and Douglas R. Green. 2010. "Mitochondria and Cell Death: Outer Membrane Permeabilization and Beyond." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (9): 621–32. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>.
- Tannishtha, Reya, Sean J Morrison, Michael F Clarke, and Irving L Weissman. 2001. "Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells." *Nature* 414 (November): 105–11. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-933-8>.
- Taylor, Rebecca C., Sean P. Cullen, and Seamus J. Martin. 2008. "Apoptosis: Controlled Demolition at the Cellular Level." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (3): 231–41. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>.
- Thornburg, Joshua M., Kristin K. Nelson, Brian F. Clem, Andrew N. Lane, Sengodagounder Arumugam, Allan Simmons, John W. Eaton, Sucheta Telang, and Jason Chesney. 2008. "Targeting Aspartate Aminotransferase in Breast Cancer." *Breast Cancer Research* 10 (5): 1–12. <https://doi.org/10.1186/bcr2154>.
- Timmerman, Luika A, Thomas Holton, Mariia Yuneva, Raymond J Louie, Anneleen Daemen, Min Hu, Denise A Chan, et al. 2013. "Glutamine Sensitivity Analysis Identifies the XCT Antiporter as a Common Triple-Negative Basal-like Breast Cancer." *Cancer Cell* 24 (4): 450–65. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.020.Glutamine>.
- Todaro, M, Y Lombardo, M G Francipane, M Perez Alea, P Cammareri, F Iovino, A B Di Stefano,

- et al. 2008. "Apoptosis Resistance in Epithelial Tumors Is Mediated by Tumor-Cell-Derived Interleukin-4." *Cell Death and Differentiation* 15 (4): 762–72. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402305>.
- Tomao, Federica, Anselmo Papa, Eleonora Zaccarelli, Luigi Rossi, Davide Caruso, Marina Minozzi, Patrizia Vici, Luigi Frati, and Silverio Tomao. 2015. "Triple-Negative Breast Cancer: New Perspectives for Targeted Therapies." *OncoTargets and Therapy* 8: 177–93. <https://doi.org/10.2147/OTT.S67673>.
- Trabzuni, D, K S Famulski, and M Ahmad. 2000. "Functional Analysis of Tumour Necrosis Factor-Alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL): Cysteine-230 Plays a Critical Role in the Homotrimerization and Biological Activity of This Novel Tumoricidal Cytokine." *The Biochemical Journal* 350 Pt 2 (September): 505–10.
- Truneh, Alemseged, Sunita Sharma, Carol Silverman, Sanjay Khandekar, P Manjula, Keith C Deen, Megan M Mclaughlin, et al. 2000. "Temperature-Sensitive Differential Affinity of TRAIL for Its Receptors. DR5 Is the Highest Affinity Receptor." *J Biol Chem* 275 (30): 23319–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910438199>.
- Tuthill, Mark H, Antonella Montinaro, Julia Zinngrebe, Katharina Prieske, Peter Draber, Stefan Prieske, Tom Newsom-Davis, Silvia von Karstedt, Jonathan Graves, and Henning Walczak. 2015. "TRAIL-R2-Specific Antibodies and Recombinant TRAIL Can Synergise to Kill Cancer Cells." *Oncogene* 34 (16): 2138–44. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.156>.
- Vallejos, Carlos S, Henry L Gomez, Wilder R Cruz, Joseph A Pinto, Richard R Dyer, Raul Velarde, Juan F Suazo, et al. 2010. "Breast Cancer Classification According to Immunohistochemistry Markers: Subtypes and Association with Clinicopathologic Variables in a Peruvian Hospital Database." *Clinical Breast Cancer* 10 (4): 294–300. <https://doi.org/10.3816/CBC.2010.n.038>.
- Varfolomeev, Eugene E., Marcus Schuchmann, Victor Luria, Nuchanard Chiannikulchai, Jacques S. Beckmann, Igor L. Mett, Denis Rebrikov, et al. 1998. "Targeted Disruption of the Mouse Caspase 8 Gene Ablates Cell Death Induction by the TNF Receptors, Fas/Apo1, and DR3 and Is Lethal Prenatally." *Immunity* 9 (2): 267–76. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80609-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80609-3).
- Venkitaraman, Ashok R. 2009. "Linking the Cellular Functions of BRCA Genes to Cancer Pathogenesis and Treatment." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 4 (1): 461–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.151422>.
- Wagner, Klaus W., Elizabeth A. Punnoose, Thomas Januario, David A. Lawrence, Robert M. Pitti, Kate Lancaster, Dori Lee, et al. 2007. "Death-Receptor O-Glycosylation Controls Tumor-Cell Sensitivity to the Proapoptotic Ligand Apo2L/TRAIL." *Nature Medicine* 13 (9): 1070–77. <https://doi.org/10.1038/nm1627>.
- Walczak, H, R E Miller, K Ariail, B Gliniak, T S Griffith, M Kubin, W Chin, et al. 1999. "Tumoricidal Activity of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Vivo." *Nature Medicine* 5 (2): 157–63. <https://doi.org/10.1038/5517>.
- Wallach, D, M Boldin, E Varfolomeev, R Beyaert, P Vandenabeele, and W Fiers. 1997. "Cell Death Induction by Receptors of the TNF Family: Towards a Molecular Understanding." *FEBS Letters* 410 (1): 96–106.
- Wang, Haizhen, Jennifer S Davis, and Xiangwei Wu. 2014. "Immunoglobulin Fc Domain Fusion

- to TRAIL Significantly Prolongs Its Plasma Half-Life and Enhances Its Antitumor Activity.” *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (3): 643–50. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0645>.
- Wang, Jian-bin, Jon W Erickson, Reina Fuji, Sekar Ramachandran, Ping Gao, Ramani Dinavahi, Kristin F Wilson, et al. 2010. “Targeting Mitochondrial Glutaminase Activity Inhibits Oncogenic Transformation.” *Cancer Cell* 18 (3): 207–19. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.08.009>.Targeting.
- Wang, Yan, and Zheng-hong Qin. 2010. “Molecular and Cellular Mechanisms of Excitotoxic Neuronal Death.” *Apoptosis* 15 (11): 1382–1402. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0481-0>.
- Westphal, Dana, Grant Dewson, Peter E. Czabotar, and Ruth M. Kluck. 2011. “Molecular Biology of Bax and Bak Activation and Action.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813 (4): 521–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.019>.
- Willems, Lise, Nathalie Jacque, Arnaud Jacquet, Nathalie Neveux, Thiago Trovati Maciel, Alain Schmitt, Laury Poulain, et al. 2013. “Inhibiting Glutamine Uptake Represents an Attractive New Strategy for Treating Acute Myeloid Leukemia Inhibiting Glutamine Uptake Represents an Attractive New Strategy for Treating Acute Myeloid Leukemia” 122 (20): 3521–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-493163>.
- Willis, Simon N. 2007. “Apoptosis Initiated When BH3 Ligands.” *Science* 315 (February): 856–59. <https://doi.org/10.1126/science.1133289>.
- Wilt, L H A M de, J Kroon, G Jansen, S de Jong, G J Peters, and F A E Kruyt. 2013. “Bortezomib and TRAIL: A Perfect Match for Apoptotic Elimination of Tumour Cells?” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 85 (3): 363–72. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.08.001>.
- Wise, D. R., R. J. DeBerardinis, A. Mancuso, N. Sayed, X.-Y. Zhang, H. K. Pfeiffer, I. Nissim, et al. 2008. “Myc Regulates a Transcriptional Program That Stimulates Mitochondrial Glutaminolysis and Leads to Glutamine Addiction.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (48): 18782–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810199105>.
- Wise, David R, and Craig B Thompson. 2010. “Glutamine Addiction: A New Therapeutic Target in Cancer.” *Trends in Biochemical Sciences* 35 (8): 427–33. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003>.
- Wittkopf, Nadine, Claudia Günther, Eva Martini, Guiwei He, Kerstin Amann, You-Wen He, Marcus Schuchmann, Markus F Neurath, and Christoph Becker. 2013. “Cellular FLICE-Like Inhibitory Protein Secures Intestinal Epithelial Cell Survival and Immune Homeostasis by Regulating Caspase-8.” *Gastroenterology* 145 (6): 1369–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.059>.
- Wu, Ming-Chi, Grace K Arimura, and Adel A Yunis. 1978. “Mechanism of Sensitivity of Cultured Pancreatic Carcinoma to Asparaginase.” *International Journal of Cancer* 22 (6): 728–33. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910220615>.
- Wu, Yu-Jung, Yung-Hsuan Wu, Shu-Ting Mo, Huey-Wen Hsiao, You-Wen He, and Ming-Zong Lai. 2015. “Cellular FLIP Inhibits Myeloid Cell Activation by Suppressing Selective Innate Signaling.” *The Journal of Immunology* 195 (6): 2612–23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402944>.

- Wyllie, A H, J F Kerr, and A R Currie. 1980. "Cell Death: The Significance of Apoptosis." *International Review of Cytology* 68: 251–306.
- Xiao, Dingfu, Liming Zeng, Kang Yao, Xiangfeng Kong, Guoyao Wu, and Yulong Yin. 2016. "The Glutamine-Alpha-Ketoglutarate (AKG) Metabolism and Its Nutritional Implications." *Amino Acids* 48 (9): 2067–80. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2254-8>.
- Yang, Chih-Sheng, Eleni Stampouloglou, Nathan M Kingston, Liye Zhang, Stefano Monti, and Xaralabos Varelas. 2018. "Glutamine-utilizing Transaminases Are a Metabolic Vulnerability of TAZ/YAP-activated Cancer Cells." *EMBO Reports*, e43577. <https://doi.org/10.15252/embr.201643577>.
- Ye, Jiangbin, and Constantinos Koumenis. 2009. "ATF4, an ER Stress and Hypoxia-Inducible Transcription Factor and Its Potential Role in Hypoxia Tolerance and Tumorigenesis." *Current Molecular Medicine* 9 (4): 411–16.
- Yeh, Wen Chen, Annick Itie, Andrew J. Elia, Michelle Ng, Hong Bing Shu, Andrew Wakeham, Christine Mirtsos, et al. 2000. "Requirement for Casper (c-FLIP) in Regulation of Death Receptor-Induced Apoptosis and Embryonic Development." *Immunity* 12 (6): 633–42. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80214-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80214-9).
- Yeh, Wen Chen, José Luis De La Pompa, Mila E. McCurrach, Hong Bing Shu, Andrew J. Elia, Arda Shahinian, Michelle Ng, et al. 1998. "FADD: Essential for Embryo Development and Signaling from Some, but Not All, Inducers of Apoptosis." *Science* 279 (5358): 1954–58. <https://doi.org/10.1126/science.279.5358.1954>.
- Yerlikaya, Azmi, Scot R Kimball, and Bruce A Stanley. 2008. "Phosphorylation of EIF2alpha in Response to 26S Proteasome Inhibition Is Mediated by the Haem-Regulated Inhibitor (HRI) Kinase." *The Biochemical Journal* 412 (3): 579–88. <https://doi.org/10.1042/BJ20080324>.
- Yu, Jong W, Philip D Jeffrey, and Yigong Shi. 2009. "Mechanism of Pro-caspase-8 Activation by c-FLIP L."
- Yuneva, Mariia, Nicola Zamboni, Peter Oefner, Ravi Sachidanandam, and Yuri Lazebnik. 2007. "Deficiency in Glutamine but Not Glucose Induces MYC-Dependent Apoptosis in Human Cells." *Journal of Cell Biology* 178 (1): 93–105. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703099>.
- Zhang, Cen, Juan Liu, Yuhan Zhao, Xuétian Yue, Yu Zhu, Xiaolong Wang, Hao Wu, et al. 2016. "Glutaminase 2 Is a Novel Negative Regulator of Small GTPase Rac1 and Mediates P53 Function in Suppressing Metastasis." *ELife* 5: 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.10727>.
- Zhang, J, Q Wang, N Zhu, M Yu, B Shen, J Xiang, and A Lin. 2008. "Cyclic AMP Inhibits JNK Activation by CREB-Mediated Induction of c-FLIP(L) and MKP-1, Thereby Antagonizing UV-Induced Apoptosis." *Cell Death and Differentiation* 15 (10): 1654–62. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.87>.
- Zhang, Ji, Natalya N Pavlova, and Craig B Thompson. 2017. "Cancer Cell Metabolism: The Essential Role of the Nonessential Amino Acid, Glutamine." *The EMBO Journal* 36 (10): 1302–15. <https://doi.org/10.15252/embj.201696151>.
- Zhang, Nu, and You-Wen He. 2005. "An Essential Role for C-FLIP in the Efficient Development of Mature T Lymphocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 202 (3): 395–404. <https://doi.org/10.1084/jem.20050117>.

Zhang, Xu Dong, Agustin Franco, Kieda Myers, Christian Gray, Tam Nguyen, and Peter Hersey. 1999. "Relation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptor and FLICE-Inhibitory Protein Expression to TRAIL-Induced Apoptosis of Melanoma Relation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptor and FLICE- Inhibitory Protein Expressi." *Cancer Research* 59 (7136): 2747–53.

Zinszner, Helene, Masahiko Kuroda, Xiaozhong Wang, Nikoleta Batchvarova, Richard T Lightfoot, Helen Remotti, James L Stevens, and David Ron. 1998. "CHOP Is Implicated in Programmed Cell Death in Response to Impaired Function of the Endoplasmic Reticulum," 982–95.

X-Anexo

ARTICLE

Open Access

Glutamine metabolism regulates FLIP expression and sensitivity to TRAIL in triple-negative breast cancer cells

Marta Mauro-Lizcano¹ and Abelardo López-Rivas^{1,2}

Abstract

Glutamine plays an important role in the metabolism of tumor cells through its contribution to redox homeostasis, bioenergetics, synthesis of macromolecules, and signaling. Triple-negative breast cancers (TNBC) are highly metastatic and associated with poor prognosis. TNBC cells show a marked dependence on extracellular glutamine for growth. Herein we demonstrate that TNBC cells are markedly sensitized to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis upon glutamine deprivation. Upregulation of pro-apoptotic TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2/DR5) and downregulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP) are observed in glutamine-deprived TNBC cells. Activation of the amino-acid-sensing kinase general control nonderepressible 2 (GCN2) upon glutamine deprivation is responsible for TRAIL-R2 upregulation through a signaling pathway involving ATF4 and CHOP transcription factors. In contrast, FLIP downregulation in glutamine-deprived TNBC occurs by a GCN2-independent mechanism. Importantly, silencing FLIP expression by RNA interference results in a marked sensitization of TNBC cells to TRAIL-induced apoptosis. In addition, pharmacological or genetic inhibition of transaminases increases TRAIL-R2 expression and downregulates FLIP levels, sensitizing TNBC cells to TRAIL. Interestingly, treatment with L-asparaginase markedly sensitizes TNBC cells to TRAIL through its glutaminase activity. Overall, our findings suggest that targeting the glutamine addiction phenotype of TNBC can be regarded as a potential antitumoral target in combination with agonists of proapoptotic TRAIL receptors.

Introduction

Oncogenic transformation leads to alterations in glutamine metabolism^{1,2} and makes transformed cells highly dependent on glutamine³. Triple-negative breast cancer (TNBC) is a heterogeneous group of breast cancer characterized by the absence of expression of estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors, and lack of HER2 receptor gene amplification⁴. Patients with TNBC have a poor prognosis and a high rate of early relapse. TNBC still pose a major challenge in cancer management, being

conventional chemotherapy the only therapeutic option⁵. Interestingly, different studies have demonstrated that TNBC cells are dependent on exogenous glutamine for survival and growth^{6,7}. In this regard, inhibitors of glutamine transport and metabolism have been proposed as potential antitumor therapies^{6,8}. However, targeting glutamine metabolism for cancer therapy may require identification of synergistic combinations with other therapeutic treatments to selectively target tumor cells in cancer patients and thus prevent unacceptable toxicity⁹.

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a member of the TNF family that induces apoptosis selectively in a wide variety of cancer cells^{10,11}. Binding of TRAIL to its pro-apoptotic receptors leads to the formation of a death-inducing signaling complex (DISC), where activation of initiator caspase-8

Correspondence: Abelardo López-Rivas (abelardo.lopez@cabimer.es)

¹Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa-CABIMER, CSIC-Universidad de Sevilla-Universidad Pablo de Olavide, Avda Américo Vespucio 24, Sevilla 41092, Spain

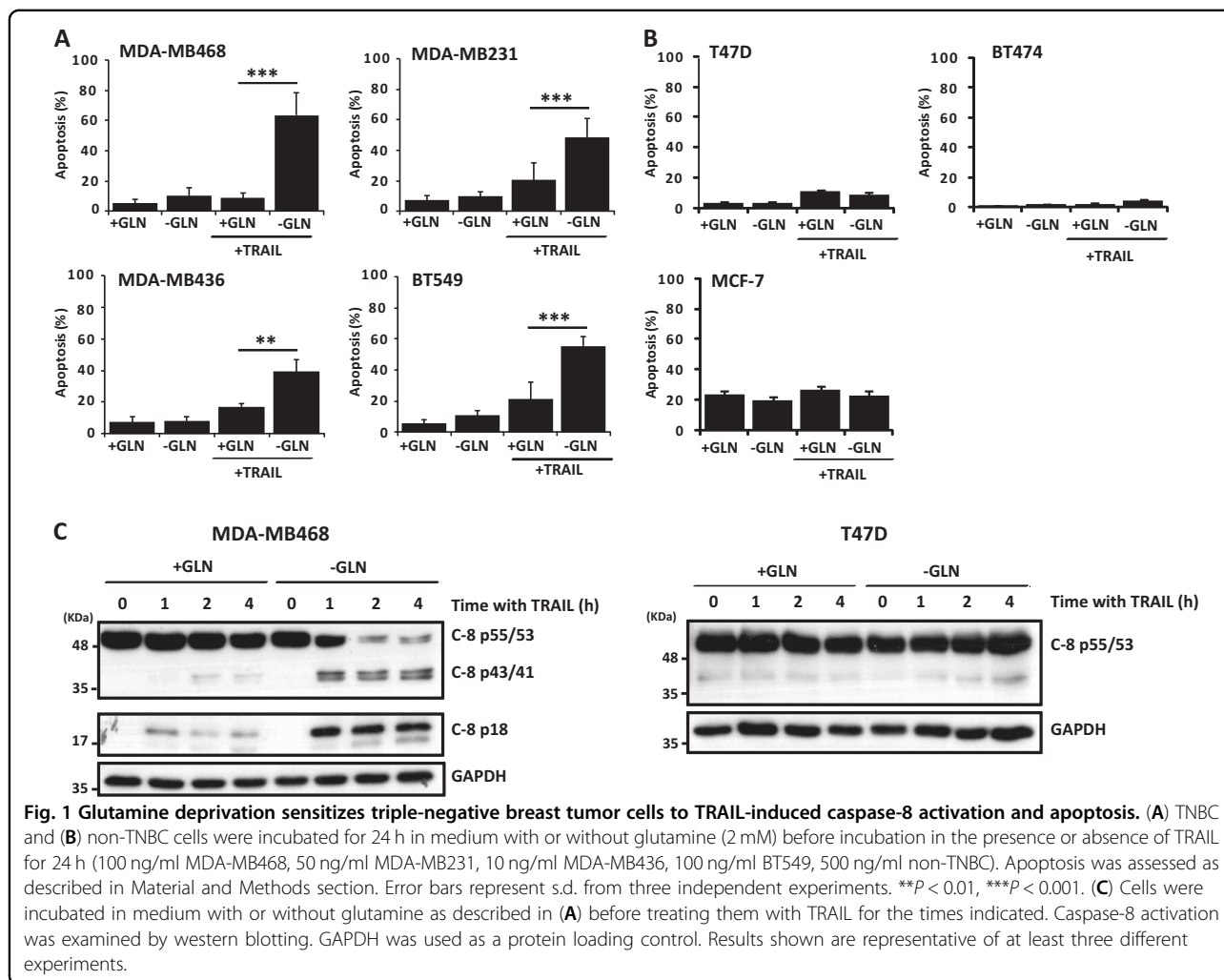
²Centro de Investigación Biomédica en Red-Oncología (CIBERONC), Carlos III Health Institute, Madrid, Spain

Edited by M. Agostini

© The Author(s) 2018



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



takes place¹². At the DISC level, the apoptotic signal may be inhibited by cellular FLICE-inhibitory proteins FLIP_L and FLIP_S¹³, which are short-lived inhibitory proteins¹⁴ expressed at high levels in breast cancers¹⁵. Interestingly, downregulation of FLIP levels is a common feature of various treatments that have been shown to sensitize different tumor cells to TRAIL-induced apoptosis^{16–18}. The ability of TRAIL to induce apoptosis in tumor cells has prompted researchers to further investigate its potential as an antitumor agent¹⁹. Nevertheless, many primary tumors are resistant to TRAIL and some tumors can acquire resistance during therapy²⁰. In these cases, the use of TRAIL in combination with other treatments can result in additive or synergistic antitumor effects²¹.

In this study, we have investigated the regulation of TRAIL sensitivity by glutamine metabolism in TNBC cells. We report that inhibition of glutamine metabolism either by reducing extracellular glutamine concentration or by targeting glutamate-dependent transaminases synergizes with TRAIL in the activation of apoptosis in

TNBC cells. Mechanistically, we demonstrate that glutamine consumption and catabolism are responsible for maintaining TRAIL-R2 and FLIP proteins at levels that prevent activation of the apoptotic machinery by TRAIL in TNBC cells. We propose that a combined strategy of targeting glutamine addiction and at the same time selectively activating the apoptotic machinery through the activation of proapoptotic TRAIL receptors would be a more efficient way of killing TNBC cells than either treatment alone.

Results

Glutamine deprivation markedly sensitizes triple-negative breast tumor cells to TRAIL-induced caspase-8 activation and apoptosis

Cancer cells undergo reprogramming of glutamine metabolism to support redox homeostasis, bioenergetics, and biosynthesis of macromolecules, rendering cancer cells addicted to this non-essential amino-acid²². In this work, we have analyzed the regulation of sensitivity to

TRAIL in cultures of TNBC and non-TNBC cells deprived of glutamine. Interestingly, when cultured in glutamine-free medium TNBC cell lines were sensitized to TRAIL-induced apoptosis (Fig. 1A). In sharp contrast, non-TNBC cell lines were markedly refractory to sensitization to TRAIL by glutamine deprivation (Fig. 1B).

To characterize the mechanism underlying glutamine deprivation-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis in TNBC cells, we first examined activation of caspase-8, a key biochemical event that is triggered upon binding of TRAIL to its proapoptotic receptors at the cell surface²³. Thus, we determined the processing of procaspase-8 into its 43/41 kDa intermediate proteolytic fragments and the generation of the mature p18 caspase-8 subunit in cells treated with TRAIL. Accordingly, the activation of caspase-8 induced by TRAIL was clearly enhanced in glutamine-deprived MDA-MB468 cells as early as one hour after TRAIL addition to the culture (Fig. 1C, left panel). In contrast, non-TNBC T47D cells were completely unresponsive to glutamine deprivation-induced sensitization to TRAIL-activated procaspase-8 processing (Fig. 1C, right panel). These results further confirmed the data on the different apoptotic response of TNBC and non-TNBC cells to TRAIL following glutamine deprivation.

GCN2-mediated upregulation of TRAIL-R2/DR5 expression is dispensable for sensitization to TRAIL of glutamine-starved TNBC cells

To elucidate the mechanism underlying the sensitization of TNBC cells to TRAIL-induced apoptosis following glutamine deprivation, we initially determined the expression of proapoptotic TRAIL receptors in TNBC and non-TNBC cells after glutamine starvation. Incubation of MDA-MB468 cells in glutamine-free medium for 24 h induced the upregulation of TRAIL-R2/DR5 protein (Fig. 2A, left panel) and mRNA (Fig. 2A, right panel) expression. Importantly, cell surface levels of TRAIL-R2 were also upregulated upon glutamine deprivation in TNBC cells (Fig. 2B). On the contrary, surface levels of TRAIL-R1/DR4 were significantly reduced in TNBC cells deprived of glutamine (Fig. 2B). Interestingly, upregulation of TRAIL-R2/DR5 was not observed in T47D cells cultured in glutamine-free medium (Fig. 2A, B), which was in accordance with their refractoriness to undergo sensitization to TRAIL upon glutamine starvation.

In response to glutamine deprivation cells can activate different adaptive responses to restore homeostasis²⁴. The initial event in this signaling response is the phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2 α) either by the general control nondepressible 2 (GCN2) kinase or the ER stress-activated kinase PERK to inhibit cap-dependent global protein synthesis while allowing the translation of specific mRNAs containing a

short upstream open reading frame (uORF) in their 5' untranslated region^{25,26}. Among these mRNAs, translation of mRNA for activating transcription factor 4 (ATF4) is a key event in the adaptive response to stress²⁶, that can also lead to cell death through the transcriptional activation of ATF4 target gene CHOP (GADD153)²⁷, in turn a transcription factor for TRAIL-R2/DR5 gene expression²⁸. To further characterize the mechanism underlying TRAIL-R2/DR5 upregulation in glutamine-deprived TNBC cells, we determined eIF2 α phosphorylation and ATF4 expression in cells deprived of glutamine. Incubation of cells in glutamine-free medium induced clear increase in eIF2 α phosphorylation in MDA-MB468 cells and less in T47D cells (Fig. 2C, upper panel). Accordingly, glutamine deprivation induced a marked upregulation of ATF4 protein expression that was followed by the induction of CHOP mRNA and protein (Fig. 2C, middle and lower panels) only in MDA-MB468 cells. In this respect, glutamine independence of T47D cells with a luminal phenotype has recently been correlated with elevated levels of glutamine synthetase (GLUL)²⁹. Next, we investigated the role of the GCN2 and PERK pathways in TRAIL-R2/DR5 upregulation upon glutamine deprivation in MDA-MB468 cells. Whereas silencing PERK expression did not prevent ATF4, CHOP and TRAIL-R2/DR5 upregulation upon glutamine deprivation, GCN2 knockdown significantly inhibited this response in glutamine-starved cells (Figs. 2D and 3A right panel). Additional evidences for the role of the GCN2 pathway in TRAIL-R2/DR5 upregulation in glutamine-free medium were obtained in experiments using siRNAs to knockdown either ATF4 or CHOP expression (Fig. 3A, left and middle panels). To test the possibility that GCN2-mediated TRAIL-R2/DR5 upregulation was responsible for the sensitization of TNBC cells to TRAIL following glutamine deprivation, we determined the effect of GCN2, ATF4 or CHOP knockdown in apoptosis induced by TRAIL in glutamine-starved cells. Although starvation-mediated TRAIL-R2 upregulation was markedly reduced by silencing the expression of GCN2 pathway proteins (Fig. 3A), sensitization to TRAIL-induced apoptosis was not inhibited (Fig. 3B). Together, our results suggest that upregulation of TRAIL-R2 levels at the cell surface upon glutamine deprivation is dispensable for the observed sensitization to TRAIL in TNBC cells.

Modulation of c-FLIP levels by glutamine regulates TRAIL sensitivity in TNBC cells

The antiapoptotic proteins FLIP_L and FLIP_S are key regulators of TRAIL signaling¹³. To investigate whether these short-lived proteins could be involved in the sensitization process induced by glutamine deprivation in TNBC cells, we determined FLIP proteins levels in MDA-MB468 cells cultured in glutamine-free medium.

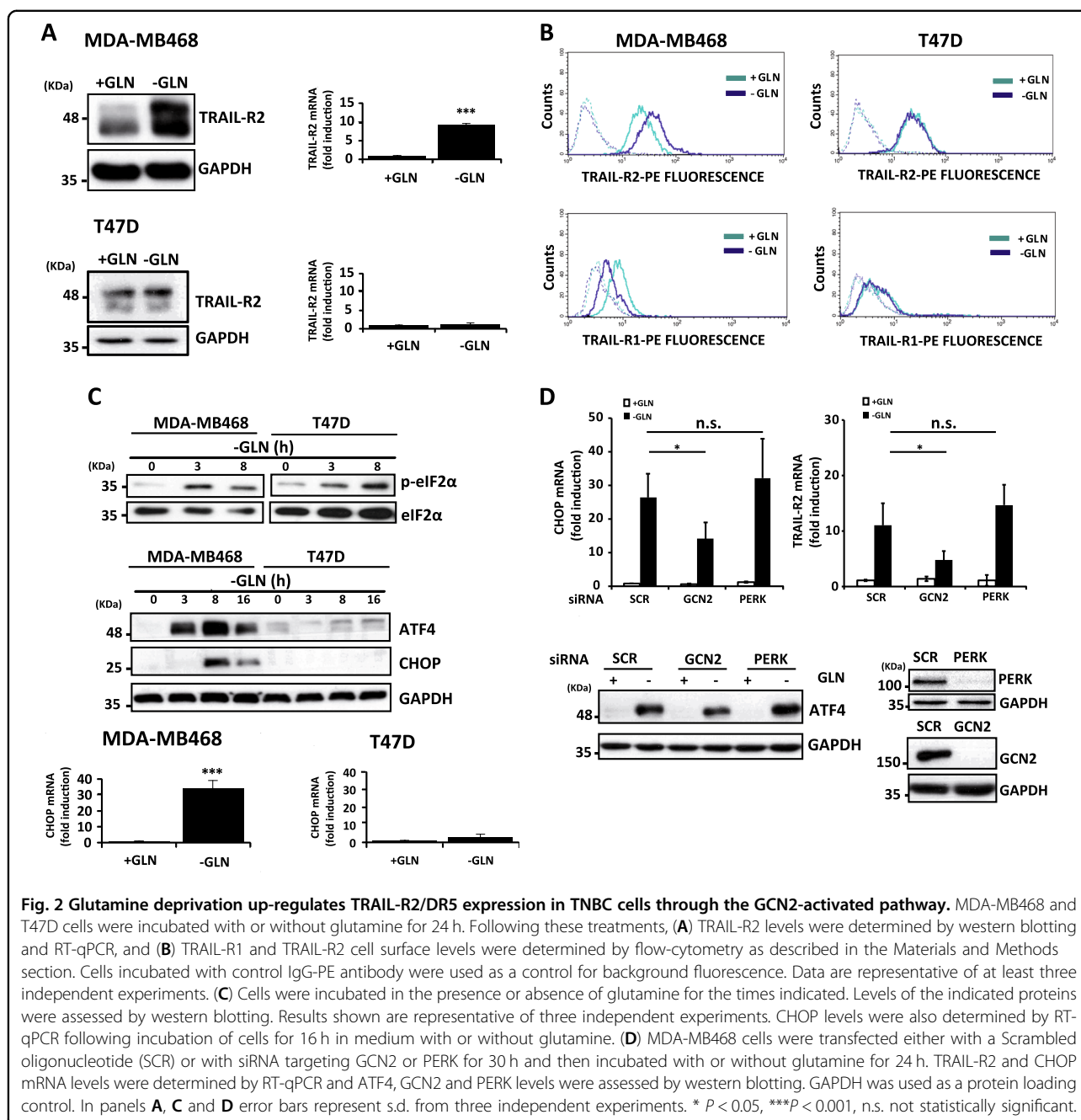
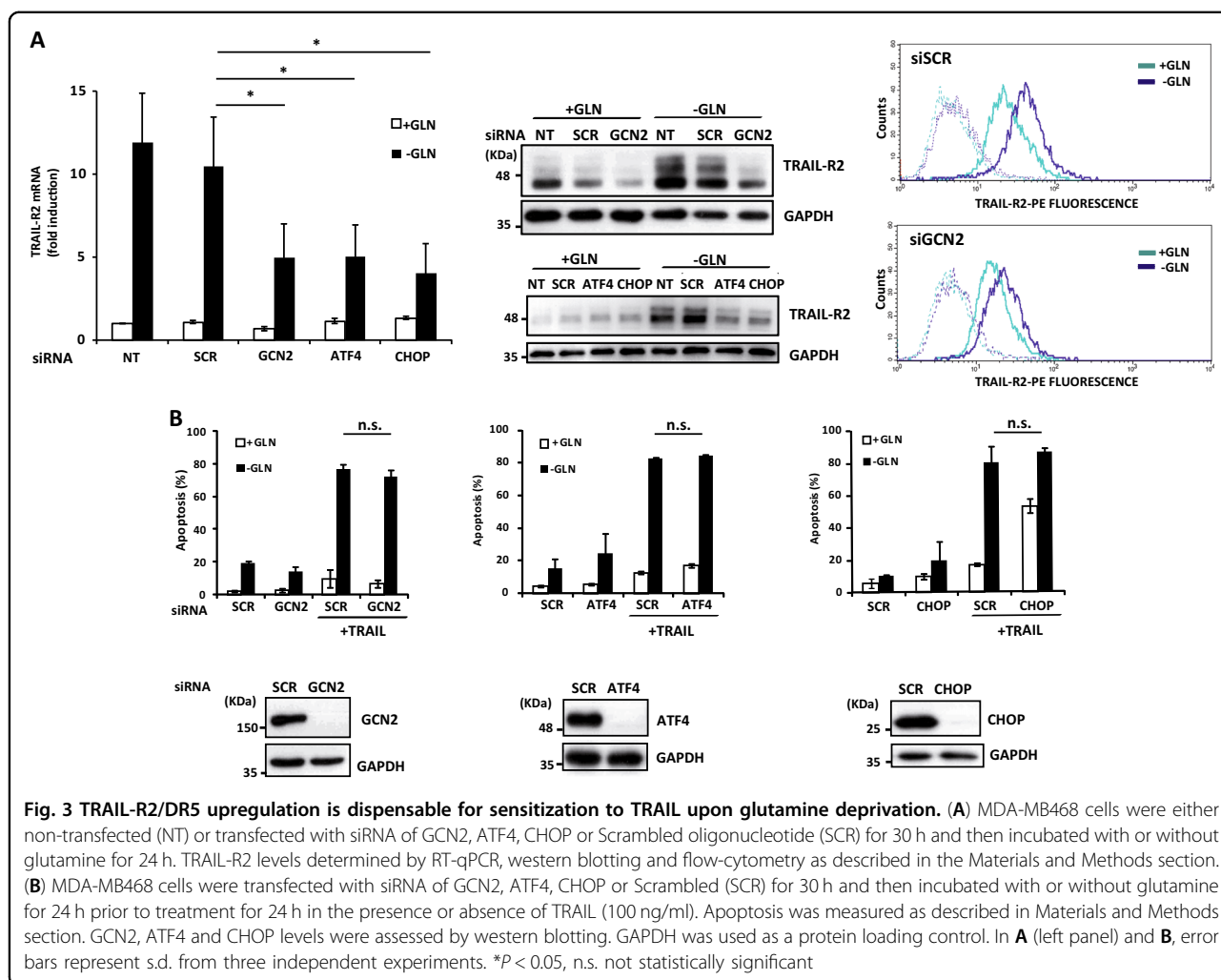


Fig. 2 Glutamine deprivation up-regulates TRAIL-R2/DR5 expression in TNBC cells through the GCN2-activated pathway. MDA-MB468 and T47D cells were incubated with or without glutamine for 24 h. Following these treatments, **(A)** TRAIL-R2 levels were determined by western blotting and RT-qPCR, and **(B)** TRAIL-R1 and TRAIL-R2 cell surface levels were determined by flow-cytometry as described in the Materials and Methods section. Cells incubated with control IgG-PE antibody were used as a control for background fluorescence. Data are representative of at least three independent experiments. **(C)** Cells were incubated in the presence or absence of glutamine for the times indicated. Levels of the indicated proteins were assessed by western blotting. Results shown are representative of three independent experiments. CHOP levels were also determined by RT-qPCR following incubation of cells for 16 h in medium with or without glutamine. **(D)** MDA-MB468 cells were transfected either with a Scrambled oligonucleotide (SCR) or with siRNA targeting GCN2 or PERK for 30 h and then incubated with or without glutamine for 24 h. TRAIL-R2 and CHOP mRNA levels were determined by RT-qPCR and ATF4, GCN2 and PERK levels were assessed by western blotting. GAPDH was used as a protein loading control. In panels **A**, **C** and **D** error bars represent s.d. from three independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, n.s. not statistically significant.

Interestingly, glutamine deprivation induced a marked decrease in FLIP proteins levels in MDA-MB468 cells (Fig. 4A). In contrast, glutamine deprivation did not inhibit FLIP expression in cells of the non-TNBC cell line T47D (Fig. 4A). Collectively, these results closely correlated with sensitization to TRAIL in glutamine-free medium (Fig. 1A).

To demonstrate the importance of the loss of FLIP proteins caused by glutamine deprivation in the sensitization to TRAIL-induced apoptosis, we depleted both FLIP isoforms in MDA-MB468 cells with a siRNA

oligonucleotide prior to treatment with TRAIL. As shown in Fig. 4B, silencing the expression of the two FLIP isoforms markedly sensitized MDA-MB468 cells to TRAIL-induced apoptosis. To further establish the role of FLIP downregulation after glutamine removal in the sensitization of TNBC cells to TRAIL, we generated MDA-MB231 cells that overexpress FLIP_L to maintain FLIP levels in cells deprived of glutamine. Results shown in Figure S1A demonstrate that sensitization to TRAIL-induced apoptosis was clearly inhibited in TNBC cells ectopically expressing FLIP_L. Together, these results indicate that

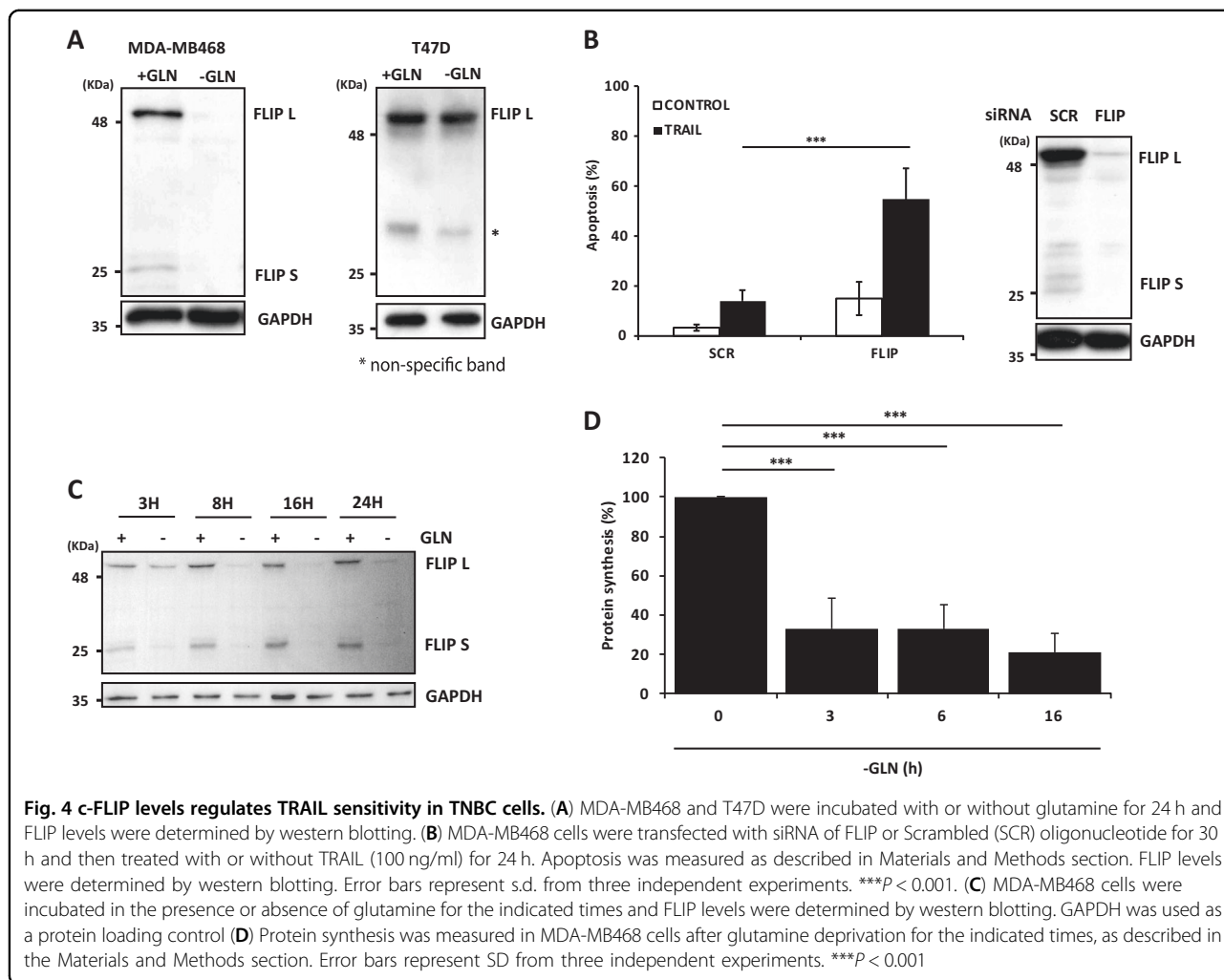


downregulation of cellular FLIP levels upon glutamine deprivation is a key step in the observed sensitization of TNBC cells to TRAIL-induced apoptosis.

In MDA-MB468 cells, FLIP downregulation was observed as early as 3 h after glutamine deprivation and downregulation of both FLIP isoforms was almost complete after 16 h of treatment (Fig. 4C). To examine whether modulation of FLIP expression by glutamine deprivation occurred at the mRNA level, we performed RT-qPCR analysis of FLIP mRNAs in glutamine-deprived cells. In contrast to the observed downregulation of FLIP proteins levels, incubation of cells in glutamine-free medium did not reduce the levels of FLIP mRNAs, which are indeed increased under these conditions (Fig. S1B). As both FLIP isoforms are short-lived proteins subject to ubiquitination and degradation by the proteasome in cells treated with antitumor drugs^{14,16-18}, we determined whether glutamine deprivation might decrease their half-lives in MDA-MB468 cells. However, results shown in Figure S1C demonstrate that stabilities of

both FLIP isoforms were not affected by removal of glutamine from the culture medium. Since neither FLIP mRNAs levels nor proteins half-lives were reduced in MDA-MB468 cells deprived of glutamine we next determined whether general protein synthesis was inhibited upon glutamine deprivation. Data shown in Fig. 4D demonstrate that protein synthesis was markedly inhibited as early as 3 h after glutamine removal from the medium, which closely correlated with FLIP downregulation (Fig. 4C).

The GCN2 signaling pathway is activated in response to amino acids starvation through the binding of uncharged transfer RNAs (tRNAs) to GCN2. As with other eIF2 α kinases, GCN2 activation leads to severe inhibition of de novo protein synthesis while allowing translation of stress-regulated mRNAs to restore homeostasis²⁵. To further characterize the mechanism underlying FLIP loss upon glutamine deprivation we next assessed the role of the GCN2 pathway in FLIP downregulation induced by glutamine deprivation in MDA-MB468 cells. However,



loss of FLIP proteins in cells deprived of glutamine was not prevented by silencing the expression of GCN2, ATF4, or CHOP with siRNAs (Fig. S2A). These results further indicated that activation of the eIF2 α kinase GCN2, a key effector of the integrated stress response to amino-acid deprivation, was not involved in the sensitization of TNBC cells to TRAIL following glutamine deprivation.

We also examined the role of the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1), another important sensor of glutamine availability in mammalian cells³⁰, in the regulation of FLIP levels and TRAIL sensitivity in TNBC cells. As shown in figure S2B, FLIP downregulation upon glutamine deprivation was accompanied by mTORC1 inhibition as determined by measuring phosphorylation of mTORC1 substrates p70S6K and 4EBP1. However, treatment of TNBC cells with mTORC1/mTORC2 inhibitor Torin-1 neither reduced FLIP levels (Fig. S2B) nor sensitized these cells to TRAIL-induced apoptosis (Fig. S2C). Likewise, mTORC1 inhibition by

rapamycin did not sensitize TNBC cells to TRAIL (Fig. S2C). Collectively, these data indicated that mTORC1 inhibition was not responsible for the observed sensitization to TRAIL in glutamine deprived TNBC cells.

Pharmacological and genetic inhibition of transaminases downregulates FLIP expression and sensitizes TNBC cells to TRAIL

Interestingly, addition of α -ketoglutarate (α -KG), a key metabolite of glutamine metabolism, to glutamine-deprived MDA-MB468 cells fully prevented FLIP downregulation and sensitization to TRAIL-induced apoptosis (Fig. S3A). In the cells, reductive amination of α -KG produces glutamate, a precursor in the biosynthesis of non-essential amino acids (NEAA), required for protein synthesis, through the activity of transaminases³¹. Together, these data suggested that targeting transaminases with specific inhibitors may sensitize TNBC cells to TRAIL. In line with this, we observed that treatment of MDA-MB468 cells with aminooxyacetate (AOA), a

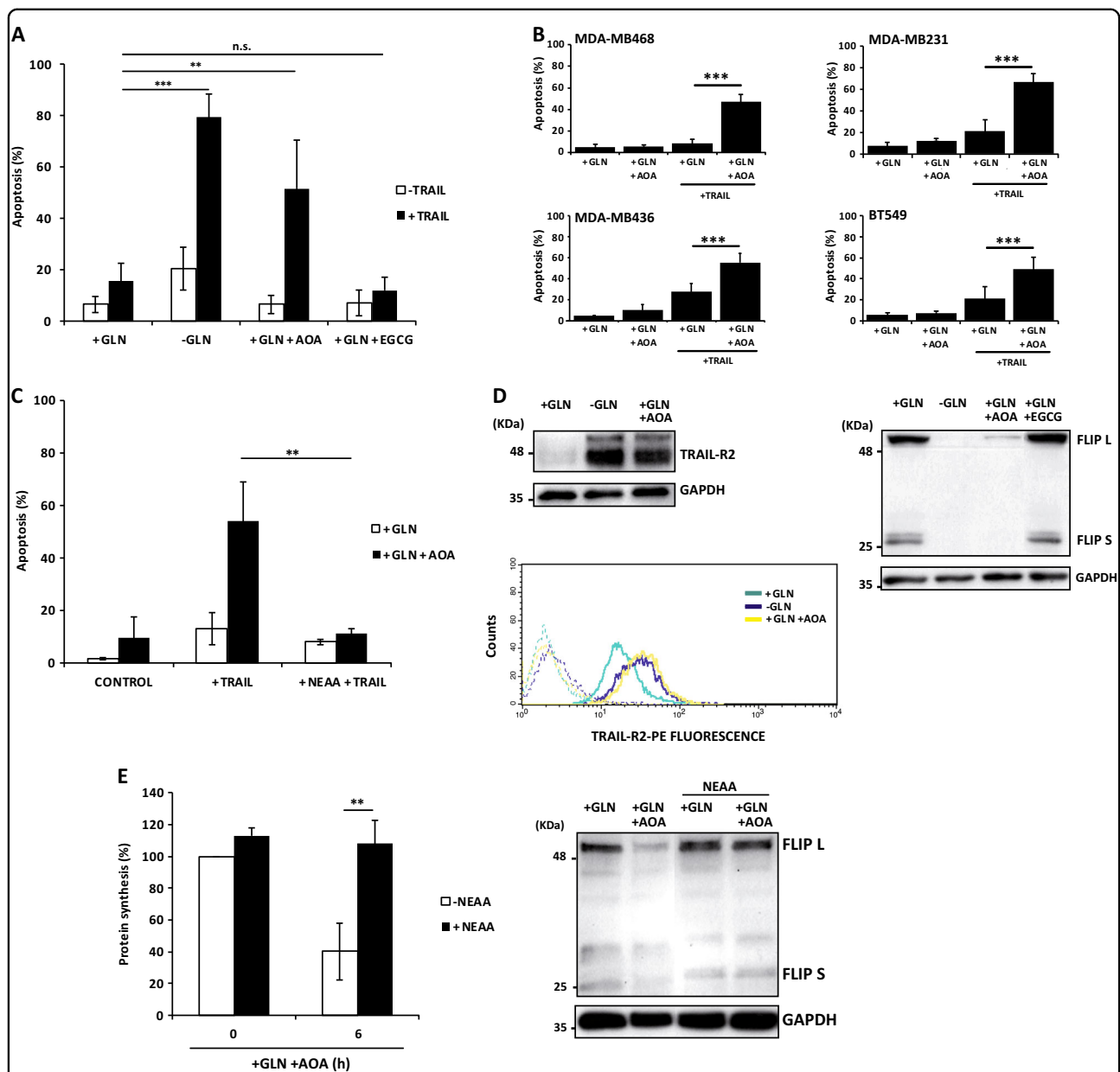


Fig. 5 Pharmacological inhibition of transaminases downregulates FLIP expression and sensitizes TNBC cells to TRAIL. (A) MDA-MB468 cells were incubated for 24 h in medium with or without glutamine and the indicated additions prior to treatment in the presence or absence of TRAIL (100 ng/ml) for 24 h. Apoptosis was measured as described in Materials and Methods section. (B) TNBC cells incubated in glutamine-containing medium with or without AOA for 24 h were treated in the presence or absence of TRAIL for 24 h (100 ng/ml MDA-MB468, 50 ng/ml MDA-MB231, 10 ng/ml MDA-MB436, 100 ng/ml BT549) and apoptosis was then determined. (C) Apoptosis in MDA-MB468 cells incubated in medium with glutamine and AOA in the presence or absence of non-essential amino acids (NEAA) before treatment with or without TRAIL (100 ng/ml). (D) MDA-MB468 cells were treated as indicated and TRAIL-R2 levels were assessed by western blotting or flow-cytometry. FLIP levels were determined by western blotting. Results shown are representative of three independent experiments. (E) Protein synthesis in MDA-MB468 cells incubated in glutamine-containing medium and the metabolic inhibitor AOA in presence or absence of NEAA for 6 h (left panel). (Right panel) MDA-MB468 cells were incubated as indicated for 24 h and FLIP levels were assessed by western blotting. GAPDH was used as a protein loading control. In panels A, B, C and E, error bars represent s.d. from three independent experiments. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, n.s. not statistically significant.

general inhibitor of transaminases³², effectively sensitized these cells to TRAIL in glutamine-containing medium (Fig. 5A). In contrast, epigallocatechin gallate (EGCG) a potent inhibitor of glutamate dehydrogenase did not show

any sensitizing effect in TRAIL-induced apoptosis (Fig. 5A). Moreover, as shown in Fig. 5B, sensitization to TRAIL by AOA was also observed in other TNBC cell lines. Interestingly, AOA-induced sensitization to TRAIL

was abrogated by adding NEAA to the culture medium (Fig. 5C), further supporting a role of NEAA biosynthesis in the regulation of sensitivity to TRAIL in TNBC cells. We next investigated the mechanism underlying AOA-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis by determining the expression levels of TRAIL-R2 and FLIP in cells treated with the transaminases inhibitor in glutamine-containing medium. As shown in Fig. 5D, treatment of MDA-MB468 cells for 24 h with AOA significantly increased both total and cell surface TRAIL-R2 levels. These results suggested that inhibition of transaminases-mediated NEAA biosynthesis in TNBC cells may activate a stress response leading to TRAIL-R2 upregulation. Results shown in Figures S3B and S3C confirmed this hypothesis since addition of NEAA to the culture medium completely inhibited AOA-induced ATF4, CHOP, and TRAIL-R2 upregulation. Remarkably, treatment with AOA, but not with EGCG, induced a marked loss of FLIP expression in MDA-MB468 cells (Fig. 5D). Importantly, NEAA supplementation fully prevented AOA-induced inhibition of protein synthesis and FLIP downregulation (Fig. 5E), further supporting a role of NEAA biosynthesis through transaminases in the control of FLIP levels in TNBC cells.

To confirm the involvement of transaminases in the regulation of TRAIL sensitivity of TNBC cells, we performed genetic inhibition of different transaminases using siRNAs that efficiently silenced their expression in MDA-MB468 cells (Fig. 6A and Supplementary Figure S3C). We next examined the sensitivity of these cells to TRAIL-induced apoptosis following individual knockdown of the various transaminases. The cytoplasmic form of glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT1) transfers nitrogen from glutamate to oxaloacetate to produce aspartate and α -KG. Interestingly, results shown in Fig. 6A and Supplementary Figure S3C demonstrate that silencing the expression of GOT1 with different siRNAs significantly sensitized MDA-MB468 cells to TRAIL. In contrast, knockdown of the mitochondrial forms of either glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT2) or glutamate-pyruvate transaminase (GPT2) did not sensitize these cells to TRAIL (Fig. 6A). Furthermore, results shown in Fig. 6B indicate that the sensitizing effect of GOT1 knockdown in TRAIL-induced apoptosis was preceded by FLIP downregulation and TRAIL-R2 upregulation, further supporting a role of cytosolic GOT1 in restraining TRAIL-induced apoptosis in TNBC cells.

L-Asparaginase treatment sensitizes TNBC cells to TRAIL-induced apoptosis

Although early clinical trials of glutamine metabolism inhibitors have revealed systemic toxicity, targeting glutamine dependency of tumor cells remains a promising approach to treat cancer patients²⁴. It has been suggested

that lowering blood glutamine levels with L-Asparaginase (L-ASNase) is in part responsible for its anti-leukemic action³³. We first determined the effect of L-ASNase treatment on the activation of the ATF4/CHOP/TRAIL-R2 stress response in TNBC cells. Incubation of MDA-MB468 cells in glutamine-containing culture medium in the presence of *Escherichia coli* L-ASNase induced the expression of ATF4, CHOP and TRAIL-R2 (Fig. 7A, B). Interestingly, addition of 2 mM glutamine in the last 6 h of treatment with L-ASNase completely inhibited this stress response, which suggested that glutaminase activity of L-ASNase was responsible for the activation of the ATF4/CHOP/TRAIL-R2 pathway. Remarkably, L-ASNase treatment downregulated FLIP expression levels (Fig. 7C) and late addition of glutamine to L-ASNase-treated cell cultures markedly inhibited FLIP downregulation (Fig. 7C). These results prompted us to investigate whether L-ASNase treatment would sensitize TNBC cells to TRAIL-induced apoptosis. Incubation of MDA-MB468 cells with L-ASNase in glutamine-containing medium strongly sensitized these cells to TRAIL-induced apoptosis (Fig. 7D). Importantly, addition of glutamine 6 h before TRAIL treatment completely abrogated sensitization to TRAIL (Fig. 7D). In contrast, asparagine (ASN) supplementation for 6 h prior to TRAIL addition did not inhibit TRAIL-induced apoptosis (Fig. 7D). Collectively, our results clearly demonstrated that glutaminase activity of *E. coli* L-ASNase has a synergistic effect with TRAIL in the activation of an apoptotic cell death process in TNBC cells.

Discussion

Clinical and molecular heterogeneity together with the lack of targeted therapies in patients with triple-negative breast cancer have prompted the search for new targets to treat these patients⁵. Recent evidences have indicated that the increased uptake and metabolism of glutamine in TNBC cells may provide these tumor cells with intermediates for nucleotide and protein synthesis, redox homeostasis and mitochondrial energy metabolism required for proliferation^{6, 7, 29}. In this respect, the dependence of TNBC cells on glutamine uptake and metabolism have made them attractive therapeutic targets^{6, 8}. However, initial clinical trials with agents targeting glutamine metabolism revealed unacceptable systemic toxicity, suggesting that lower doses of glutamine anti-metabolites in combination with other targeted therapies may be required to selectively target TNBC.

Recent works have suggested a role of glutamine metabolism in the control of TRAIL-R2 expression and TRAIL sensitivity in different tumor cells^{34–36}, although the underlying mechanism remained largely unknown. Our results clearly show that inhibiting glutamine utilization by TNBC cells with a basal phenotype markedly

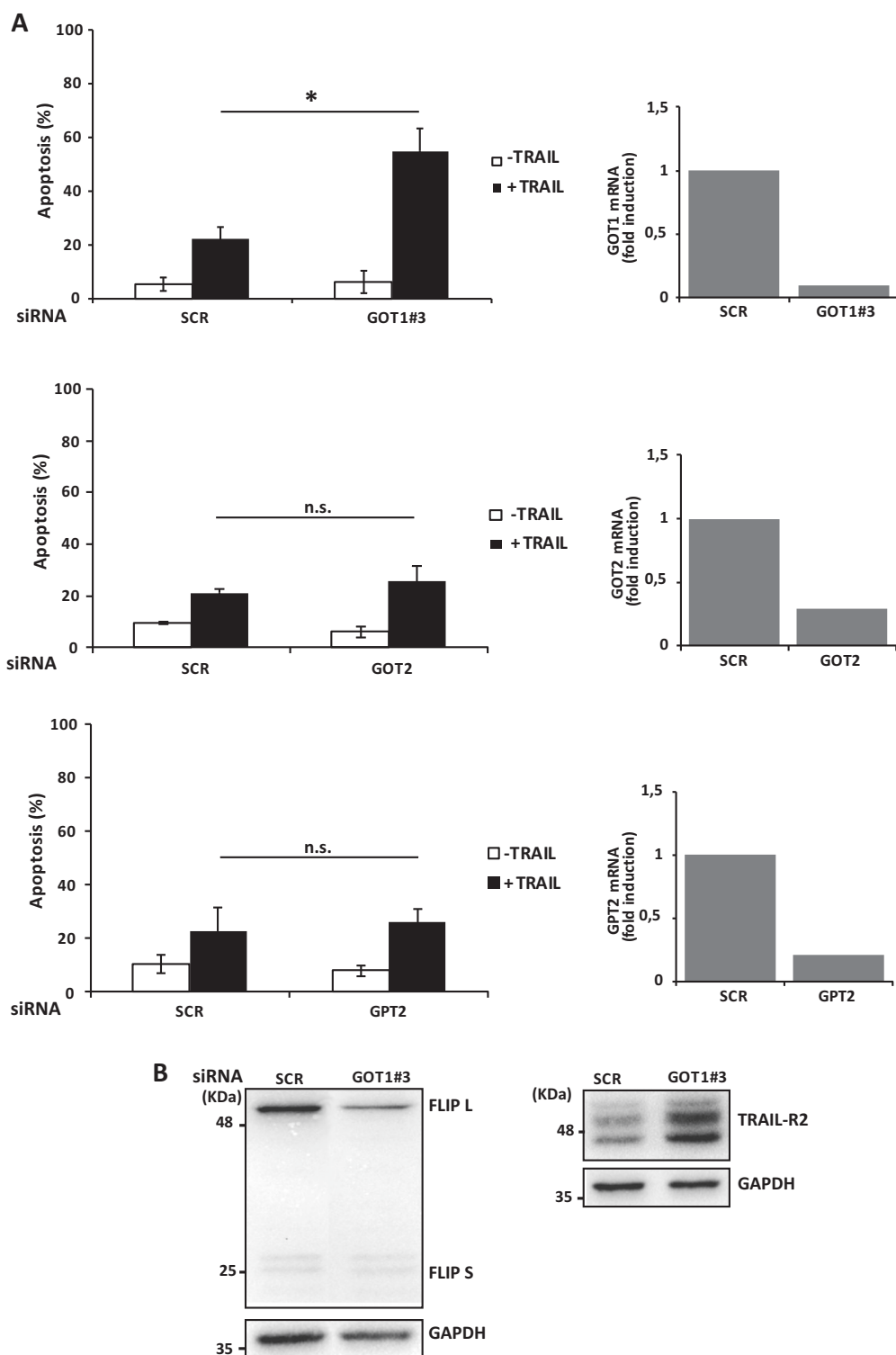
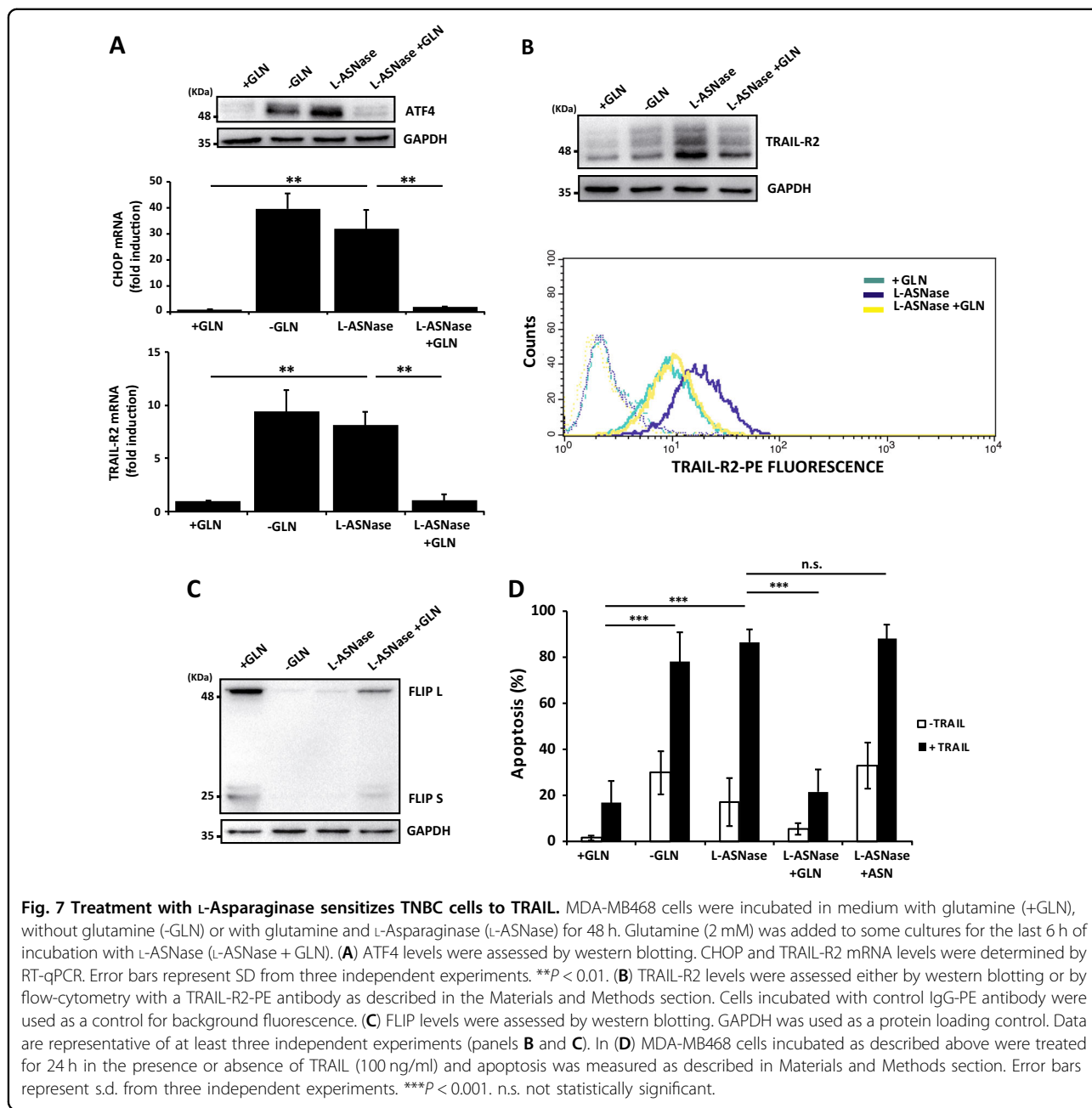


Fig. 6 Genetic inhibition of GOT1 downregulates FLIP expression and sensitizes TNBC cells to TRAIL. (A) MDA-MB468 cells were transfected either with a Scrambled oligonucleotide (SCR) or siRNAs of GOT1, GOT2 or GPT2 for 30 h and then treated with or without TRAIL (100 ng/ml). GOT1, GOT2 and GPT2 mRNA levels were determined by RT-qPCR. Apoptosis was measured as described in Materials and Methods section. Error bars represent s.d. from three independent experiments. * $P < 0.05$. n.s. not statistically significant. **(B)** MDA-MB468 cells were transfected either with a Scrambled oligonucleotide (SCR) or siRNA of GOT1 for 30 h. FLIP and TRAIL-R2 levels were assessed by western blotting. GAPDH was used as a protein loading control. Data shown are representative of three independent experiments



increases their sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. In contrast, non-TNBC cell lines with a luminal phenotype were markedly refractory to sensitization to TRAIL upon inhibition of glutamine utilization. Differences in glutamine dependence have been observed between basal and luminal cell lines^{6, 7,29}. Moreover, glutamine independence of breast tumor cells with a luminal phenotype was associated with elevated expression of glutamine synthetase (GLUL) and reduced glutaminase (GLS) levels²⁹. Interestingly, differential expression of GLUL and GLS were also observed between luminal A and basal primary tumors²⁹. We demonstrate for the first time that TRAIL-

R2 and FLIP levels are critically regulated by glutamine metabolism in TNBC cells through different mechanisms. Whereas TRAIL-R2 upregulation upon glutamine deprivation depends on the activation of the GCN2-mediated signaling pathway, downregulation of FLIP levels results from the GCN2-independent inhibition of general protein synthesis, a likely consequence of the lack of non-essential proteinogenic amino acids in glutamine-starved cells³¹. Our data also demonstrate that inhibiting glutamate catabolism through non-essential amino-acid-generating transaminases, but not through glutamate dehydrogenase mimics the effects of glutamine deprivation on

FLIP levels and sensitivity to TRAIL. Our data also show that cytosolic aspartate aminotransferase GOT1, an enzyme elevated in TNBC cell lines³⁷, is involved in maintaining FLIP and TRAIL-R2 levels in TNBC cells in glutamine-containing medium. Together, these results further support a key role of transaminases in the control of the extrinsic pathway of apoptosis in TNBC cells. Interestingly, a recent report has demonstrated a strong correlation between transaminase pathway activity and proliferation in human breast tumors³⁸. Thus, coupling glutamine anaplerosis to NEAA synthesis is an important step in the reprogramming of metabolism to sustain the biosynthetic demands of highly proliferative human breast tumors³⁸ and transaminases have been proposed as potential targets for antitumor treatments in breast cancer^{32,37}. However, metabolic redundancy between transaminases and glutamate dehydrogenases to produce the anaplerotic intermediate α -ketoglutarate, might lead to the development of tumor resistance to inhibitors of transaminases in monotherapy³⁸. Importantly, our results suggest that reducing FLIP levels by transaminase inhibition and simultaneously activating proapoptotic TRAIL receptors might allow TNBC cells to reach the threshold for apoptosis induction, facilitating tumor suppression.

Although *in vitro* sensitivity to L-ASNase has been demonstrated in cells from different solid tumors, clinical use has been mainly restricted to pediatric and adult patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and other lymphoid malignancies³⁹. Interestingly, our results demonstrate that glutaminase activity of *E. coli* L-ASNase is responsible for the observed upregulation of TRAIL-R2, downregulation of FLIP and sensitization to TRAIL-induced cell death in TNBC treated with L-ASNase. Consistent with our *in vitro* findings in TNBC cells, clinical studies have indicated that glutaminase activity of L-ASNase correlates with the clinically beneficial effect in patients with ALL³⁹. Although serious side-effects has been reported in long-term clinical treatments with L-ASNase⁴⁰, the synergism with TRAIL demonstrated in our study may potentially reduce the duration of L-ASNase treatment and therefore minimize the risk of undesired effects in patients.

Despite possible liver toxicity of His-tagged TRAIL⁴¹, non-tagged versions of recombinant TRAIL and agonists antibodies against proapoptotic TRAIL receptors have been used in clinical trials, with broad tolerability⁴². Unfortunately, clinical benefit of these therapeutic approaches has so far been rather limited likely due, among other reasons, to low agonistic activity of these agents and resistance of most primary human tumors to them²¹. Thereafter, second-generation formulations of TRAIL have been generated to increase the agonistic bioactivity of this death ligand⁴³. In this context, our data on the regulation of the TRAIL system by the glutamine

metabolism in TNBC cells warrant further studies to ascertain the feasibility of inhibiting glutamine utilization for therapeutic intervention in TNBC, in combination with these novel agonists of proapoptotic TRAIL receptors.

Materials and methods

Reagents and Antibodies

Soluble human His-tagged recombinant TRAIL was generated in our laboratory as described⁴⁴. Anti-caspase 8 antibody was generously provided by Dr. Gerald Cohen (Leicester University, UK). Antibodies against p-AKT^{Ser473}, AKT, p-P70S6K, P70S6K, PERK (C33E10), eIF2 α (D7D3), p-eIF2 α and CHOP (D46F1) were obtained from Cell Signaling Technology (CA, USA). Antibodies against ATF4, GAPDH, and GCN2 were obtained from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-TRAIL-R2 antibody was purchased from R&D Systems (Minneapolis, USA). Anti-FLIP (7F10) antibody was from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA). p4E-BP1 and 4E-BP1 antibodies were from Upstate Millipore (NY, USA). FITC-conjugated secondary antibodies were from DAKO (Cambridge, UK). Anti-TRAIL-R1-PE and anti-TRAIL-R2-PE monoclonal antibodies for surface receptor analysis were from Biolegend (San Diego, CA, USA). Aminooxyacetate, non-essential amino-acid solution (100 \times), cycloheximide, dimethyl 2-oxoglutarate (α -KG), and L-Asparaginase from *E. coli* were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Torin1 was purchased from TOCRIS Bioscience (Bristol, UK). Rapamycin was purchased from LC laboratories (Woburn, MA, USA). Epigallocatechin Gallate (EGCG) was purchased from Selleck Chemicals (Houston, Texas, USA).

Cell culture

Breast tumor cell lines were maintained in DMEM (MDA-MB468 and MDA-MB436) or RPMI 1640 (MDA-MB231, MCF-7, BT474 and BT549) medium with 2 mM L-glutamine, penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 μ g/ml), and with 10% fetal bovine serum. T47D cell line was maintained in RPMI medium with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 5 mM glucose, penicillin (50 U/ml), and streptomycin (50 μ g/ml). Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂-humidified, 95% air incubator. BT-549, MDA-MB436, T47D, and BT474 cell lines were purchased from Cell Lines Service (CLS, Eppelheim, Germany). MDA-MB468, MDA-MB231, and MCF-7 cell lines were obtained from Dr. Joaquin Arribas (Vall D'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain). Glutamine deprivation experiments were performed on all cell lines in DMEM medium lacking NEAA, with 10% dialyzed fetal bovine serum, penicillin (50 U/ml), and streptomycin (50 μ g/ml). When indicated, glutamine was added back at final concentration of 2 mM.

Retroviral vectors and virus production

FLIP_L (in pCR3.V64 vector, a kind donation of Dr. J. Tschopp, University of Lausanne) was cloned into *Bam*HI/*Sal*I sites of pBabepuro. Retroviruses for protein overexpression were produced by transfection of HEK293-T cells by calcium phosphate method with the corresponding retroviral vectors. Retrovirus-containing supernatants were collected 48 h after transfection and concentrated by ultracentrifugation at 22,000 r.p.m. for 90 min at 4°C.

Generation of MDA-MB231 cells over-expressing FLIP(L)

MDA-MB231 cells were plated at 3.5×10^5 cells per 10 cm dish and infected with the retroviruses mentioned above. Stable populations of MDA-MB231 cells infected with retroviruses were obtained after selection in culture medium containing puromycin (1.5 µg/ml) during 48 h.

RNA interference

siRNAs against ATF4, CHOP, FLIP, GCN2, GOT1, GOT2, GPT2, PERK, and non-targeting scrambled control oligonucleotide (Table), were synthesized by Sigma (St. Louis, MO). Cells were transfected with siRNAs using DharmaFECT-1 (Dharmacon) as described by the manufacturer. After 6 h, transfection medium was replaced with regular medium and cells were further incubated for 30 h before treatments.

ATF4	5'-GCCUAGGUCUCUUAGAUGAdTdT-3'
CHOP pool	5'-AGGGAGAACCAGGAAACGGAA-3'
	5'-ACGGCUCAAGCAGGAAAUCGA-3'
	5'-AAGGAAGUGUAUCUUAUCA-3'
	5'-CAGCUUGUAUAUAGAGAUUGU-3'
FLIP	5'-CUUUGGGUGAUCUACGUUAdTdT-3'
GCN2	5'-CAGCAGAAAUCAUGUACGAUU-3'
GOT1#1	5'-GGGCUUCCUGAAUGAUCUGdTdT-3'
GOT1#2	5'-GCUAAGACAAUAGCCUAAAAdTdT-3'
GOT1#3	5'-GCGUUGGUACAAUGGAACAAAdTdT-3'
GOT2	5'-GGGACACCAUAGCAAAAAdTdT-3'
GPT2	5'-CGAGUGUGGUACAGAGGAdTdT-3'
PERK	5'-CAAACUGUAUACGGUUUAdTdT-3'
Scrambled control	5'-GAGCGCUAGACAAUGAAG-3'

Protein synthesis

Protein synthesis was measured by the incorporation of [³H]leucine (2µCi/ml) into acid-precipitable material. After pulse-labeling (2 h), the medium was aspirated, and the cells were washed three times with phosphate-buffered saline and treated with 1 ml of ice-cold 5%

trichloroacetic acid. The cells were kept in the cold for 20 min, washed once with cold 5% trichloroacetic acid and twice with ethanol, and then dissolved in 0.1 M NaOH, 2% Na₂CO₃, 0.1% SDS for measurement of radioactivity in a Beckman scintillation counter.

Real time-qPCR

mRNA expression was analyzed in triplicate by RT-qPCR on the ABI Prism7500 sequence detection system using predesigned assay-on-demand primers and probes (Applied Biosystems). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT1 Hs01003267_m1) was used as an internal control and mRNA expression levels were given as fraction of mRNA levels in control cells. Primers and probes used were: CHOP (Hs01090850_m1), FLIP(L) (AIN1EV0), FLIP(S) (Ss03391532_m1), TRAIL-R2 (Hs00366278_m1), GOT1 (Hs00157798_m1), GOT2 (Hs00905827_g1) and GPT2 (Hs00370287_m1).

Determination of apoptosis

Cells (3×10^5 /well) were treated in six-well plates as indicated in the figure legends. After treatment, hypodiploid apoptotic cells were detected by flow cytometry according to published procedures⁴⁵. Basically, cells were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS), fixed in 70% cold ethanol and then stained with propidium iodide while treating with RNase. Quantitative analysis of the cell cycle and sub-G1 cells was carried out in a FACSCalibur cytometer using the Cell Quest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Analysis of TRAIL receptors by flow cytometry

Cells were detached with trypsin solution and resuspended in growth media. After incubation for 15 min under cell culture conditions (37°C in a 5% CO₂-humidified, 95% air incubator), cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in PBS. Cells were then labeled either with 5 µg/ml of anti-TRAIL-R1-PE, anti-TRAIL-R2-PE or an IgG-PE control antibody for 30 min on ice and darkness. Quantitative analysis of the receptor cell surface expression was carried out in a FACSCalibur cytometer using the Cell Quest Software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Immunoblot analysis of proteins

Cells (3×10^5) were washed with PBS and lysed in TR3 lysis buffer (3% SDS, 10% Glycerol, 10 mM Na₂HPO₄). Then, lysates were sonicated and protein content was measured with the Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, USA), before adding Laemmli sample buffer. Proteins were resolved on SDS-polyacrylamide minigels and detected as described previously⁴⁵. GAPDH was used as protein loading control.

Statistical analysis

All data are presented as the mean \pm s.d. of at least three independent experiments. The differences among different groups were determined by the Student's *t*-test. $P < 0.05$ was considered significant.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2015-64383-P), Junta de Andalucía Excellence Program (BIO 778), CIBERONC ISCIII CB16/12/00421, Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RD12/0036/0026) and the European Community through the regional development funding program (FEDER) to ALR. MM-L was supported by a FPI contract from Ministerio de Economía y Competitividad. We are grateful to Dr. C. Palacios, Dr. R. Yerbes, Dr. A. Cano-González and R. Mora-Molina for helpful discussions. We thank F.J. Fernández-Farrán and Inés Casares for excellent technical assistance.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Information accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0263-0>).

Received: 8 September 2017 Revised: 4 December 2017 Accepted: 18 December 2017

Published online: 12 February 2018

References

- DeBerardinis, R. J. & Cheng, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **29**, 313–324 (2010).
- Wise, D. R. & Thompson, C. B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 427–433 (2010).
- Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R. & Lazebnik, Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J. Cell Biol.* **178**, 93–105 (2007).
- Blows, F. M. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS. Med.* **7**, e1000279 (2010).
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 674–690 (2016).
- Timmerman, L. A. et al. Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell.* **24**, 450–465 (2013).
- van Geldermalsen, M. et al. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene* **35**, 3201–3208 (2015).
- Gross, M. I. et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 890–901 (2014).
- Hensley, C. T., Wasti, A. T. & DeBerardinis, R. J. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J. Clin. Invest.* **123**, 3678–3684 (2013).
- Ashkenazi, A. et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* **104**, 155–162 (1999).
- Walczak, H. et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **5**, 157–163 (1999).
- Sprick, M. R. et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* **12**, 599–609 (2000).
- Imler, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190–195 (1997).
- Fukazawa, T. et al. Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene* **20**, 5225–5231 (2001).
- Coticello, C. et al. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via upregulation of antiapoptotic proteins. *J. Immunol.* **172**, 5467–5477 (2004).
- Palacios, C., Yerbes, R. & Lopez-Rivas, A. Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells. *Cancer Res.* **66**, 8858–8869 (2006).
- Sanchez-Perez, T., Medema, R. H. & Lopez-Rivas, A. Delaying mitotic exit downregulates FLIP expression and strongly sensitizes tumor cells to TRAIL. *Oncogene* **34**, 661–669 (2015).
- Zhang, X. D. et al. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* **59**, 2747–2753 (1999).
- Ashkenazi, A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **7**, 1001–1012 (2008).
- Grosse-Wilde, A. et al. TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *J. Clin. Invest.* **118**, 100–110 (2008).
- Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J. & Walczak, H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell. Death. Differ.* **21**, 1350–1364 (2014).
- Wise, D. R. et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 18782–18787 (2008).
- Bodmer, J. L. et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 241–243 (2000).
- Altman, B. J., Stine, Z. E. & Dang, C. V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 619–634 (2016).
- Harding, H. P. et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell.* **11**, 619–633 (2003).
- Lu, P. D., Harding, H. P. & Ron, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell. Biol.* **167**, 27–33 (2004).
- Zinszner, H. et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **12**, 982–995 (1998).
- Yamaguchi, H. & Wang, H. G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 45495–45502 (2004).
- Kung, H. N., Marks, J. R. & Chi, J. T. Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS. Genet.* **7**, e1002229 (2011).
- Nicklin, P. et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **136**, 521–534 (2009).
- Zhang, J., Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. Cancer cell metabolism: the essential role of the non-essential amino acid, glutamine. *Embo. J.* **36**, 1302–1315 (2017).
- Korangath, P. et al. Targeting Glutamine Metabolism in Breast Cancer with Aminooxyacetate. *Clin. Cancer Res.* **21**, 3263–3273 (2015).
- Willems, L. et al. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* **122**, 3521–3532 (2013).
- Dilshara, M. G. et al. Glutamine deprivation sensitizes human breast cancer MDA-MB-231 cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **485**, 440–445 (2017).
- Qin, J. Z., Xin, H. & Nickoloff, B. J. Targeting glutamine metabolism sensitizes melanoma cells to TRAIL-induced death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 146–152 (2010).
- Valter, K. et al. Contrasting effects of glutamine deprivation on apoptosis induced by conventionally used anticancer drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 498–506 (2017).
- Thornburg, J. M. et al. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **10**, R84 (2008).
- Coloff, J. L. et al. Differential Glutamate Metabolism in Proliferating and Quiescent Mammary Epithelial Cells. *Cell. Metab.* **23**, 867–880 (2016).
- Emadi, A., Zokaee, H. & Sausville, E. A. Asparaginase in the treatment of non-ALL hematologic malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **73**, 875–883 (2014).
- Lanvers-Kaminsky, C. Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **79**, 439–450 (2017).

41. Jo, M. et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.* **6**, 564–567 (2000).
42. von Karstedt, S., Montinaro, A. & Walczak, H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 352–366 (2017).
43. de Miguel, D., Lemke, J., Anel, A., Walczak, H. & Martínez-Lostao, L. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell. Death. Differ.* **23**, 733–747 (2016).
44. Harper, N., Farrow, S. N., Kaptein, A., Cohen, G. M. & MacFarlane, M. Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J. Biol. Chem.* **276**, 34743–34752 (2001).
45. Ruiz-Ruiz, C. & Lopez-Rivas, A. Mitochondria-dependent and -independent mechanisms in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis are both regulated by interferon-gamma in human breast tumour cells. *Biochem. J.* **365**, 825–832 (2002).