

TESIS DOCTORAL

FUNCIÓN DE PARP-1 Y DEL PROCESO DE POLI ADP- RIBOSILACIÓN EN AUTOFAGIA: REGULACIÓN SOBRE LA RUTA DE AMPK /mTORC1

José Manuel Rodríguez Vargas

Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Universidad de Granada

Granada, 2013



Universidad de Granada

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Manuel Rodríguez Vargas
D.L.: GR 713-2014
ISBN: 978-84-9028-869-6

D. Francisco Javier Oliver Pozo, Investigador Científico del Departamento de Biología Celular e Inmunología del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” del CSIC en Granada,

Certifica que **D. José Manuel Rodríguez Vargas**, Licenciado en Bioquímica, certifica que bajo su dirección y en el Departamento de Biología Celular e Inmunología del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” del CSIC en Granada, el trabajo titulado: **“Papel de la proteína PARP-1 y de la Poli ADP-Ribosilación en la autofagia inducida por privación de nutrientes. Regulación sobre las funciones de AMPk y mTORC1”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

En Granada, a 3 de Junio de 2013

Vº Bº Director

El interesado

Fco. Javier Oliver Pozo

José Manuel Rodríguez Vargas

Dedicado a mis padres

*“Los científicos se esfuerzan por hacer posible lo imposible.
Los políticos, por hacer imposible lo posible. “*

Bertrand Russell

ABREVIATURAS	1
RESUMEN GENERAL.....	7
INTRODUCCIÓN	13
INTRODUCCIÓN I: Biología de la Poli (ADP-Ribosilación)	15
1. Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 1.....	15
2. Poli (ADP-Ribosilación): Metabolismo de la Poli ADP-ribosa.....	16
2.1. Síntesis de Poli ADP-Ribosa.....	16
2.2. Degradación y reciclado de PAR.....	18
3. Estructura de PARP-1.....	20
3.1. Dominio de Unión al ADN o DBD.....	20
3.2. Dominio de Automodificación o AMD.....	21
3.3. Dominio de Unión al NAD ⁺ o Dominio Catalítico (CAT).....	21
4. Familia PARP	22
4.1. PARP-1 (ARTD1).....	24
4.2. PARP-2 (ARTD2).....	24
4.2.1. Mantenimiento del genoma durante espermatogénesis	25
4.2.2. Regulación de la Timopoiesis y la respuesta inflamatoria	25
4.2.3. Regulación de la expresión génica.....	26
4.2.4. Control del metabolismo energético	26
4.3. PARP-3 (ARTD3).....	26
4.4. Tanquirasas 1 y 2 (ARTD5 y ARTD6).....	27
4.4.1. Mantenimiento de la homeostasis del telómero.....	28
4.4.2. Intervención en el tráfico de membranas.....	28
4.4.3. Regulación de procesos de muerte celular.....	28
4.5. VPARP (PARP-4, ARTD4).....	28
4.6. Otras PARPs	29
5. Funciones de PARP-1.....	30
5.1. Reparación del ADN y Mantenimiento de la Integridad Genómica	31
5.2. Modificación de la estructura de la cromatina	34
5.3. Control de la Maquinaria Transcripcional.....	34
5.4. Replicación del ADN	36
5.5. PARP-1 y ciclo celular	37
5.6. Papel en la respuesta a estrés celular	37

5.7.	PARP-1 y Muerte Celular.....	40
6.	Inhibición de PARPs como terapia en distintas enfermedades	43
6.1.	Desarrollo de Inhibidores de PARPs	44
6.2.	PARP-1 y Carcinogénesis: Empleo de los Inhibidores de PARPs.....	47
6.3.	PARP-1 y otros desórdenes patológicos	49
6.3.1.	Regulación del Sistema Inmunológico.....	50
6.3.2.	PARP-1 en Patologías Neuronales.....	50
6.3.3.	PARP-1 en Infección con VIH	51
6.3.4.	PARP-1 y la Enfermedad del Parkinson.....	51
	INTRODUCCIÓN II: Procesos de Muerte Celular.....	53
1.	Concepto de Muerte Celular y Clasificación	53
2.	Apoptosis: Muerte Celular Programada de Tipo I.....	55
2.1.	Caspasas	57
2.2.	Tipos de Caspasas.....	58
2.3.	Principales Vías de Activación de las Caspasas.....	59
2.3.1.	Vía Extrínseca o a través de Receptores de Muerte	59
2.3.2.	Vía Intrínseca o Mitocondrial.....	62
3.	Muerte Celular por Necrosis.....	64
4.	Muerte Celular Autofágica.....	66
5.	Cornificación.....	66
6.	Muerte por <i>PARthanatos</i> (Muerte Mediada por AIF).....	67
7.	Modalidades Atípicas de Muerte Celular	68
7.1.	Catástrofe Mitótica	68
7.2.	Anoikis.....	69
7.3.	Entosis.....	69
7.4.	Piroptosis.....	69
7.5.	Pyronecrosis.....	69
7.6.	Paraptosis.....	70
7.7.	Exotoxicidad.....	70
	INTRODUCCIÓN III: Autofagia.....	71
1.	Introducción y Concepto.....	71
2.	Morfología del proceso de Autofagia	72
3.	Tipos de Autofagia	73

3.1. Autofagia Adaptativa y de Supervivencia.....	74
3.1.1. Macroautofagia	74
3.2.1. Microautofagia	74
3.3.1. Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA).....	74
3.2. Muerte Celular Autofágica	75
4. Mecanismo Básico de la Macroautofagia	77
5. Inicio de la Autofagia: Formación de Autofagosomas.....	77
5.1. mTOR.....	78
5.1.1. Estructura de mTOR.....	79
5.1.3. Regulación y Funciones de mTORC1.....	80
5.1.2.1. Regulación de la Síntesis de Proteínas	81
5.1.2.2. Activación por Factores de Crecimiento	82
5.1.2.3. Inhibición por estrés energético	83
5.1.1. Regulación y Funciones de mTORC2.....	84
5.2. AMPk.....	85
5.2.1. Estructura de AMPk.....	85
5.2.2. Regulación de la actividad de AMPk.....	86
5.2.3. Funciones de AMPk.....	87
5.3. Control de la Autofagia a través de AMPk/mTORC1/ULK1	88
6. Nucleación de los Autofagosomas	91
7. Elongación de la Membrana de los Autofagosomas	91
8. Fusión de Lisosomas y Autofagosomas	92
9. Degradación y Reciclado	92
10. Autofagia y Cáncer	93
10.1. La Autofagia inhibe la tumorigénesis	93
10.2. La Autofagia promueve la supervivencia tumoral	94
INTRODUCCIÓN IV: Material Anexo	98
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	101
MATERIAL Y MÉTODOS	105
RESULTADOS.....	131
CAPÍTULO I	133
CAPÍTULO II.....	173
CONCLUSIONES.....	211

PERSPECTIVAS	215
BIBLIOGRAFÍA	221
ARTÍCULOS PUBLICADOS	253
OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS	291

ABREVIATURAS

3-AB	3-Amino Benzamida
3-MA	3-Metil Adenina
4EBP1	Proteína 1 de Unión a eIF4E
ACC	Acetil CoA Carboxilasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosín Difosfato
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
Akt	Proteín Quinasa B (PKB)
AMBRA1	<i>Autophagy/Beclin-1 Regulator 1</i>
AMD	Dominio de Automodificación (<i>Automodification Domain</i>)
AMP	Adenosín Monofosfato
AMPk	Quinasa Activada por AMP ó <i>AMP-Activated Kinase</i>
ANI	4-amino-1,8-naftalimida
ANK	Dominio Anquirina (<i>Ankyrin Domain</i>)
AP-1/2	Proteínas Activadoras 1 y 2
ARH3	ADP-Ribosil Hidrolasa 3
ARHs	ADP-Ribosil Hidrolasas
ARN	Ácido Ribonucleico
ART	ADP-Ribosil Transferasa (<i>ADP-ribosyl transferase</i>)
ARTD1	Poli (ADP-Ribosa) Transferasa 1
ARTD10	Poli (ADP-Ribosa) Transferasa 10
ARTD2	Poli (ADP-Ribosa) Transferasa 2
ARTD3	Poli (ADP-Ribosa) Transferasa 3
ARTD4	Poli (ADP-Ribosa) Transferasa 4
ARTD5	Poli (ADP-Ribosa) Transferasa 5 ó Tanquirasa 1
ARTD6	Poli (ADP-Ribosa) Transferasa 6 ó Tanquirasa 2
ARTD7	Poli (ADP-Ribosa) Transferasa 8
ARTD8	Poli (ADP-Ribosa) Transferasa 8
ATGs	<i>Autophagy Related Genes</i>
ATM	Gen de la Ataxia Telangiectasia
ATP	Adenosín Trifosfato
Bad/Noxa	Proteínas Apoptóticas “solo BH3”
BAL3	PARP-15 o Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 15
Bax/Bak	Proteínas Antiapoptóticas Tipo BAX
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL6	Proteína 6 del Linfoma de Células B
Bcl-x _L	<i>B-cell Lymphoma-Extra Large</i>
BCRT	<i>Breast Cancer Associated Protein C-Terminal Motif</i>
Beclin-1	Proteína de Unión a VSP34 en el autofagosoma
BER	Sistema de Reparación por Excisión de Bases
Bid/Bim _L	Proteínas Apoptóticas “solo BH3”
Bmf/Puma	Proteínas Apoptóticas “solo BH3”
Bok	Proteínas Antiapoptóticas Tipo BAX
BRCA	<i>Breast Cancer Protein</i>
C57BL/6J	Ratones <i>parp-1</i> ^{-/-} cepa C57BL/6J
CaMκκβ	<i>Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase kinase β</i>
CAT	Domino Catalítico o de Unión al ADN (<i>Catalytic Domain</i>)
CBS	Secuencia <i>Crystathionine-β-Synthase</i>
ced	Gen <i>cell death abnormal</i>

Abreviaturas

CHOP	<i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein</i>
CLOCK	Factor de Transcripción Circadiano
CRD	<i>Cystein-Rich Domain</i>
Crm1	Receptor de Exporte Nuclear 1 (<i>Nuclear Export Receptor 1</i>)
CXCL1	Citoquina <i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1</i>
DBD	Dominio de Unión al ADN (<i>DNA Binding Domain</i>)
DD	Dominios de Muerte (<i>Death Domain</i>)
DEVD	Región de Procesamiento por Caspasas 3 y 7
DISC	Complejo Inductor de Señales de Muerte
DNA-PK _{cs}	Proteín Quinasa Dependiente de ADN
DPQ	<i>(3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinone]</i>
DSBs	Daños del Doble Cadena al ADN (<i>Double-Strand Breaks</i>)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
eIF4E	Factor Eucariótico de Inicio de la Traducción 4E
eIF4G	Factor Eucariótico de Inicio de la Traducción 4G
EMT	Diferenciación Epitelio Mesénquima
ERK1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase ½</i>
FADD	Dominio de Muerte Asociado a FAS
Fas-L	Ligando de Fas
Fas-R	Receptor para el Ligando de Fas
FI, FII, FIII	Dedos de Zinc I, II y III (<i>Zinc Fingers</i>)
FIP200	RB1CC1 ó <i>RB1-Inducible Coiled-Coil 1</i>
FLIP	Proteína Inhibidora de Caspasa 8
G1/S	Fases G1/S del Ciclo Celular
G2/M	Fase G2/M del Ciclo Celular
Glut4	Transportador de Glucosa Tipo 4
GSK3β	<i>Glycogen Synthase kinase 3</i>
GTP	Trifosfato de Guanosina ó Guanosina-5'-trifosfato
H1	Histona H1
HCQ	Hidroxi-Cloroquina
HIF-1α/2α	Factores Inducibles por Hipoxia 1α y 2α
HMGB1	Histona <i>High-Mobility Group Protein B1</i>
HMGCR	Hidroximetil Glutarato CoA Reductasa
HP-1α	Proteína de la Heterocromatina 1α
HR	Sistema de Reparación por Recombinación Homóloga
HTH	Motivo Hélice-Giro-Hélice (<i>Helix Turn Helix</i>)
Iduna	Ubiquitín Ligasa E3 RNF146/Iduna
IHRP	<i>Inter- α-Trypsin Inhibitor Protein</i>
Il-1β	Interleukina-1 β
IL-2	Inteleuquina 2
INH2B	<i>5-iodo-6-amino-1,2-benzopyrone</i>
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa
IRAP	Proteína Antagonista del Receptor de Interleukina-1
JNK ½	Quinasas N-Terminal de c-Jun
LAMP1/2	<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein ½</i>
LC3	<i>Light Chain of the Microtubule-Associated Protein 1</i>
LKB1	<i>Liver Kinase-1</i>
LZ	Cremallera de Leucina (<i>Leucine Zipper</i>)
MAPk	Proteín Quinasas Activadas por Mitógeno

mATG13	<i>Mammalian Autophagy-Related Gen 13</i>
mdm2	Gen Mouse Double Minute 2 ó Supresor de p53
MEFs	Fibroblastos Murinos Embrionarios Inmortalizados
MRE11	<i>Gen Meiotic Recombination 11</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MVP	Dominio con Función tipo Riboproteína de VPARP
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NCCD	<i>Nomenclature Committee on Cell Death</i>
NF-κB	Factor Nuclear Potenciador de Cadenas Ligeras κ de Células B
NHEJ	Sistema de Reparación ADN por Unión Extremos Homólogos
NLS	Secuencia de Localización Nuclear
NU1025	4-amino-1,8-naftalimida
p10	Subunidad Pequeña de las Caspasas
p20	Subunidad Grande de las Caspasas
p21	Gen del Inhibidor de Quinasas Dependientes de Ciclinas
p300/CBP	Acetil-Transferasa p300/CBP
p38	Proteín Quinasa Activada por Mitógeno 38
p53	Proteína Tumoral 53 ó “Guardián del Genoma”
p70 ^{S6k}	Quinasa de la Proteína Ribosomal S6
PAR	Poli ADP-Ribosa
PARG	Poli (ADP-Ribosa) Glicohidrolasa
PARP-1	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 1
PARP-10	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 10
PARP-2	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 2
PARP-3	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 3
PARP-4	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 3
PARP-8	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 8
PDK1	Proteína Quinasa Dependiente de PIP ₃
PE	Fosfatidil Etanolamina
PI3k	Fosfatidil Inositol 3 Kinasas
PIKK	<i>Phosphoinositide 3-kinase (PI3k)-Related kinase Family</i>
PIP ₂	Fosfatidil-inositol-4-5-fosfato
PIP ₃	Fosfatidil-inositol-3-4-5-fosfato
PJ34	<i>([N-(6-Oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide])</i>
PKC-α	Proteína Quinasa C α
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trisfosfato 3-Fosfatasa
RAB7	GTPasa localizada en la zona del Trans-Golgi
RAD51	Proteína Reparación ADN de Daños tipo DSBs
Rheb	GTPasa reguladora del complejo mTORC1
RIP1	<i>Receptor Interacting Protein Kinase 1</i>
RNS	Especies Reactivas del Oxígeno
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
RTKs	Receptores tipo Tirocín Quinasas
SGK1	<i>Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase 1</i>
SIRT1	Sirtuína-1 Desacetilasa Dependiente de NAD ⁺
SODD	Proteína Inhibidora de Muerte de TNFR1
SP100	Sustrato de las Transglutaminas 5
SQSTM1	Secruestrosoma 1 ó Proteína p62
SSBR	Sistema de Reparación de Roturas Simples de Cadena

Abreviaturas

SSBs	Daños de Simple Cadena al ADN (<i>Single-Strand Breaks</i>)
STRAD	<i>STE20-related adaptor</i>
SV129	Ratones <i>parp-1</i> ^{-/-} cepa CSV129
TAK1	<i>TGF-β Activating Kinase 1</i>
TBI	Lesión Traumática Cerebral ó <i>Traumatic Brain Injury</i>
TGF-β	Factor de Crecimiento Tumoral β
TIF-1β	Factor Intermediario Transcripcional 1β
TLR3/4	<i>Toll-Like Receptors Type 3 and 4</i>
TNFR1	Receptor de TNF tipo 1
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α
TRADD	Dominio de Muerte Asociado al Receptor de TNF
TRAF2/5	<i>TNFR-Associated Factor 2/5</i>
TRAIL	Ligando Inductor de Apoptosis Ligado a TNF
TRAIL-R	Receptores de TRAIL
TRF1	Factor de Unión Telomérico 1 (<i>Telomere Binding Factor-1</i>)
TSC1-TSC2	Complejo Supresor de Tumores regulador de mTORC1
ULK1	Unc-51-Like Kinase 1 ó ATG1
UVRAG	<i>UV Radiation Resistance Associated</i>
VPARP	<i>Vault</i> -PARP ó PARP-4
VSP34	Fosfatidil Inositol 3 Fosfato Quinasas de Clase III
WGR	Subdominio Triptófano, Glicina y Arginina
WIPI-1/2	Efactor Fosfolipídico de la Superficie del Autofagosoma
XRCC1	<i>X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1</i>

RESUMEN GENERAL

La autofagia es una ruta degradativa lisosomal por la cual distintos componentes citoplasmáticos van a ser englobados en estructuras cerradas de doble membrana denominadas Autofagosomas. Previa fusión con lisosomas, los autofagosomas adquieren la capacidad de degradar el contenido que albergan por acción de las proteasas ácidas lisosomales, la vesícula degradativa resultante se denomina Autolisosoma. La autofagia está considerada como la principal ruta de reciclado de proteínas de larga vida y eliminación de orgánulos aberrantes. El proceso de autofagia presenta un componente tanto de adaptación y supervivencia celular como de muerte. Dependiendo del tipo de estímulo que la induzca y de la intensidad/durabilidad del mismo en el microambiente celular, podremos diferenciar entre Autofagia Adaptativa y Muerte Celular Autofágica.

Como tal es un proceso esencial en la homeostasis celular, que además interviene durante el desarrollo embrionario y en el mantenimiento tisular, sin embargo se sabe que la autofagia es un proceso tremendamente regulado en distintos tipos de tumores donde juega un papel dual, pudiendo actuar como mecanismo de resistencia y adaptación o como proceso de muerte celular programada.

PARP-1 es un enzima nuclear muy conservado en organismos eucariotas superiores. Es el miembro más abundante de una superfamilia proteica de 18 miembros denominada Familia PARP. PARP-1 cataliza la formación de un polímero ramificado de ADP-Ribosa (PAR) partiendo del precursor NAD^+ , en una reacción enzimática denominada Poli ADP-Ribosilación o PARilación. Es capaz de sintetizar hasta el 85% de todo el polímero de ADP-Ribosa necesario para el mantenimiento de la homeostasis nuclear.

La principal función biológica de PARP-1 es la de actuar como molécula señalizadora de daños al ADN, de forma que permite el reclutamiento a la zona dañada de las proteínas encargadas de reparar los daños. PARP-1 además se relaciona con otros procesos biológicos, por ejemplo interviene en el mantenimiento de la estructura de la cromatina, tiene funciones reguladoras en el proceso de transcripción génica e incluso interviene en la respuesta celular ante distintos tipos de estreses. En este sentido la biología de la Poli ADP-Ribosilación es fuente de estudio en diversas situaciones fisiológicas básicas como son la

muerte celular controlada, el desarrollo embrionario o el mantenimiento tisular, pero también se la relaciona con procesos patofisiológicos como son el envejecimiento, respuesta inflamatoria aguda o el cáncer.

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el papel que juega PARP-1 y la Poli ADP-Ribosilación como mediadores directos del proceso de autofagia, bajo un estrés fisiológico nutricional. Las condiciones desfavorables que las células cancerígenas encuentran en el microambiente tumoral, tanto de disponibilidad de nutrientes como de oxígeno, son agentes causales de la autofagia. En esta situación vamos a analizar la relación que existe entre la autofagia como mecanismo adaptativo ante la carencia de nutrientes y el proceso de Poli ADP-Ribosilación.

Hemos demostrado que la ausencia o inhibición de la proteína PARP-1, retrasa considerablemente la autofagia inducida por privación de nutrientes y que los daños al ADN, inducidos por la producción de Especies Reactivas del Oxígeno, son un evento temprano durante la autofagia inducida por privación, siendo éstos el desencadenante de la activación de PARP-1, conduciendo a una importante caída o depleción en los niveles de ATP.

La caída en los niveles de ATP son detectados por la quinasa AMPk que inducirá la ruta de autofagia a través de la inactivación del complejo mTORC1. La ausencia de PARP-1 mantiene inactiva a AMPk y además impide la pérdida completa de la actividad de mTORC1, lo que conlleva a una deficiencia en la inducción de autofagia. Del mismo modo células *parp-1*^{-/-} o tratadas con los inhibidores de PARP desarrollan fenómenos de muerte celular inducida por privación nutricional, lo que confirma que la autofagia mediada por la activación de PARP-1 es un proceso adaptativo y previene de la muerte celular durante estrés nutricional.

Nuestros resultados demuestran que el grado de activación de PARP-1 va a influir sobre la velocidad con que la célula entra en autofagia en respuesta a la retirada de nutrientes. La inhibición de PARP-1 y la caída en los niveles de PAR en la célula, enlentecen el flujo autofágico mientras que la acumulación no tóxica de polímero PAR la acelera. El mayor flujo autofágico no viene marcado por un intento de detoxificación celular, ya que no se afecta la viabilidad celular.

El proceso de Poli ADP-Ribosilación va a regular no solo la autofagia sino que también es capaz de modular la síntesis de proteínas a través de la actividad mTORC1. A través de la interacción directa y modificación por PARilación de AMPk en el núcleo, PARP-1 permite una adecuada activación de AMPk. AMPk PARilada será exportada del núcleo al citosol, favoreciendo la inactivación de mTORC1 y la inducción de autofagia a través de la activación del ULK1. La ausencia de PARP-1 o la inhibición de la PARilación mantienen a AMPk unida a PARP-1, no produciéndose la modificación por PAR que AMPk necesitaría para inducir autofagia durante retirada de nutrientes.

Por tanto, según nuestros resultados PARP-1 y la Poli (ADP-Ribosilación) son factores clave en el inicio y el mantenimiento de la ruta autofágica, convirtiendo a PARP-1 en un nuevo sensor del estatus energético celular a través de su capacidad de interaccionar y modificar la activación de AMPk/mTORC1 y probablemente de otras etapas de la autofagia.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN I: Biología de la Poli (ADP-Ribosilación)

1. Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 1

La proteína Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 1 (PARP-1; EC2.4.2.30), también conocida como Poli (ADP-Ribosa) sintetasa y Poli (ADP-Ribosa) transferasa (ARTD1), es un enzima nuclear altamente conservada en todos los organismos eucariotas superiores incluidas plantas y en la mayoría de organismos eucariotas inferiores, aunque se encuentra ausente en levaduras y en procariontes (Burkle 2005). Fue descrita por primera vez por Chambon y colaboradores en los años 60 (Chambon, Weill et al. 1963) y desde entonces son muchos los grupos que han analizado diferentes aspectos de su biología, tanto a nivel estructural como funcional. PARP-1 cataliza la síntesis y transferencia covalente de polímeros ramificados de ADP-ribosa o PAR a distintos aceptores nucleares en una reacción enzimática denominada Poli ADP-Ribosilación (Suzuki, Quesada et al. 1986) y que será objeto de profundo análisis en el apartado 2 de la introducción. Actualmente se acuñan nuevas definiciones de la reacción como son Parilación o PARilación (*PARylation*).

De forma general a PARP-1 se le atribuye la función de proteína de reconocimiento y señalización de daños al ADN provocados por estrés genotóxico, para que posteriormente sean reparados de forma satisfactoria por las distintas proteínas de reparación del material genético que forman partes del BER (Sistema de Reparación por Excisión de Bases) y del SSBR (Sistema de Reparación de Roturas Simples de Cadena); así pues es considerada como una proteína crucial en el mantenimiento de la homeostasis nuclear (D'Amours, Desnoyers et al. 1999). Sin embargo, en los últimos años son muchas y distintas las funciones celulares que se le atribuyen a PARP-1: está constatado que PARP-1, a través de su actividad enzimática, se relaciona con el mantenimiento de la estructura de la cromatina, la regulación de la transcripción, procesos de muerte celular programada, teniendo como consecuencia un impacto directo sobre procesos de infección vírica, envejecimiento y con distintas enfermedades neurodegenerativas, inflamación y cáncer. La PARilación es una modificación post-traducciona capaz de modular la expresión génica y la actividad de rutas bioquímicas cruciales en la homeostasis celular (Kim, Zhang et al. 2005, Gibson and Kraus 2012). El grado de importancia

de PARP-1 y el metabolismo de la PARilación en todos los procesos anteriores, será sometido a un estudio más profundo en apartados posteriores de esta tesis. Debido a esta importancia y como ya analizaremos más adelante, PARP-1 es considerada como una diana farmacológica efectiva en los tratamientos de distintas enfermedades, destacando el ámbito de la biología tumoral.

2. Poli (ADP-Ribosilación): Metabolismo de la Poli ADP-ribosa

2.1. Síntesis de Poli ADP-Ribosa: La reacción bioquímica de Poli ADP-Ribosilación o PARilación consiste en la formación de polímeros ramificados de ADP-ribosa o PAR. La PARilación conlleva dos etapas posteriores a la formación del polímero; la primera consiste en la unión covalente de PAR sobre aceptores nucleares llevada a cabo por la propia enzima PARP-1 y la segunda lleva a cabo la eliminación de PAR de dichos aceptores, el reciclado del polímero para completar el ciclo y dejar accesibles los sustratos de la reacción; en esta etapa destacaremos la acción de distintas proteínas como PARG, ARH3 o NAMPT. La reacción enzimática se divide en 3 etapas (**Figura INT.1**) (Burkle 2005, Hassa and Hottiger 2008):

a) Obtención de ADP-Ribosa: PARP-1 reconoce como donador de Ribosa libre a la forma oxidada del nucleótido Nicotinamida Adenina Dinucleótido o NAD⁺. PARP-1 va a romper el enlace glicosídico entre la Nicotinamida y la Ribosa, dejando accesible la Ribosa para la siguiente etapa. La ruptura implica el gasto de energía en forma de ATP.

b) Elongación y Ramificado: Distintos monómeros de ADP-Ribosa se van a unir entre ellos en una única vía Ribosa (1''→2') Ribosa Fosfato-Fosfato; de esta forma es capaz de generarse un polímero lineal de hasta 200 monómeros de ADP-ribosa. A distintas alturas se produce la ramificación del polímero lineal a partir de la formación de enlaces Ribosa (1''→2'') y el grupo Nicotinamida de la ribosa proximal (Alvarez-Gonzalez, Watkins et al. 1999). El número de elongaciones hasta conseguir el tamaño deseado varía entre 20 y 50 (Kiehlbauch, Aboul-Ela et al. 1993), y siempre debe conseguirse la orientación deseada de los monómeros de ADP-Ribosa en el centro catalítico de PARP-1.

el ciclo del NAD⁺ (Kim, Zhang et al. 2005, Nguewa, Fuertes et al. 2005, Gibson and Kraus 2012). A continuación detallamos el metabolismo que sufre el NAD⁺ y la ADP-Ribosa por acción de PARP-1, PARG y ARH3.

2.2. Degradación y reciclado de PAR: El enzima mejor estudiado encargado de degradar polímeros PAR es la **Poli ADP-Ribosa Glicohidrolasa o PARG**, que presenta tanto actividad Endo- como Exo-Glicohidrolasa. PARG está presente en células de mamífero en 3 isoformas diferentes:

- Isoforma I e Isoforma II de 99 y 102 kDa respectivamente, que se localizan en el citoplasma (Tucker, Bennett et al. 2012).
- Isoforma III de 110 kDa que se localiza predominantemente en el núcleo (Meyer-Ficca, Meyer et al. 2004).

Las isoformas I y II presentan una secuencia de exporte nuclear o NES, mientras que PARG III presenta una típica secuencia de localización nuclear o NLS. Lejos de tener actividades enfrentadas, PARP-1 y PARG son enzimas con funciones relacionadas y complementarias, ya que el correcto reciclado de PAR es esencial para que PARP-1 se mantenga activa y pueda iniciar un nuevo ciclo de PARilación (Slade, Dunstan et al. 2011). Se ha descrito que el centro catalítico de PARG, rico en Glutámico, es tremendamente afín por moléculas de PAR; una vez unido a éstas es capaz de hidrolizar el enlace α (1"→2') de los monómeros de ADP-Ribosa. La actividad Exo-Glicohidrolasa se desarrollará sobre los puntos de ramificado o *Branching* rompiendo los enlaces glicosídicos α (1" →2") (**Figura INT.2**). Cuando PARG ha finalizado su acción, entra en juego el enzima **ADP-Ribosil Liasa** que escindiré el enlace éster entre la proteína modificada y el primer monómero de ADP-Ribosa (D'Amours, Desnoyers et al. 1999, Davidovic, Vodenicharov et al. 2001, Kraus and Lis 2003).

Recientemente se ha descrito otro grupo de enzimas capaz de degradar PAR, incluye a las proteínas ARHs (ADP-Ribosil Hidrolasas). Dentro de este grupo destacamos al enzima **ARH3 o ADP-Ribosil Hidrolasa-3**. Es una proteína distinta en estructura a PARG nuclear y presenta la peculiaridad de que solo puede degradar polímeros PAR y no Mono ADP-Ribosa (**Figura INT.2**) (Oka, Kato et al.

2006). ARH3 está altamente conservada en todos los vertebrados y está implicada en la degradación de PAR asociado a la matriz mitocondrial, aunque su función *in vivo* aún no está totalmente clara (Niere, Mashimo et al. 2012).

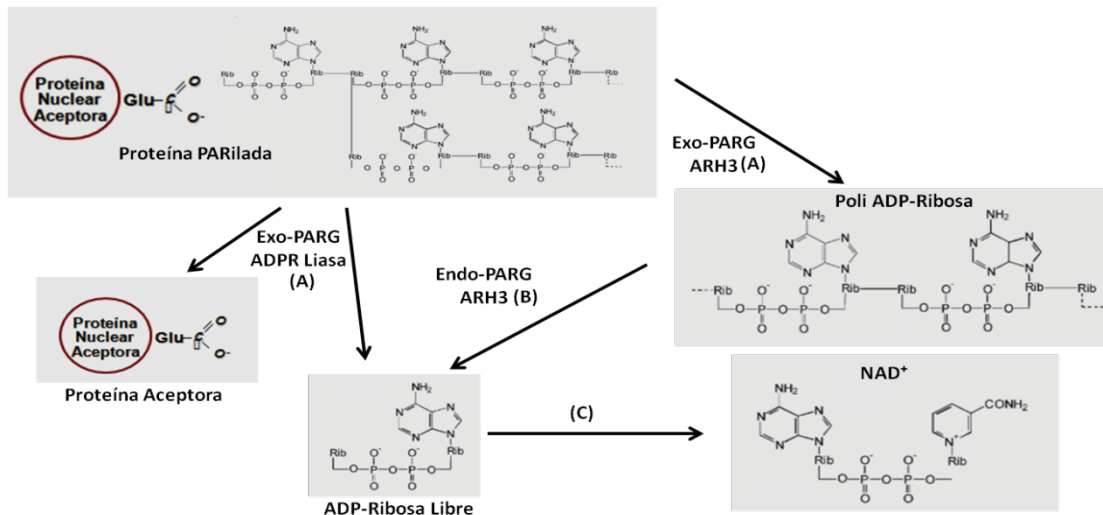


Figura INT.2. Degradación de PAR: Acción de PARG y ARH3. (A): Actividad Exo-Glicohidrolasa rompe los enlaces éster con el aceptor proteico y los enlaces entre Ribosomas de PAR generando ADP-Ribosa libre y polímero PAR no ramificado. ARH3 tiene una función similar. ADPR Liasa escinde el primer monómero de ADP-Ribosa. (B): Acción Endo-Glicohidrolasa y ARH3 para obtener monómeros de ADP-Ribosa libres. (C): Síntesis de NAD⁺ a partir de ADP-Ribosa por distintas enzimas como ADP-Ribosa Pirofosfatasa (Kraus and Lis 2003).

De la acción de ambas enzimas se va a obtener monómeros de ADP-Ribosa que posteriormente deben de reciclarse hasta conseguir los precursores del NAD⁺. Es entonces cuando el enzima **ADP-Ribosa Pirofosfatasa** procesará la ADP-Ribosa, hasta conseguir Adenosina 5' monofosfato que reaccionaría con la Ribosa 5-fosfato para obtener NAD⁺ (Diefenbach and Burkle 2005).

Como material anexo a la introducción, incluimos un esquema general de toda la ruta de Poli ADP-Ribosilación detallando las reacciones bioquímicas con todos los intermediarios y los enzimas (**Figura Anexa 1**).

3. Estructura de PARP-1

PARP-1 humana es una proteína de aproximadamente 114 kDa codificada por el cromosoma 1 con una localización genética 1q41-q42. Consta de 3 dominios estructurales bien definidos, cada uno de los cuales se compone de varios subdominios con funciones específicas relacionadas con la interacción con el genoma y con su función biológica. La estructura general de PARP-1 podría quedar resumida de la siguiente forma (**Figura INT.3**):

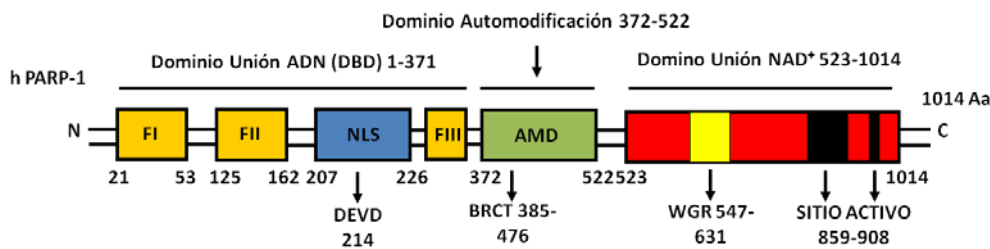


Figura INT.3. Organización Estructural de PARP-1: Representación esquemática de los distintos dominios estructurales y funcionales de la proteína PARP-1 humana.

3.1. Dominio de Unión al ADN o DBD: localizado en el extremo N-Terminal de la proteína, posee un peso molecular aproximado de 46 kDa. En este dominio se localizan dos estructuras en Dedos de Zinc, denominadas regiones FI y FII respectivamente. FI y FII permiten la unión a múltiples estructuras de ADN favoreciendo la síntesis de Poli (ADP-ribosa) y la interacción de PARP-1 con la cromatina (Caldecott, Aoufouchi et al. 1996, Langelier, Planck et al. 2011, Langelier, Planck et al. 2011). Recientemente un tercer Dedo de Zinc ha sido caracterizado, al que se le ha denominado FIII, de estructura distinta a FI y FII y cuya función se basaría en permitir el contacto interdominios de la molécula de PARP-1 con zonas del ADN que presentan daños de doble cadena, necesario para la activación de PARP-1 (Langelier, Servent et al. 2008). Dentro del dominio DBD se localiza la Secuencia de Localización Nuclear o Subdominio NLS, donde a su vez encontramos una región de procesamiento por caspasas 3 y 7 o Región DEVD, lo que indica que PARP-1 está relacionada por procesos de muerte celular por apoptosis, siendo uno de los eventos más tempranos que ocurren en el desarrollo de este proceso de muerte celular programada (Kaufmann, Desnoyers et al. 1993, Lautier, Lagueux et al. 1993).

3.2. Dominio de Automodificación o AMD: Tiene un peso molecular de aproximadamente 22 kDa. Este dominio central contiene residuos de Glutámico, Aspártico y Lisina que actúan como aceptores putativos de ADP-ribosilación, permitiendo que PARP-1 pueda modular su propia actividad. Además se localiza un motivo de gran importancia denominado Cremallera de Leucina (*Leucine Zipper*) o LZ, responsable de las distintas interacciones de PARP-1 con múltiples proteínas nucleares, tanto en reacciones de homo- como heterodimerización. En tercer lugar el Dominio AMD contiene el motivo BCRT (*Breast Cancer Associated Protein C-Terminal Motif*), el cual es común en muchas proteínas de reparación del ADN y del ciclo celular y cuya mutación se asocia al cáncer de mama (**Figura INT.3**) (D'Amours, Desnoyers et al. 1999, Diefenbach and Burkle 2005).

3.3. Dominio de Unión al NAD⁺ o Dominio Catalítico (CAT): Localizado en la región C-Terminal de la proteína, consta de 54 kDa de peso molecular. Podemos diferenciar un Dominio WGR que es una región rica en residuos de Triptófano, Glicina y Arginina, la cual participa junto con los motivos en dedos de Zinc FI y FIII, en el reconocimiento de zonas con roturas de doble cadena en el ADN, por lo tanto los dominios WGR son esenciales para la actividad de PARP-1 además de estar considerados como la mínima estructura proteica necesaria para el reconocimiento de daños al ADN (Langelier, Servent et al. 2008, Altmeyer, Messner et al. 2009). La actividad catalítica recae sobre el Dominio ART (*ADP-ribosyl transferase*), el cual presenta una alta homología con otras ADP-ribosil Transferesas (**Figura INT.3**). Este dominio ART consta de una estructura terciaria muy conservada donde podemos diferenciar tanto Láminas como Hélices α , sobre las cuales se va a realizar la unión al sustrato NAD⁺ (Ruf, Mennissier de Murcia et al. 1996, Ruf, de Murcia et al. 1998). Esta alta homología ha permitido establecer el concepto de Firma de PARP-1 o "*PARP Signature Motif*" (100% conservado entre vertebrados) usado como criterio para la clasificación de los distintos componentes de la familia de las Poli (ADP-ribosa) Polimerasas (**Figura INT.4**) (Ame, Spenlehauer et al. 2004, Oliver, Ame et al. 2004, Burkle 2005, Karlberg, Langelier et al. 2013, Langelier and Pascal 2013). Cada uno de los miembros de dicha familia será estudiado en el siguiente apartado de esta tesis.

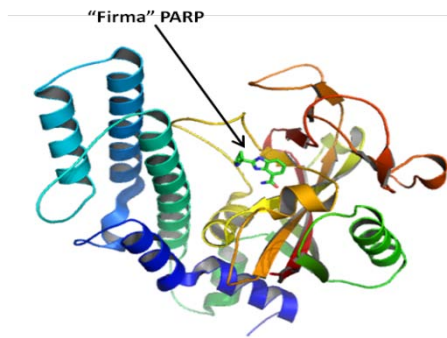


Figura INT.4. PARP Signature Motif de PARP-1. Se encuentra localizado en el Dominio ART. (Langelier and Pascal 2013).

Finalmente en el dominio catalítico y flanqueando la región WGR, aparecen dos zonas de las cuales se desconoce su función biológica o importancia en la biología de PARP-1. En ellas se localizan motivos HTH (*Helix Turn Helix*) conocidos por ser dominios de unión de proteínas al ADN. Existe una teoría que establece que PARP-1, a través de estos motivos HTH, podría interactuar con el ADN no dañado. En esta situación no se favorecería la reacción de Parilación encaminada a señalar el daño, por lo tanto esta interacción sería contraria a la que establecen los motivos FI, FII y WGR con el ADN dañado y que sí activaría la señalización a través de Parilación. En plantas el papel de los motivos HTH de PARP-1, está más claro y se sabe que permite la interacción de PARP-1 con los cromosomas mitóticos, permitiendo que el ciclo celular se desarrolle de forma correcta (Babiychuk, Van Montagu et al. 2001).

4. Familia PARP

Utilizando la secuencia “Firma PARP” como criterio de búsqueda de homólogos humanos de PARP-1, se ha establecido una Superfamilia compuesta por 18 proteínas PARPs (Ame, Spenlehauer et al. 2004, Hassa and Hottiger 2008) (**Figura INT.5**). Cada uno de los miembros se encuentra codificado por una secuencia génica específica, pero todos mantienen esa secuencia o “firma” característica. PARP-1, como miembro fundador de la familia, es la proteína más importante de la familia; es capaz de producir hasta un 85% de todo el polímero de ADP-ribosa necesario para la homeostasis nuclear. Sin embargo dentro de la familia existen otros componentes con funciones celulares recientemente descritas, relacionadas o no con la Poli (ADP-ribosilación), como son PARP-2, PARP-3, PARP-4 o PARP-16.

A pesar de que la “Firma PARP” es utilizada como criterio de clasificación, su conservación varía entre los distintos miembros, tanto que algunos de ellos no mantienen la actividad catalítica de PARilación y ADP-ribosil Transferasa (Burkle

2005, Dantzer, Ame et al. 2006, Schreiber, Dantzer et al. 2006, Hassa and Hottiger 2008). Teniendo en cuenta esto, se estableció un nuevo sistema de nomenclatura fundamentado tanto en su arquitectura molecular como en su función biológica conocida. En este nuevo sistema de clasificación, cada uno de los miembros fue renombrado a partir de la función ADP-ribosil transferasa como proteínas ARTDs (Hassa and Hottiger 2008, Gibson and Kraus 2012). Hoy en día aún existe controversia y discusión acerca de la integración de algunos de los miembros en la familia, así como de que presenten o no funciones de Mono- o Poli (ADP-ribosa) transferasa; pero de forma general se han agrupado a los miembros en 4 subfamilias:

❖ **PARPs dependientes de NAD⁺:**

- PARP-1 (ARTD1)
- PARP-2 (ARTD2)
- PARP-3 (ARTD3)

❖ **Tanquirasas:**

- Tanquirasa 1 (PARP-5A, ARTD5)
- Tanquirasa 2 (PARP-5B, ARTD6)

❖ **PARPs con motivos CCCH (Cys-Cys-Cys-His):**

- TIPARP (PARP-7, ARTD14)
- PARP-12 (ARTD12)
- PARP-13.1 y PARP-13.2 (Ambas ARTD13)

❖ **Macro-PARPs:**

- BAL1 (*B-aggressive lymphoma Protein 1*) (PARP-9, ARTD9)
- BAL2 (PARP-14, ARTD8)
- BAL3 (PARP-15, ARTD7)
- VPARP (PARP-4, ARTD4)

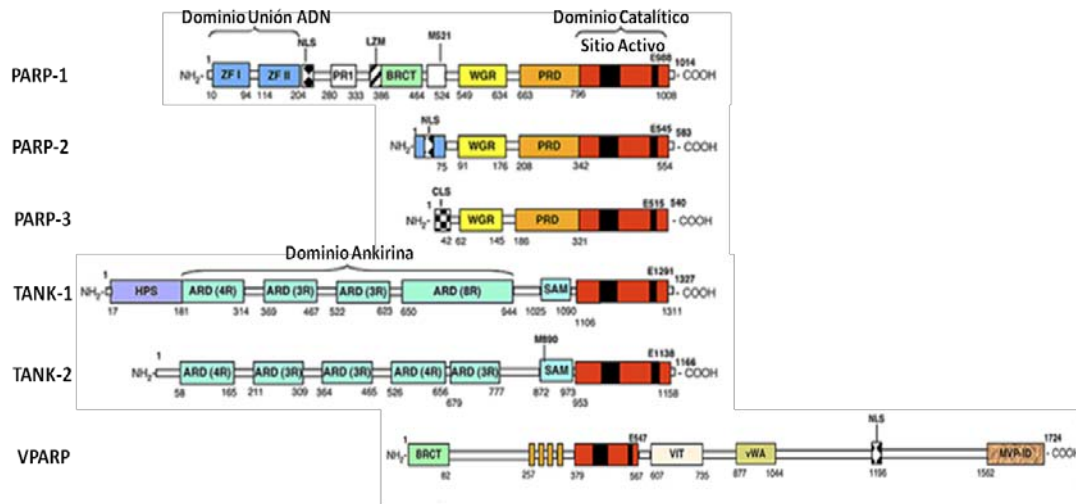


Figura INT.5. Principales miembros de la Familia PARP humana: PARP-1 (ARTD1), PARP-2 (ARTD2), PARP-3 (ARTD3), TANK-1 (Tanquirasa-1 o ARTD5), TANK-2 (Tanquirasa-2 o ARTD6) y VPARP (ARTD4 o PARP-4) (Hassa and Hottiger 2008).

En la tabla 1 se resumen de forma comparativa localización subcelular, nomenclatura, características estructurales y funcionales y la actividad enzimática de todos los miembros de la Superfamilia. **(Tabla Anexa 1)**. A continuación haremos un estudio detallado de las PARPs más destacadas:

4.1. PARP-1 (ARTD1): las múltiples funciones de PARP-1 serán objeto de profundo análisis en apartados posteriores de esta tesis doctoral (apartado 5 Funciones de PARP-1 humana de la Introducción).

4.2. PARP-2 (ARTD2): La proteína PARP-2 fue descrita como resultado de la existencia de una actividad residual PARP en Fibroblastos Murinos Embrionarios o MEFs procedentes de ratones deficientes en PARP-1 (*parp-1*^{-/-} MEFs). Al igual que PARP-1, presenta funciones tanto de Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa como de ADP-ribosa Transferasa. Su tamaño es inferior al de PARP-1, presentando únicamente como motivo característico el dominio WGR **(Figura INT.5)**. El dominio catalítico de PARP-2 presenta un 69% de homología con el de PARP-1, no obstante las diferencias estructurales en el dominio de automodificación le confieren diferencias en cuanto a las proteínas con las que puede asociarse (Ame, Rolli et al. 1999, Ame, Spenlehauer et al. 2004, Boehler, Gauthier et al. 2011). A pesar de no presentar dominio de unión al ADN, está enriquecida en aminoácidos de carácter básico, lo que podría permitir su interacción con moléculas de ADN. Esta característica hace que PARP-1 y PARP-2

sean los únicos miembros capaces de reconocer daños de doble cadena en el ADN, participando activamente en la señalización encaminada a la reparación de material genético por los sistemas BER y SSB (Schreiber, Ame et al. 2002, Oliver, Ame et al. 2004). La relación que existe entre PARP-1 y PARP-2 con los sistemas de reparación de ADN está recogida en la siguiente figura (**Figura INT.6**).

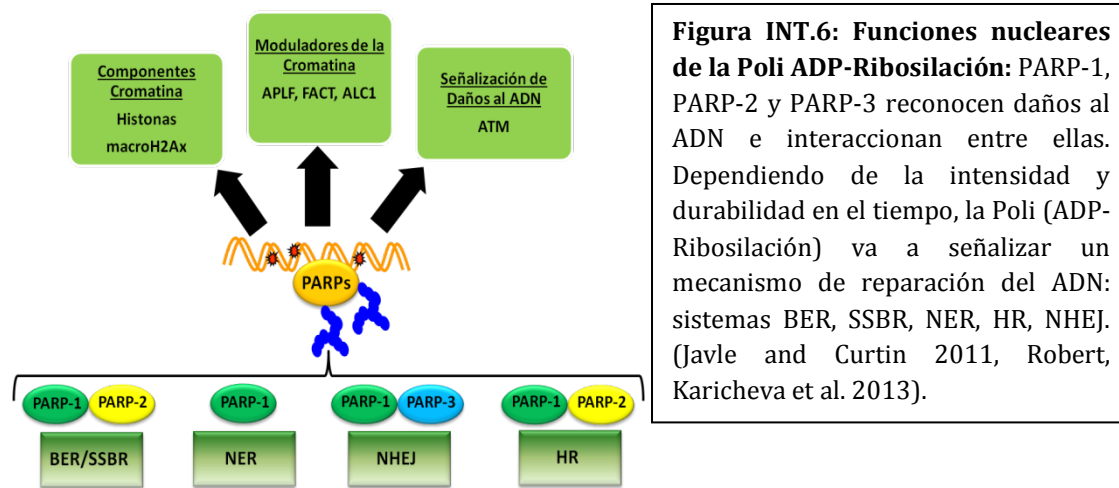


Figura INT.6: Funciones nucleares de la Poli ADP-Ribosilación: PARP-1, PARP-2 y PARP-3 reconocen daños al ADN e interaccionan entre ellas. Dependiendo de la intensidad y durabilidad en el tiempo, la Poli (ADP-Ribosilación) va a señalar un mecanismo de reparación del ADN: sistemas BER, SSB, NER, HR, NHEJ. (Javle and Curtin 2011, Robert, Karicheva et al. 2013).

Estudios recientes de varios grupos le atribuyen a PARP-2 funciones específicas en procesos celulares tan importantes como:

4.2.1. Mantenimiento del genoma durante espermatogénesis: PARP-2 se encuentra altamente expresada en testículos, donde regula la compactación de la cromatina, favorece la reparación ante la existencia de daños por estrés oxidativo y regula los procesos de muerte celular por apoptosis cuando se produce inactivación de los cromosomas sexuales que desencadenan fallos de división celular en la Meiosis I de los espermatozoides (Dantzer, Mark et al. 2006, Jha, Agarwal et al. 2009, Mahfouz, Sharma et al. 2009).

4.2.2. Regulación de la Timopoiesis y la respuesta inflamatoria: Recientes estudios han demostrado que PARP-2 se encuentra altamente expresada en la Zona Subcapsular del Timo, donde se produce la proliferación de los linfocitos. Dicha expresión irá decreciendo en las etapas maduras de las líneas linfocitarias. Se ha descrito que una delección en PARP-2 causa un decrecimiento en el tamaño del Timo y en el número total de Timocitos CD4⁺ / CD8⁺ (Yelamos, Monreal et al. 2006). Del mismo modo una atrofia en el Timo acarrea una restricción en el repertorio de Linfocitos T y en la respuesta inmune mediada por éstos. Tanto la inhibición como las delecciones de PARP-1 y PARP-2, desencadena

protección frente a la respuesta inflamatoria mediada por factores tales como iNOS, Il-1 β o TNF α ; sin embargo el mecanismo exacto de cómo la ausencia genética de PARP-2 otorga dicha protección se desconoce (Popoff, Jijon et al. 2002, Phulwani and Kielian 2008).

4.2.3. Regulación de la expresión génica: La depleción del gen *parp-2* modifica la actividad de diversos factores de transcripción, lo que altera la expresión de proteínas tales como SIRT1, en este caso actuaría como represor de la actividad desacetilasa de SIRT1 modulando negativamente por PARilación a sus factores de transcripción (Bai, Canto et al. 2011, Bai, Canto et al. 2011). Incluso puede provocar fallos en el modelado de la cromatina al no ser capaz de Poli (ADP-ribosilarse) los factores TIF-1 β y HP-1 α por PARP-2 (Quenet, Gasser et al. 2008, Quenet, El Ramy et al. 2009).

4.2.4. Control del metabolismo energético: La regulación transcripcional de PARP-2 ha sido asociada con el metabolismo celular. Ratones deficientes en PARP-2 son más pequeños y presentan menos acumulación lipídica que organismos normales o *wildtype*. Se sabe que presentan altos consumos de oxígeno y carencias en los procesos de β -oxidación de los ácidos grasos (Bai, Canto et al. 2011). El músculo esquelético de dichos animales presenta un incremento en el número de mitocondrias, lo que está relacionado con la alta expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo y oxidación de ácidos grasos. Este hecho también ocurre en el hígado de animales *parp-2*^{-/-} y está relacionado con un incremento en la expresión de la desacetilasa SIRT1.

Comparando con las deficiencias que presentan animales y líneas *parp-1*^{-/-}, podemos establecer que las funciones de ambas PARPs son complementarias y no estarían totalmente solapadas.

4.3. PARP-3 (ARTD3): Es el miembro de menor tamaño de la subfamilia de PARPs dependientes de ADN. PARP-3 humana está compuesta de aproximadamente 540 aminoácidos (tamaño molecular de 67 kDa) de los cuales 489 conforman la región catalítica del enzima y presenta hasta un 61% de homología con el dominio catalítico de PARP-1 humana (**Figura INT.5**). La región N-Terminal es especialmente corta y le otorga una localización subcelular a nivel del centrosoma. Un gran diferencia con respecto a PARP-1 y PARP-2 radica en que

solo mantiene función como Mono (ADP-ribosa) polimerasa, presentando un pequeño motivo que actuaría como diana putativa de automodificación; estudios recientes le atribuyen también capacidad Poli (ADP-ribosa) Polimerasa (Augustin, Spenlehauer et al. 2003). La presencia y afinidad de PARP-3 por el centrosoma no se ve afectada por la existencia o no de daño al ADN (Augustin, Spenlehauer et al. 2003). Debido a su localización y a la importancia que juega el centrosoma en el ciclo celular, se ha descrito que PARP-3 actúa en la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. A este nivel cabe destacar que PARP-3 influye negativamente en la progresión de las fases G1/S del ciclo sin interferir con la duplicación del centrosoma; de este modo se consideró a PARP-3 como uno de los primeros marcadores localizados en los centriolos hijos (Augustin, Spenlehauer et al. 2003). Kanai y colaboradores establecieron en el año 2000 que había interacción entre PARP-1 y PARP-3 en células humanas, de modo que PARP-1 se localizaba en ambos centriolos e interactuaba con PARP-3, evitando fenómenos de inestabilidad genómica derivados de daños al ADN de doble cadena (Rouleau, McDonald et al. 2007). De este hecho surgió la teoría de que ambas PARPs eran el último punto de control o *checkpoint* del ciclo celular que actuaría como nexo entre la fidelidad del proceso de mitosis y la red de vigilancia y reparación de daños al ADN. La relación que existe entre PARP-1 y PARP-3 con los sistemas de reparación de ADN de unión de extremos homólogos, NHEJ, puede verse como material anexo de esta tesis (**Figura INT.6**) (Kanai, Uchida et al. 2000, Augustin, Spenlehauer et al. 2003). Estudios recientes han demostrado que PARP-3 estabiliza el eje mitótico regulando, por PARilación directa, al componente mitótico NuMA y contribuyendo a mantener la integridad de los telómeros a través de la interacción con la proteína Tanquirasa 1 (Boehler and Dantzer 2011, Boehler, Gauthier et al. 2011).

4.4. Tanquirasas 1 y 2 (ARTD5 y ARTD6): Ambas son proteínas de alto peso molecular que presentan un alto grado de homología entre ellas (superior al 85%) y solo difieren en sus motivos HPS (**Figura INT.5**). Ambas pueden modular su actividad por auto-ADP-ribosilación. Se describieron como componentes de los complejos teloméricos humanos; por lo tanto junto con las proteínas Telomerasas, contribuyen al mantenimiento y estabilidad de los cromosomas (Smith, Gariat et al. 1998, Cook, Dynek et al. 2002, Sbodio, Lodish et al. 2002). También se ha descrito

su localización en los poros nucleares y en vesículas del aparato de Golgi. ARTD5 y ARTD6 son activas ADP-ribosa Transferasas con funciones que se solapan:

4.4.1. Mantenimiento de la homeostasis del telómero: a través de la unión de su dominio ANK (*Ankyrin Domain*) con la proteína telomérica TRF1 (*Telomere Repeat Binding Factor-1*). La ADP-ribosilación de TRF1 por Tanquirasas inhibe su capacidad de mantenerse unido al ADN telomérico, liberándolo y permitiendo la apertura del complejo telomérico y el acceso de la Telomerasa (Smith and de Lange 2000, Chang, Coughlin et al. 2005).

4.4.2. Intervención en el tráfico de membranas: Tanquirasa 1 y 2 están localizadas en vesículas que tienen su origen en las proximidades del Aparato de Golgi. Sobre estas vesículas son capaces de ADP-Ribosilar distintas proteínas como son Glut4 o IRAP, con lo cual son capaces de modular el transporte de glucosa en la célula (Chi and Lodish 2000, Chang, Coughlin et al. 2005).

4.4.3. Regulación de procesos de muerte celular: Tanquirasa 2 en ocasiones puede presentar mayor actividad PARP que Tanquirasa 1, este hecho ha permitido establecer ciertos procesos de muerte celular necrótica mediados por un sobreexpresión de ARTD6 y de la incrementada Poli ADP-ribosilación que acarrea. Su función en procesos de muerte celular está fundamentada sobre dos pilares: en que la regulación de ambas proteínas en situaciones de estrés varía considerablemente, llegando a ser opuesta en cuanto a moduladores de ambas y en que únicamente Tanquirasa 2 es capaz de Poli ADP-Ribosilar a sustratos relacionados con procesos de muerte celular (Kaminker, Kim et al. 2001).

4.5. VPARP (PARP-4, ARTD4): VPARP o *Vault*-PARP es el miembro de mayor tamaño de la familia, con un peso molecular aproximado de 193 kDa. Se compone de una región central de aproximadamente 350 Aminoácidos la cual presenta un 72% de homología con el dominio catalítico de PARP-1 y fue definida como un componente del complejo *Vault* (Bóveda), que es una gran ribonucleoproteína citosólica que está ampliamente expresada en multitud de organismo eucariotas (Kickhoefer, Siva et al. 1999, Burkle 2005). Presenta actividad Poli ADP-ribosa Polimerasa, conteniendo un dominio BRCT, la región catalítica de PARP, una región tipo IHRP (*Inter- α -Trypsin Inhibitor Protein*) y finalmente un dominio de interacción MVP que le permite realizar su función como ribonucleoproteína (**Figura INT.5**). Su dominio BRCT localizado en su extremo N

terminal, le permite la interacción proteína-proteína relacionadas con puntos de control del ciclo celular en respuesta a daños al ADN (Wu, Wang et al. 1996, Bork, Hofmann et al. 1997). A pesar de que los complejos *Vault* se describieron como citosólicos, una pequeña porción de estas riboproteínas fue descrita en núcleos aislados, concretamente en la cara citoplasmática de los poros nucleares (Chugani, Rome et al. 1993). Como componente del complejo *Vault*, VPARP es capaz de ADP-Ribosilar al componente proteico de la ribonucleoproteína. Actualmente las funciones biológicas de VPARP son desconocidas, si bien está descrito que en presencia de daños al ADN es capaz de Poli ADP-Ribosilar a p53 aunque no es una proteína PARP dependiente de daños al ADN, por lo que la señal que la activa no es el daño en sí, sino alguna señal que se desencadena ante la aparición del mismo en el material genético. Su relación con el correcto desarrollo de la mitosis viene dado por el alto número de modificaciones post-traduccionales que VPARP es capaz de sufrir por fosforilación, automodificación por unión de pequeñas moléculas ramificadas de ADP-ribosa o incluso por interacción con distintas proteínas que realizan cualquiera de los *Check Points* de la mitosis (Kickhoefer, Siva et al. 1999, Scheffer, Schroeijers et al. 2000, Liu, Snow et al. 2004).

4.6. Otras PARPs: Son muchos los estudios que han aparecido atribuyendo nuevas funciones a los miembros restantes de la familia PARP. En este apartado resaltaré algunos de los más novedosos, aunque sus características estructurales más destacadas así como su localización están recogidas en la tabla anexa a esta tesis (**Tabla Anexa 1**). Cabe destacar **PARP-10 o ARTD10** que es una proteína de alto peso molecular con localización tanto nuclear como citosólica y que presenta actividad Mono ADP-Ribosa Polimerasa y Mono ADP-Ribosa Transferasa. Cuando se localiza en el núcleo, ARTD10 es capaz de interaccionar y modificar por ADP-Ribosilación a la oncoproteína MYC (Burkle 2005); esta localización nuclear y por tanto su implicación en biología tumoral viene marcada por su secuencia de exporte nuclear dependiente de Crm1 y por un dominio central de ARTD10 que promueve que se mantenga en el núcleo. La población nuclear y citosólica de ARTD10 es susceptible de Poli Ubiquitinización y colocaliza en parte con la proteína p62/SQSTM1 que podría marcar su degradación y actuaría como punto de control de la misma. La conclusión es que ARTD10 es una proteína muy dinámica en cuanto a su translocación núcleo/citosol a través de p62; el hecho de

que p62 sea una proteína que regula en parte la “carga proteica” susceptible de ser degradada en autofagosomas, hace pensar que ARTD10 podría estar implicada en la ruta de autofagia (Kleine, Herrmann et al. 2012). Recientes estudios han demostrado que **ARTD8 o PARP-8** presenta macrodominios que son capaces de reconocer sustratos Mono ADP-Ribosilados por ARTD10 e incluso a la propia ARTD10 automodificada. Estos dominios denominados *macroH2A1.1 domains* no son capaces de reconocer a PARP-1 cuando se encuentra Auto Mono ADP-Ribosilada. Uno de los sustratos Ribosilados de ARTD10 que reconocen las proteínas ARTD8 son las proteínas Ran pertenecientes a una familia de pequeñas GTPasas susceptibles de Mono ADP-Ribosilación por ARTD10, que suelen ser dianas de multitud de toxinas bacterianas (Di Girolamo, Dani et al. 2005). Finalmente dentro del grupo de las macro-PARPs vamos a destacar a **BAL3 (PARP-15, ARTD7)** que es una proteína de alto peso molecular localizada en gránulos de estrés en el citosol y que presenta actividad Mono ADP-ribosil Polimerasa y Transferasa. Al igual que otras Mono-ARTDs, ARTD7 tiene la capacidad de modificar la actividad de sustratos relacionados con respuesta inmune, proliferación celular, regulación transcripcional y muerte celular (Welsby, Hutin et al. 2012). El caso de esta macro-PARP es de gran importancia ya que su sobreexpresión se asocia con la resistencia de linfomas de células B a quimioterapia (Aguiar, Takeyama et al. 2005) por lo que muchos grupos se están centrando en la obtención de inhibidores específicos de la función Mono ADP-ribosa Polimerasa de ARTD7 y otras como ARTD10 (Venkannagari, Fallarero et al. 2013). El fundamento de esta inhibición es distinto al concepto de letalidad sintética que se aplica a la inhibición de PARPs dependientes del daño al ADN como ARTD1 y ARTD2 (Jagtap and Szabo 2005, Lord and Ashworth 2008).

5. Funciones de PARP-1

Son muchas las funciones que se le atribuyen a PARP-1; sin embargo la más destacada, aquella por la que describió y que más resalta su función como ADP-Ribosa Polimerasa, es la de reconocer y señalar daños al ADN para que sean reparados por los sistemas BER y SSBR. Sin embargo en los últimos años se han identificado nuevas funciones como por ejemplo intervenir en transcripción, rutas de supervivencia y muerte celular, mantenimiento de la estructura de la cromatina, papel activo en procesos patofisiológicos como son enfermedades

neudegenerativas, procesos inflamatorios o cáncer, etcétera. En este apartado haré un profundo estudio de las principales funciones atribuibles a PARP-1 y a la Poli ADP-Ribosilación:

5.1. Reparación del ADN y Mantenimiento de la Integridad Genómica:

PARP-1 es un enzima nuclear capaz de reconocer daños de cadena simple y doble, que se producen en la doble hebra de ADN, señalizando el camino a la maquinaria de reparación enzimática nuclear. Cuando se produce un daño al ADN por ejemplo por acción de agentes genotóxicos o alquilantes, radiaciones de tipo X o γ (Fuentes Exógenas), presencia de Especies Reactivas de Oxígeno o Peroxinitritos, o incluso por fallos en la replicación génica (Fuentes Endógenas), PARP-1 es capaz de reconocer la zona donde se ha producido el daño o ruptura de la hebra de ADN, uniéndose a la misma para iniciar la reparación. La afinidad de PARP-1 por el ADN dañado es alta y el reconocimiento de la zona dañada, por ejemplo cuando existen daños de doble cadena, lo realiza a través de los Dedos de Zinc I y III de su Dominio de Unión al ADN o DBD y de la región WGR de su Dominio de Unión al NAD⁺ o Dominio Catalítico. Ambas estructuras son esenciales para el reconocimiento y posterior reparación y son totalmente dependientes de daños al ADN (Langelier, Planck et al. 2012, Karlberg, Langelier et al. 2013, Langelier and Pascal 2013). La unión ADN-Dedos de Zinc estimulará la ADP-Ribosilación del dominio WGR, lo que tendrá un doble efecto sobre PARP-1, por una parte potencia momentáneamente la actividad Poli ADP-Ribosa Polimerasa de PARP-1 sobre proteínas de unión al ADN, y por otra parte cuando se hayan reclutado las proteínas encargadas de reparar, hará que pierda su afinidad por el ADN y se separe de la hebra debido a la transferencia de carga eléctrica que ejercen los grupos fosfatos presentes en el polímero PAR que la está modificando, lo que le confiere una carga neta negativa que ejerce fuerzas de repulsión electrostática entre la proteína y el ADN. A Dicho proceso se le denominó Teoría de Automodificación de PARP-1 y a ella se le atribuye un papel regulador a la proteína Poli ADP-Ribosa Glicohidrolasa (PARG) sobre la actividad de PARP-1 (**Figura INT.7**) (Kawaichi, Ueda et al. 1981). El hecho de que PARG sea capaz de eliminar la modificación por auto-PARilación de PARP-1, hace que PARP-1 se vuelva inactiva y adquiera una conformación adecuada que la vuelve susceptible de activarse cuando ocurran nuevos eventos de daños al ADN. Actualmente se mantiene la tesis de que tanto la actividad Poli ADP-Ribosa

Polimerasa como la Poli ADP-Ribosa Glicohidrolasa son cruciales para el mantenimiento de la homeostasis nuclear.

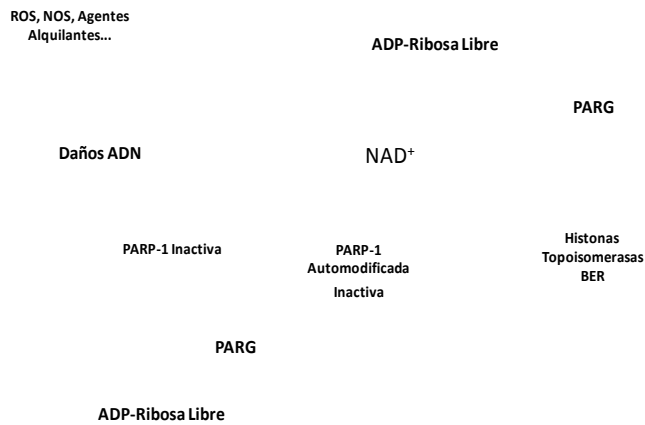


Figura INT.7. Teoría de la Automodificación de PARP-1. PARG permite que PARP-1 quede de nuevo inactiva y no modificada, haciéndola susceptible a un nuevo ciclo de daño (Kawaichi, Ueda et al. 1981).

La interacción de cada dominio con el ADN se ha determinado por cristalización y difracción de rayos X (Wacker, Ruhl et al. 2007, Altmeyer, Messner et al. 2009, Langelier, Planck et al. 2011).

En el momento en que PARP-1 automodificada está en la zona dañada, va a iniciar un proceso de Poli ADP-Ribosilación de distintas proteínas que conforman la estructura compacta de la cromatina, como son Histonas o Topoisomerasas I y II, con las cuales interacciona a través de su Cremallera de Leucina, permitiendo que se liberen de la cromatina y volviendo la zona más accesible a la maquinaria de reparación (**Figura INT.8**). En este momento la Poli ADP-Ribosilación tendrá dos funciones, por una parte actuaría como señal atrayente a la zona dañada de las proteínas de reparación por escisión de bases (BER) y por otro a través de la interacción proteína-proteína, PARP-1 va a Poli ADP-Ribosilar a los distintos componentes BER/SSBR, aumentando su afinidad por la zona dañada y favoreciendo que el ADN sea reparado. Un claro ejemplo de esta interacción lo encontramos en la proteína XRCC1, proteína central del sistema BER/SSBR, que interacciona principalmente con PARP-1, siendo el polímero PAR indispensable para el reclutamiento de XRCC1 al ADN dañado (Masson, Niedergang et al. 1998, Caldecott 2003, Okano, Lan et al. 2003, Plo, Liao et al. 2003). En los últimos años se ha visto como también existe interacción de PARP-1 y proteínas del sistema de reparación por Recombinación Homóloga (HR) como son MRE11 y ATM (Aguilar-Quesada, Munoz-Gamez et al. 2007, Haince, McDonald et al. 2008) y del sistema de

reparación por Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ) como son Ku70, Ku80 y ADN-PK_{cs} (Pleschke, Kleczkowska et al. 2000).

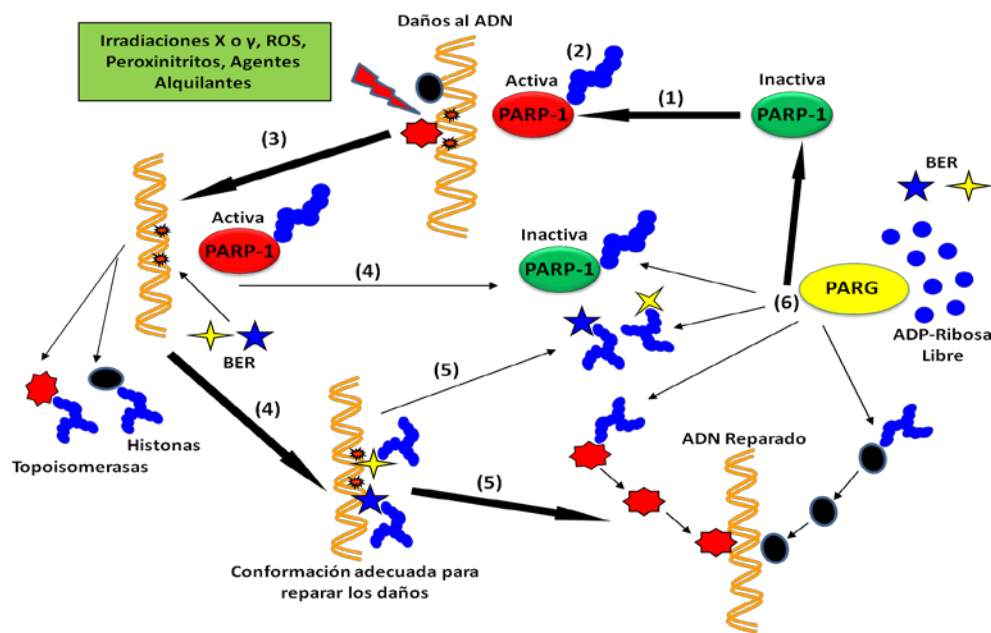


Figura INT.8. Señalización de Daños al ADN por Poli (ADP-Ribosilación): Durante eventos de daño al ADN, PARP-1 es capaz de reconocer la zona dañada, uniéndose a la misma (1). En este momento mediante un proceso de Auto-PARilación se modifica a ella misma (2) y Poli ADP-Ribosila a proteínas que forman parte de la estructura de la cromatina como son Histonas o Topoisomerasas (3). Éstas son liberadas y se reclutan proteínas del sistema BER que también se PARilan por PARP-1; entonces ésta queda liberada y el material genético se reparará (4). El ciclo se completa cuando PARP-1 auto-PARilada no afin al ADN y los miembros BER PARilados se liberen de esta modificación a través de PARG y ARH3, quedando PARP-1 y proteínas BER preparadas para un nuevo ciclo y la cromatina adquirirá de nuevo su conformación inicial (5 y 6) (Masson, Niedergang et al. 1998, Caldecott 2003, Okano, Lan et al. 2003, Plo, Liao et al. 2003, Virag 2005).

Cuando PARP-1 modifica covalentemente a las proteínas de reparación y debido al grado de Auto-PARilación que ha sufrido, PARP-1 pierde afinidad por el ADN y se separa del mismo, adquiriéndose una configuración estructural adecuada para una mayor rapidez y efectividad del sistema BER/SSBR (**Figura INT.8**). Si el daño ha sido reparado satisfactoriamente, las proteínas BER/SSBR se separarán permitiendo que las ADN Ligasas ejerzan su acción y entonces entrarán en juego las proteínas PARG, ARH3 y ADP-Ribosil Liasa. Estos enzimas van a eliminar cualquier señal de ADP-Ribosilación que mantengan todos los intermediarios de la ruta de reparación. Así pues Topoisomerasas e Histonas quedan liberadas de su modificación por ADP-Ribosa, permitiéndoles regresar a la cromatina, mientras que las Proteínas BER y la propia PARP-1 completarán el ciclo quedando en una

conformación dependiente de daño al ADN (de Murcia, Schreiber et al. 1994, Lindahl, Satoh et al. 1995, Burkle 2001, Virag 2005) (**Figura INT.8**).

El hecho de que no se produzca una reparación satisfactoria del ADN puede acarrear muerte celular, pero también inestabilidad genómica predisponiendo a la transformación celular y al cáncer.(Hakem 2008). Por lo tanto PARP-1, como factor de reparación del ADN, está estrechamente ligado al proceso de Carcinogénesis.

5.2.Modificación de la estructura de la cromatina: PARP-1 modifica directamente la estructura y organización de la cromatina al PARilar Histonas y Topoisomerasas asociadas a la cromatina, provocando una repulsión electrostática entre el ADN y dichas proteínas por la carga neta negativa que le proporciona el polímero PAR. De esta manera favorece la disociación de los nucleosomas y la descondensación de la cromatina. Esta distensión cromatínica permitirá la entrada de las proteínas de reparación en el caso de que la fuente de activación de PARP-1 sean daños al ADN (D'Amours, Desnoyers et al. 1999,Oei and Shi 2001, Kraus and Lis 2003). Se ha sugerido que el propio hecho de encontrar PARP-1 automodificada por PAR en ciertas zonas del ADN dañado, favorece la creación de un ambiente idóneo para estabilizar las histonas liberadas de los nucleosomas desestabilizados (Realini and Althaus 1992). Está descrito en *D. melanogaster* que PARP-1 puede encontrarse en regiones de cromatina transcripcionalmente reprimidas y distintas de las zonas de heterocromatina ricas en Histonas H1. Se ha descrito que en respuesta a ciertos estímulos externos, ambientales o propios del desarrollo, PARP-1 podría activarse, modificar a Histonas que se separarían de la cromatina, volviéndola más accesible a la maquinaria transcripcional (Tulin and Spradling 2003).

5.3.Control de la Maquinaria Transcripcional: La regulación de la expresión génica requiere de un amplio conjunto de proteínas que presentan funciones para regular la estructura de la cromatina (actuando como amplificadores, potenciadores o *enhancers*) o actuar como co-reguladores transcripcionales. Teniendo en cuenta que PARP-1 y el proceso de la Poli (ADP-Ribosilación) son moduladores directos de la estructura de la cromatina, poseen influencia en la regulación de la expresión génica (Tulin, Chinenov et al. 2003, Tulin and Spradling 2003). PARP-1 es capaz de modular la cromatina favoreciendo

la transcripción a través de la interacción y PARilación de histonas, concretamente se conoce que PARP-1 puede excluir a la histona H1 de los promotores de ciertos genes dependientes de PARP-1, bien compitiendo por la unión a los nucleosomas o bien por Poli (ADP-Ribosilación) directa la de la histona H1 (Huletsky, de Murcia et al. 1989, Kim, Mauro et al. 2004) (**Figura INT.9**).

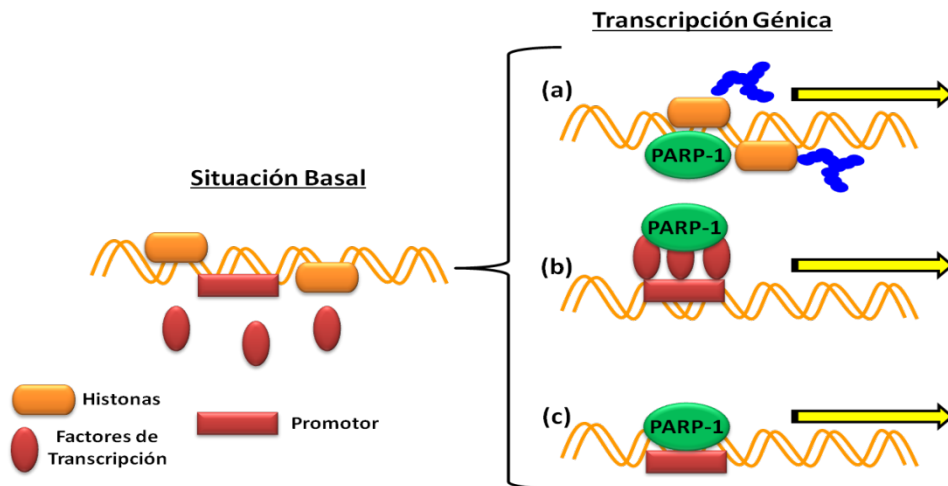


Figura INT.9. PARP-1 y Transcripción: Actualmente se conoce que PARP-1 puede regular la expresión génica de tres formas no excluyentes entre sí. **(a)** Alteración de la estructura de la cromatina a través de la modificación de histonas. **(b)** Actuando como coactivador o correpresor a través de la interacción con los factores de transcripción. **(c)** Uniéndose a secuencias reguladoras o promotoras de distintos genes (Kraus and Lis 2003).

PARP-1 también puede actuar directamente sobre factores de transcripción modulando su actividad o sobre los distintos cofactores que forman parte de los complejos de unión a activadores/represores (Kraus and Lis 2003) (**Figura INT.9**). Para conocer cómo PARP-1 modula la expresión de diversos genes, no basta con analizar sus funciones en el mantenimiento de la integridad de la cromatina, sino que hay que ir más allá, realizando un profundo análisis de la genómica de PARP-1, conociendo cómo PARP-1 es capaz de interactuar con multitud de complejos proteicos nucleares, muchos de los cuales incluyen a factores de transcripción (Droit, Hunter et al. 2007).

Recientes estudios han demostrado asociaciones funcionales de PARP-1 con una amplia variedad de factores de transcripción como son AP-1, AP-2, NF- κ B, B-Myb, STATs, TEF-1, SP1, HIF-1 α , HIF2 α , Snail1, ~~étera~~ (Rodríguez, Gonzalez-Flores et al., Whitacre, Hashimoto et al. 1995, Oei, Griesenbeck et al. 1997, Oei, Griesenbeck et al. 1997, Le Page, Sanceau et al. 1998, Oliver, Menissier-de Murcia

et al. 1999, Martin-Oliva, Aguilar-Quesada et al. 2006, Zaniolo, Desnoyers et al. 2007, Gonzalez-Flores, Jiménez et al. 2012); muchas de estas interacciones implican la existencia de complejos de proteínas en los que interviene PARP-1 y no necesariamente que se dé el proceso de Poli (ADP-Ribosilación). Esto se debe a que PARP-1 facilitaría las interacciones cooperativas entre activadores específicos de secuencia y diferentes complejos coactivadores; por lo tanto la presencia de PARP-1 crearía el ambiente idóneo y ejercería un efecto “armazón” para que se establezca el complejo de inicio de la transcripción (Hassa and Hottiger 2002)(**Figura INT.9**). Un ejemplo en el que sí hay dependencia de Poli (ADP-Ribosilación) lo encontramos en la interacción de PARP-1 con los complejos *Smad*; en este caso PARP-1 se une y PARila a Smad4 y Smad5, haciendo que se separen del ADN, se defosforilen y sean exportados del núcleo hacia el citoplasma; una vez allí se someten a Poli Ubiquitinización y degradación en el proteasoma. La consecuencia es que la expresión del gen de TGF- β , modulado por Smad 4 y 5, queda reprimida; esto acarrea una inhibición del proceso de Diferenciación Epitelio Meséquima o *EMT* (Lonn, van der Heide et al. 2010).

Estudios recientes están demostrando que PARP-1 es capaz de regular su propia transcripción interaccionando con ciertas regiones próximas a su promotor, actuando de forma similar a como lo haría un cofactor transcripcional. Soldatenkov y colaboradores han demostrado que PARP-1 puede unirse a la horquilla y activar o bloquear su transcripción (Soldatenkov, Chasovskikh et al. 2002). También se conoce que PARP-1 modula la expresión de los genes CXCL1 y BCL6, mediante el proceso de unión a secuencias reguladoras próximas a dichos genes dependientes de PARP-1. Concretamente en el caso de CXCL1, PARP-1 es capaz de unirse a la secuencia inmediatamente anterior al promotor y en el caso de BCL6, de unirse al primer intrón génico, con lo cual favorece que se reprima la expresión de ambos genes (Amiri, Ha et al. 2006, Ambrose, Papadopoulou et al. 2007).

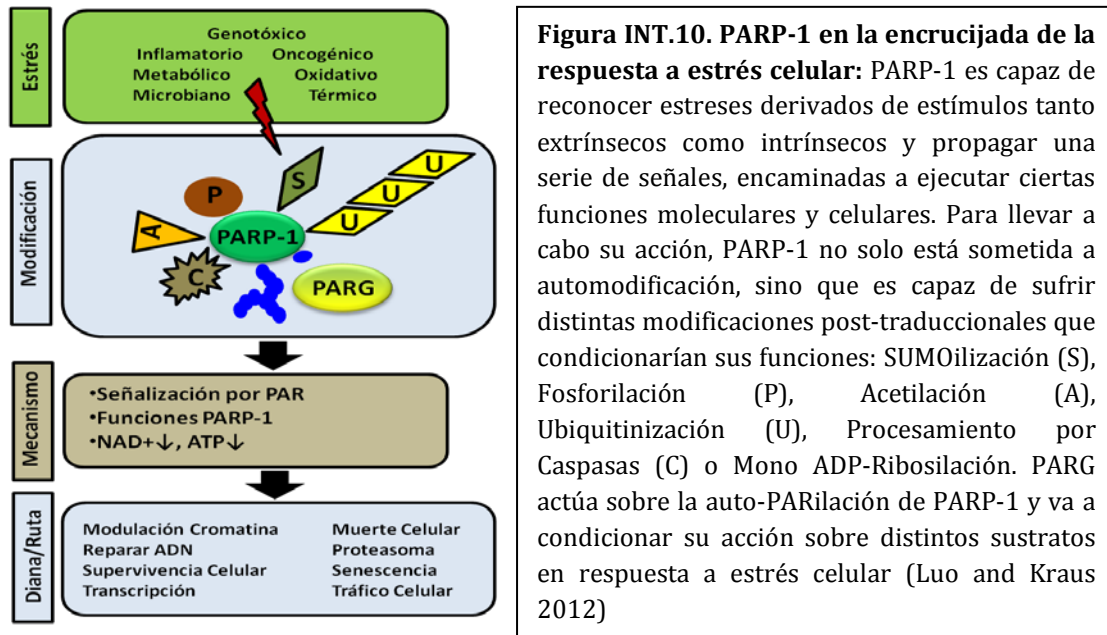
5.4. Replicación del ADN: En los últimos años, numerosos trabajos han puesto de manifiesto que PARP-1 interacciona con un complejo multiproteico que está compuesto por muchas de las proteínas implicadas en replicación del ADN. Desde finales de la década de los setenta se conoce que durante la replicación, el proceso de Poli (ADP-Ribosilación) se encuentra acelerado (Tanuma, Enomoto et

al. 1978, Kanai, Tanuma et al. 1981, Lamarre, Talbot et al. 1988, Leduc, Lawrence et al. 1988). Se ha propuesto que PARP-1 interviene en el mecanismo de supervivencia que controla la progresión de la horquilla de replicación en presencia de daños al ADN (Dantzer, Nasheuer et al. 1998). En este sentido se sabe que PARP-1 puede interactuar con las ADN polimerasas α y β ; ADN primasa, ADN Helicasa, ADN Ligasa y las Topoisomerasas I y II (Simbulan-Rosenthal, Rosenthal et al. 1996, Dantzer, Nasheuer et al. 1998, Bauer, Chen et al. 2001), muchas de las cuales sufren modificaciones por Poli (ADP-Ribosilación).

5.5. PARP-1 y ciclo celular: PARP-1 está implicada en la regulación de los distintos puntos de control o *Check Points* del ciclo celular, una vez que se hayan producido daños al ADN y lo hace a través de p53. Después de irradiación inducción de los genes *p21* y *mdm2* dependientes de p53, se ve atenuada con el tratamiento de inhibidores de PARPs, produciéndose una supresión en la parada en G1 y un incremento en los niveles en fase G2/M. Además se comprobó cómo tras la inducción de daños de doble cadena al ADN (*DSB*) en células *parp-1*^{-/-} se inducía una alta fosforilación de p53 acompañado de una gran activación de ATM (Watanabe, Fukazawa et al. 2004, Masutani, Nakagama et al. 2005, Gunji, Uemura et al. 2006). El papel de PARP-1 en la regulación del ciclo celular aún está por profundizar a diferencia de lo que ocurre con otros miembros de la familia como PARP-3 o VPARP, de los cuales sí se conoce su implicación (ver apartados 4.3 y 4.5 de la introducción)

5.6. Papel en la respuesta a estrés celular: Las células están regularmente expuestas a una alta variedad de señales de estrés tanto intrínsecas como extrínsecas, incluyendo aquellas que parten de estrés oxidativo, nitrosativo, oncogénico, inflamatorio o incluso metabólico (Kryston, Georgiev et al. 2011) (**Figura INT.10**). La propagación de estas señales implica que en la célula se produzca una estrecha relación entre las distintas rutas de adaptación, supervivencia o muerte celular que desencadenan dichos estímulos. Así por ejemplo, el estrés oxidativo puede causar o amplificación del estrés genotóxico o estimular respuestas inflamatorias (Kryston, Georgiev et al. 2011). A su vez el estrés genotóxico es señal de inestabilidad genómica y consecuencia inmediata de esto, es la aparición de procesos carcinogénicos (Lonkar and Dedon 2011). Por otra parte el estrés de carácter metabólico puede derivar en respuesta inflamatoria

crónica, incremento en la producción de ROS en las mitocondrias y promover estrés en el Retículo Endoplasmático (Zhang and Kaufman 2008, Wellen and Thompson 2010).



Todas estas condiciones de carácter patológico hacen que sean muchas las rutas que confluyen en respuesta al estrés; en los últimos años se sabe que distintos miembros de la Familia PARP están relacionados con dicha respuesta, concretamente aquella relacionada con el estrés genotóxico derivado de un estímulo oxidativo o nitrosativo. La respuesta mediada por proteínas PARPs implicaría señalar la presencia de daños al ADN y la regulación de los procesos de transcripción. Sin embargo estudios recientes han implicado a miembros de la familia, concretamente a PARP-1 y PARP-2, en respuestas celulares ante estrés metabólico y por lo tanto se les atribuye un papel esencial en el mantenimiento no solo de la homeostasis nuclear, sino también en la homeostasis metabólica general de la célula (Wellen and Thompson 2010). Son muchas las modificaciones post-traduccionales que puede sufrir PARP-1 en función de cuál sea el estímulo que desencadena el estrés y la respuesta al mismo. Así se sabe que PARP-1 no solo es capaz de modular su actividad por Auto-PARilación en respuesta a daño en el ADN, sino que es capaz de sufrir modificaciones por fosforilación a través de las quinasas ERK1/2 (Alano, Kauppinen et al. 2006), acetilación a través de la Acetil-Transferasa p300/CBP (Hassa, Haenni et al. 2005), Ubiquitinización e incluso SUMOilización a través de la Ubiquitín Ligasa E3 RNF146/Iduna capaz de proteger

a las neuronas corticales de la muerte por PARTanatos (*PARthanatos*) inducida por fenómenos de exocitotoxicidad del Glutamato, que acarrearán activación de PARP-1, translocación de PAR del núcleo a la mitocondria y translocación de AIF (Andrabi, Kang et al. 2011). Por lo tanto PARP-1 es capaz de integrarse en distintas rutas de adaptación, supervivencia o muerte celular (**Figura INT.10**).

Está demostrado que ratones *parp-1*^{-/-} de cepa SV129, presentan unos efectos específicos metabólicos, exclusivos de cepa, como por ejemplo una importante tendencia a acumular tejido adiposo con la edad en dietas ricas en grasas; por lo que se le atribuyó un papel protector frente a la obesidad a PARP-1 (Devalaraja-Narashimha and Padanilam 2010). Por el contrario dietas normales no enriquecidas en grasas no inducen incremento del peso ni aparición de características asociadas con obesidad en ratones *parp-1*^{-/-} de tipo C57BL/6J; incluso la ausencia de PARP-1 les induce resistencia a la diabetes. En este sentido Bai y colaboradores han demostrado que la carencia de PARP-1 hace que se compense con la actividad de PARP-2 que hace que se regule el metabolismo mitocondrial, manteniendo un consumo adecuado de oxígeno y unos correctos niveles de β -oxidación de los ácidos grasos (Bai, Canto et al. 2011, Slade, Dunstan et al. 2011). En este modelo, la inhibición química de los miembros de la familia PARP, concretamente PARP-1 y PARP-2, hace que se incrementen los niveles de consumo de oxígeno, se aceleren los procesos de β -oxidación y todo ello potenciado por la proteína SIRT1, la cual al no tener activos sus dos principales competidores por el NAD⁺ alteraría el metabolismo mitocondrial (Bai, Canto et al. 2011). Las diferencias entre ambas cepas puede deberse a un defecto en la síntesis de NAD⁺ en la cepa C57BL/6J, aunque se están estudiando otras diferencias genéticas que explique por qué esa diferencia en la respuesta al estrés metabólico. Además, se ha visto que la actividad de PARP-1 es capaz de oscilar de forma circadiana a través de un mecanismo que implica la regulación por parte de PARP-1 y la Poli (ADP-Ribosilación) de algunos de los miembros de la maquinaria circadiana. Se conoce que PARP-1 es capaz de testar e integrar la señales de presencia de nutrientes que modulan la actividad de CLOCK, un factor de transcripción circadiano (Asher, Reinke et al. 2010).

5.7. PARP-1 y Muerte Celular: PARP-1 es uno de los primeros sustratos conocidos de caspasas, por lo tanto está tremendamente relacionado con el proceso de Muerte Celular Programada de tipo I o Apoptosis (Kaufmann, Desnoyers et al. 1993, Lazebnik, Kaufmann et al. 1994, Germain, Affar et al. 1999). Concretamente, las caspasas 3 y 7 son capaces de reconocer el motivo DEVD situado en la región de la Secuencia de Localización Nuclear de PARP-1 (**Figura INT.3**), produciendo su fragmentación en polipéptidos de aproximadamente 83 y 24 kDa. Este procesamiento de PARP-1 es utilizado como criterio de análisis bioquímico durante el proceso de inducción de apoptosis, pero no se le considera como un proceso ejecutor dentro de la ruta apoptótica (Virag and Szabo 2002, Ivana Scovassi and Diederich 2004). La ruptura del dominio de unión al ADN donde se localiza la secuencia DEVD, provoca que PARP-1 se separe del ADN, inactivando al enzima. Se sabe que la presencia de los fragmentos de 83 y 24 kDa contribuyen también a la retroinhibición del enzima no proteolizada o forma intacta, lo cual va a impedir que se produzca la homodimerización y la unión al ADN (Kim, Kim et al. 2000, D'Amours, Sallmann et al. 2001). Todo este proceso de retroinhibición va a facilitar un adecuado funcionamiento de la maquinaria apoptótica, preservando las fuentes de energía necesarias para la correcta activación y actuación de las caspasa efectoras. Dado que la proteólisis de PARP-1 por caspasas se identificó como uno de los primeros marcadores bioquímicos de la apoptosis, se han llevado a cabo una serie de estudios en los que se intentó identificar a PARP-1 como un agente activo en el desarrollo de la apoptosis. Así, se comprobó que la presencia de un mutante de PARP insensible a caspasas impedía el desmantelamiento nuclear durante la apoptosis (Oliver, de la Rubia et al. 1998) y favorecía la muerte celular por necrosis (Herceg and Wang 2001).

Recientes estudios relacionan a PARP-1 con procesos de muerte celular no apoptótica, tanto necrosis como autofagia. En este sentido se sabe que PARP-1 puede modular la entrada en necrosis, un proceso de muerte poco conocido a nivel molecular. En los últimos años se han publicado una serie de estudios en los que se demuestra que la necrosis puede tener un cierto grado de regulación y programación (Kaczmarek, Vandenabeele et al. 2013). Del mismo modo, rutas de adaptación y supervivencia, como es la Autofagia, pueden derivar en procesos de muerte celular programada, denominados Muerte Celular Autofágica o de Tipo II,

cuya inducción y desarrollo están tremendamente regulados por PARP-1 y el proceso de Poli (ADP-Ribosilación) (Munoz-Gamez, Rodriguez-Vargas et al. 2009) y van a ser estudio de esta tesis doctoral.

Uno de los factores más determinantes a la hora de desarrollar un proceso de muerte celular es el estatus energético que presenta la célula, que va a determinar la disponibilidad de energía necesaria tanto para los procesos de apoptosis como de autofagia o necrosis. Es conocido que una sobreactivación de PARP-1, por ejemplo cuando existen daños importantes en el ADN, produce un alto consumo de NAD⁺ y en consecuencia una caída en los niveles de ATP; esto conducirá a un colapso energético en la célula y a que se potencien los fenómenos de muerte celular por necrosis. En este sentido PARP-1 es considerada como un interruptor molecular entre apoptosis y necrosis, ya que tiene que procesarse para un correcto desarrollo de uno y sobreactivarse para inducir al otro (Los, Mozuluk et al. 2002, Virag and Szabo 2002). La necrosis en sí es un proceso de muerte celular que podríamos considerar sucio e incluso grosero tanto en el contexto celular como tisular, ya que provoca ruptura de la membrana plasmática y liberación de múltiples factores pro-inflamatorios. De este concepto surgió la Teoría del Ying Yang de PARP-1, que propone un papel dual de PARP-1 como molécula necesaria para la supervivencia celular pero que en un contexto de sobreactivación podría acarrear la muerte de la célula.

En este sentido la necrosis inducida por sobreactivación de PARP-1 es un proceso a evitar por la mayoría de las células, si les es posible; para evitarlo la célula puede desarrollar procesos “alternativos” encaminados a la adaptación y supervivencia o a retrasar al máximo fenómenos tan perniciosos para el organismo. Uno de los principales mecanismos alternativos que pone en marcha la célula cuando existe un colapso energético es la Autofagia (Klionsky and Emr 2000, Mizushima 2007, Mizushima and Klionsky 2007). Nuestro laboratorio ha descrito que durante el tratamiento con agentes antineoplásicos, se induce una Poli (ADP-Ribosilación) que causa una caída en los niveles energéticos celulares induciendo autofagia; esta autofagia se desencadena como mecanismo de respuesta y adaptación, ya que si se inhibe la autofagia, manteniendo activa a PARP-1, surgen fenómenos de necrosis (Munoz-Gamez, Rodriguez-Vargas et al.

2009). Partiendo de esta base, esta tesis doctoral se centrará en los mecanismos moleculares por los cuales PARP-1 y la PARilación regulan la inducción de autofagia.

En relación a la función de molécula señalizadora de daños al ADN de PARP-1 y considerando el estatus energético en el que la célula se encuentre durante la activación de PARP-1, podemos decir que la intensidad del estímulo que provoca los daños al ADN va a determinar el destino final de la célula en función de que el daño sea reparado, no reparado o que para su reparación necesite que la célula entre en colapso energético. Por lo tanto dependiendo del daño al ADN, PARP-1 puede intervenir en tres rutas diferentes (**Figura INT.11**).

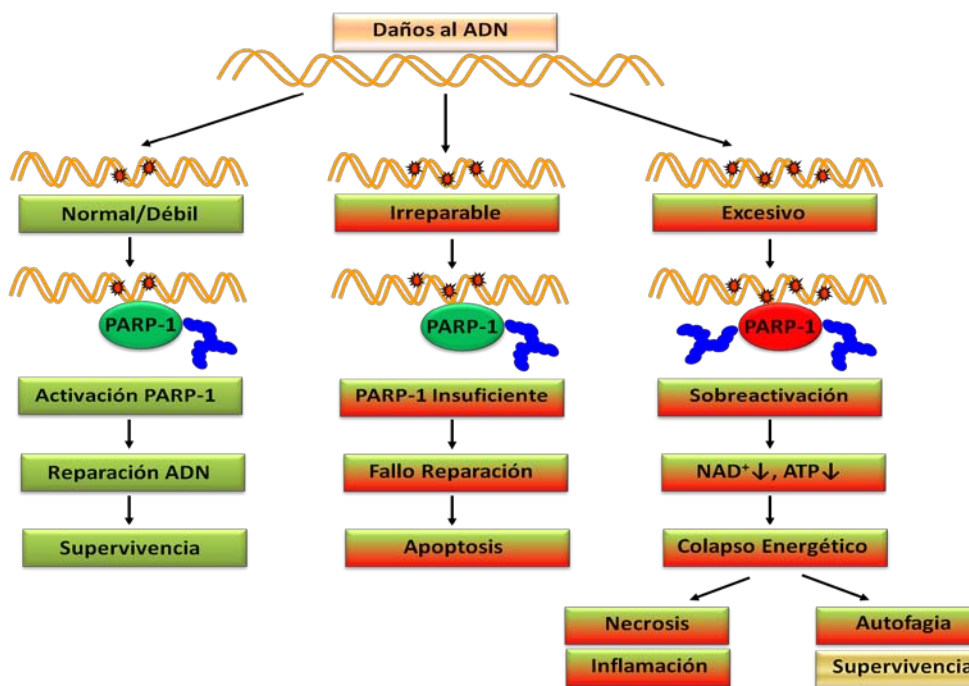


Figura INT.11. La intensidad del estímulo que induce daños al ADN y el grado de activación de PARP-1, determina el destino de una célula hacia su supervivencia o su muerte.

Destino 1: Cuando se produce un daño leve en el ADN, la activación de PARP-1 va encaminada a señalar dicho daño. Si se repara satisfactoriamente la célula sobrevivirá. **Destino 2:** Estímulos intensos y de naturaleza pro-apoptótica inducen daños al ADN que a pesar que activar a PARP-1, no son reparados. En este caso el daño conduce a una activación de la ruta apoptótica que tiene como diana a la propia enzima PARP-1 y la célula morirá. **Destino 3:** Daños excesivos, aunque no

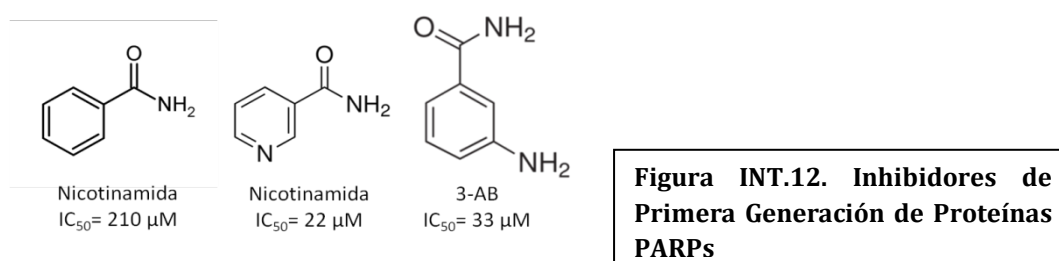
siempre letales, en el ADN producen un fenómeno de sobreactivación de PARP-1, que por su propia actividad Poli ADP-Ribosa Polimerasa consume tanto NAD⁺ y ATP que provoca un colapso energético en la célula y desarrollaría fenómenos de necrosis. Como alternativa a la muerte por necrosis, surgen fenómenos de autofagia para tratar de paliar el colapso energético y evitar la muerte celular (Jagtap and Szabo 2005, Rodriguez-Vargas, Ruiz-Magana et al. 2012).

En los últimos años se ha descrito un mecanismo de muerte celular dependiente de PARP-1, e independiente de caspasas, en el que juega un papel fundamental la liberación del Factor de Inducción de Apoptosis AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) desde la mitocondria y su traslocación al núcleo celular. Este proceso de muerte implica a la activación de PARP-1 de manera dinámica: fragmentos de PAR de pequeño tamaño son traslocados fuera del núcleo e inducen cambios en la permeabilidad de la doble membrana mitocondrial. La alteración en la superficie de la mitocondria desencadena que se libere el factor AIF y se trasloque al núcleo, donde induce condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. Este proceso de muerte celular mediado por Poli ADP-Ribosa se denomina Muerte por PARTanatos (*PARthanatos Cell Death*) (Yu, Wang et al. 2002, Andrabi, Kim et al. 2006, Yu, Andrabi et al. 2006). Como material anexo incluyo un esquema detallado de cómo se postula que se desarrolla el proceso de muerte por PARTanatos (**Figura Anexa 2**).

6. Inhibición de PARPs como terapia en distintas enfermedades

Durante los últimos años se han ideado una serie de estrategias encaminadas a mejorar el conocimiento sobre la biología de las proteínas PARPs, para así conocer mejor sus implicaciones en distintos desórdenes patológicos. Entre las más clásicas contamos con el desarrollo de animales deficientes en PARPs, destacando ratones *parp-1*^{-/-} y *parp-2*^{-/-}, la obtención de líneas celulares *knockout* para PARP-1 y PARP-2 o el desarrollo de una amplia batería de inhibidores químicos de su actividad enzimática. Con estas herramientas no solo se ha constatado la implicación de PARP-1 en distintas funciones celulares, sino también relacionarla con distintas patologías que tanto impacto tienen en nuestra sociedad como es el cáncer o las enfermedades cardiovasculares (Shall and de Murcia 2000, Virag and Szabo 2002, Virag 2005).

6.1.Desarrollo de Inhibidores de PARPs: Desde que se descubrió la actividad PARP y los principales enzimas encargadas de llevarla a cabo en 1963 (Chambon, Weill et al. 1963) se ha desarrollado toda una industria de síntesis química de moléculas que pudieran inhibir dicha actividad para comprender mejor su biología. La gran mayoría de los compuestos con capacidad de inhibir la actividad de las PARPs, se basan en una unión específica al centro catalítico de las proteínas, ejerciendo una inhibición competitiva mediante la ocupación transitoria del dominio de unión al NAD⁺. Los primeros inhibidores desarrollados entre los años 70 y 80, denominados de forma general **Primera Generación o Inhibidores Clásicos**, fueron en su mayoría compuestos con estructuras moleculares similares al NAD⁺ que actuarían como análogos sobre el centro activo de las distintas PARPs. Dentro de esta primera generación destacamos la presencia de Nicotinamidas (IC₅₀= 210μM), originadas por el propio catabolismo de PARP-1 sobre el NAD⁺ y que actuaban como inhibidores endógenos de la Poli (ADP-Ribosilación), produciendo una regulación negativa por retro-alimentación (Chambon, Weill et al. 1963, Purnell and Whish 1980). También dentro de este grupo tenemos a la Benzamida (IC₅₀= 22μM) o a una variación molecular por sustitución de la misma, 3-Aminobenzamida o 3-AB (IC₅₀= 33μM). La 3-AB ha sido uno de los inhibidores más utilizados y es mucho más potente que las Nicotinamidas (**Figura INT.12**).



A pesar de que esta generación de inhibidores eran muy eficaces sensibilizando a la radio y quimioterapia (con agentes alquilantes) a células tumorales, como resultado de una importante deficiencia en los sistemas de reparación del ADN, existen varios inconvenientes en el uso tanto de las Nicotinamidas como de la 3-AB; basados en la generalidad de los mismos que las hacen ser muy poco específicos sobre las PARPs y en los efectos secundarios sobre viabilidad celular, metabolismo de la glucosa, síntesis del ADN. En el caso concreto de la 3-AB, si se quiere aplicar en terapia combinada con quimio o radioterapia,

necesita ser usado en concentraciones del orden miliMolar (mM), volviéndose altamente tóxica (Milam and Cleaver 1984, Virag and Szabo 2002, Virag 2005).

El interés en desarrollar nuevos compuestos químicos más específicos en cuanto a la inhibición de la PARilación y con menos efectos secundarios no deseados, llevó a obtener una **Segunda Generación de Inhibidores**. Su obtención fue posible gracias al mejor conocimiento de la estructura de PARP-1 y de cómo se desarrollaba la interacción de la proteína con el ADN. Esta nueva batería de inhibidores se desarrolló a lo largo de la década de los 90, destacando que la mayor contribución en el área la realizó el grupo del doctor M. Banasik (Banasik, Komura et al. 1992), que contribuyó con más de 170 fármacos como potenciales drogas inhibitorias de PARP-1. Su grupo permitió el desarrollo de los siguientes inhibidores: 1,5-dihidroxi-isoquinolona; 2-metilquinazolin-4-[3H]-ona; 4-amino-1,8-naftalimida (ANI) y 2-nitro-6-[5H]-fenanthridinona (**Figura INT.13**).

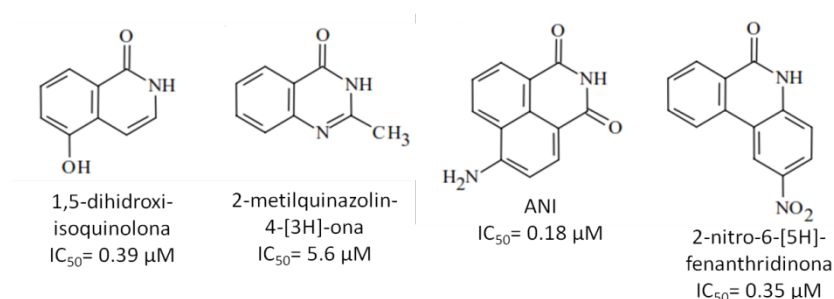


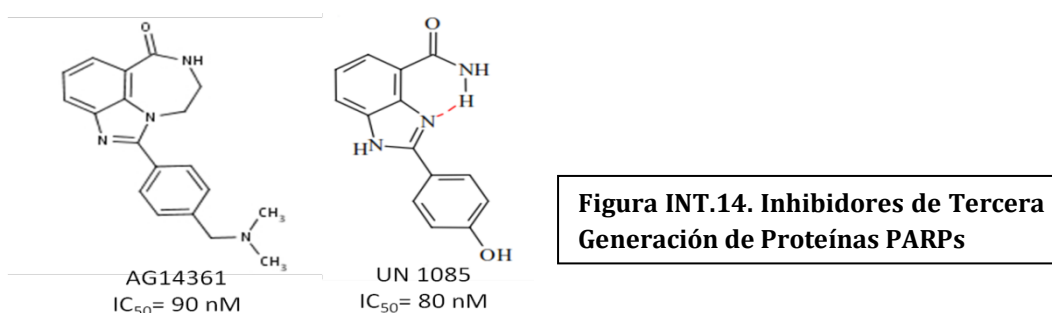
Figura INT.13. Inhibidores de Segunda Generación de Proteínas PARPs

Todos estos compuestos son altamente específicos y muy potentes inhibidores de la PARilación (IC₅₀ < 1 μM). A partir de los estudios del laboratorio de Banasik se permitió conocer con exactitud los requisitos moleculares mínimos, que precisaría una molécula de nueva síntesis para poder actuar como inhibidor eficiente de PARPs.

Los trabajos realizados con esta segunda generación de moléculas, a concentraciones del orden microMolar (μM, concretamente 50-100 μM) muestran importantes efectos potenciadores en la sensibilización de distintas líneas tumorales al tratamiento con distintos agentes antineoplásicos y radioterapia; muy superiores a los conseguidos con las Benzamidas que requerían concentraciones en uso de 1 a 5 mM. Otro hecho importante es que esta nueva batería de

inhibidores pudo ser empleada en tratamientos combinados con compuestos que inducían daños al ADN como el Cis-Platino; además no potenciaban efectos citotóxicos no deseados durante el empleo de dichos compuestos no dependientes de daños al ADN.

La resolución de la estructura cristalina del dominio catalítico de PARP-1, permitió perfeccionar aún más la síntesis de compuestos inhibitorios (Ruf, Mennissier de Murcia et al. 1996) . Mediante cristalización de diversos inhibidores como la 4-amino-1,8-naftalimida o NU1025 en el sitio de unión al NAD⁺ del dominio catalítico de PARP-1, se reveló la importancia de los enlaces de hidrógeno entre el grupo amida de los inhibidores y la Ser904 y la Gly863 de la proteína. Estos enlaces son los más fuertes y por tanto aumentan la potencia y selectividad del inhibidor, por la presencia del grupo amida del inhibidor anclado con una conformación fija a través de su inserción en un anillo aromático (Ruf, Mennissier de Murcia et al. 1996, Peralta-Leal, Rodriguez-Vargas et al. 2009) . Con el avance en cristalografía y biología estructural se consigue obtener una **Tercera Generación de Inhibidores** destacando los compuestos tricíclicos derivados de lactanoindoles y los Benzamidazoles (Canan Koch, Thoresen et al. 2002, Calabrese, Almassy et al. 2004) , destacando a moléculas como AG14361. Todos estos compuestos son extremadamente específicos, selectivos y potentes, mostrando IC₅₀ del rango de nanoMolar (**Figura INT.14**).



Actualmente existe una nueva batería de inhibidores, desarrollados en los últimos 10 años, que presentan unas características idóneas para alcanzar la fase II en tratamientos antitumorales con pacientes. Destacamos el PJ34 (*[N-(6-Oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide]*) con IC₅₀=20 nM, Olaparib con IC₅₀=5 nM y KUDOS con IC₅₀=3,2 nM. Para el desarrollo se esta tesis se han empleado muchos de estos inhibidores químicos de PARPs de última generación

que presentan alta selectividad por PARP-1 y con IC_{50} del orden de nM; todos ellos están recogidos en el apartado de material y métodos. Además todos se están empleando en distintas fases clínicas.

6.2. PARP-1 y Carcinogénesis: Empleo de los Inhibidores de PARPs

Como ya hemos comentado la correcta funcionalidad de PARP-1 es necesaria para que se reparen satisfactoriamente los daños que ocurren en el ADN. Es conocido que la respuesta a daños al ADN tiene importantes consecuencias tanto para el mantenimiento de la estabilidad genómica como para el proceso de malignización de una célula, por lo tanto para el desarrollo de un tumor. Es conocido que la naturaleza e intensidad con que se vea afectado el ADN, va a determinar la contribución que PARP-1 tenga sobre el desarrollo de un proceso tumoral. Analizando cómo las células reparan los daños al material genético, se pueden diseñar diversas estrategias encaminadas a atacar estas rutas de adaptación y supervivencia (**Figura INT.15**) (Bernstein, Bernstein et al. 2002, Kim, Zhang et al. 2005).

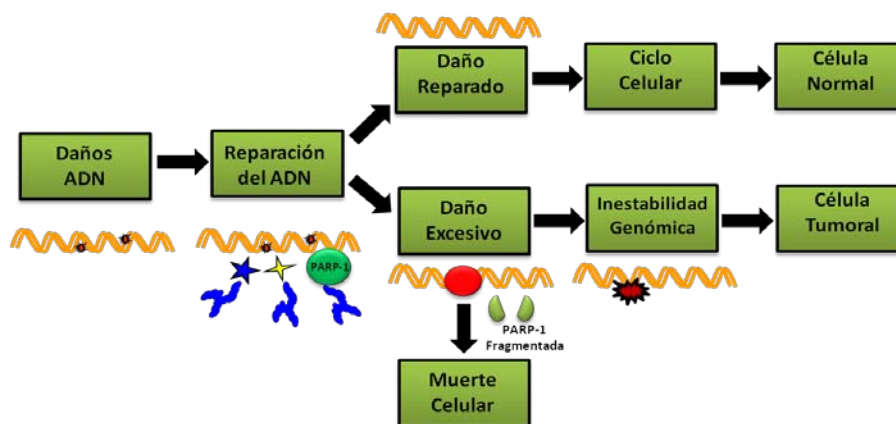


Figura INT.15. Correlación entre fenómenos de daños al ADN y Carcinogénesis. Papel de PARP-1 en la inestabilidad genómica y formación de células tumorales (Bernstein, Bernstein et al. 2002).

En este sentido se desarrolló una estrategia basada en el uso de inhibidores de PARP-1 en el tratamiento quimioterapéutico o en la potenciación de la radiosensibilización de diverso tipos tumorales. La observación de que PARP-1 se activa fuertemente por acción de radiación ionizante y agentes metilantes del ADN, propició un interés creciente por examinar los efectos de los inhibidores de PARPs con dichos agentes. Tras el desarrollo de la Segunda Generación de Inhibidores, se

abordó el diseño de los nuevos compuestos en dos sentidos: buscar células diana genéticamente predispuestas a morir cuando se perdía la actividad PARP o combinar la inhibición de PARPs con distintos agentes quimioterapéuticos o radioterapia. El mecanismo de Letalidad Sintética está basado en que células que presentan defectos en la maquinaria de reparación de daños de doble cadena o DSBs, sobre todo aquellas con importantes mutaciones en BRCA, se vuelven tremendamente dependientes de la actividad PARP-1 y del Sistema de Reparación por Excisión de Bases (BER) para mantener la integridad del genoma (**Figura INT.15**) (Saleh-Gohari, Bryant et al. 2005). La eficacia del mecanismo de letalidad sintética ha sido validada en estudios donde se muestra la capacidad de los inhibidores de PARPs como potentes agentes quimioterapéuticos, en monoterapia, en modelos preclínicos de inactivación de BRCA1 y BRCA2 tanto *in vitro* como *in vivo* (Bryant, Schultz et al. 2005, Farmer, McCabe et al. 2005) . En estos modelos con deficiencias en BRCA1 y BRCA2, cuando se inhibe PARP-1 y PARP-2, no se resuelven satisfactoriamente las lesiones de cadena simple en el ADN, desarrollándose daños de doble cadena (DSBs). La deficiencia en BRCA1 o 2 no permite a estas células completar satisfactoriamente la recombinación homóloga, principal ruta de reparación de daños de doble cadena, con lo cual la inhibición de PARP resulta en un incremento en la inestabilidad genómica y de la muerte celular (Bryant, Schultz et al. 2005). En pacientes donde existen mutaciones hereditarias de BRCA, los inhibidores de PARPs suponen una terapia selectiva hacia tejidos tumorales (deficientes en BRCA) en comparación con los tejidos normales (heterocigotos para BRCA). Esto llevó a la búsqueda de otras mutaciones o deficiencias que permitieran desarrollar el mecanismo de letalidad sintética de inhibidores en monoterapia; así se realizó un *screening* que arrojó a otros candidatos de la ruta de reparación por recombinación homóloga (McCabe, Turner et al. 2006) , proteínas de reparación de ADN como RAD51 o el gen supresor de tumores PTEN. Mutaciones o deficiencias en RAD51 y PTEN son una herramienta muy actual que se están utilizando en cánceres con pronóstico grave como son los glioblastomas (Mendes-Pereira, Martin et al. 2009). A pesar de todos los resultados obtenidos, el mecanismo por el cual se desarrolla la letalidad sintética no está totalmente dilucidado; incluso hay evidencias de que se puede dar letalidad sintética mediada por la inhibición de las Tanquirasas (ARTD 5 y 6) y los genes

BRCA (McCabe, Cerone et al. 2009), sugiriendo un mecanismo alternativo e independiente a la inhibición de PARP-1 y PARP-2.

Un hecho muy llamativo que se ha observado es que células tumorales con deficiencias en BRCA1 y BRCA2, pueden presentar cierta resistencia a inhibidores de PARPs en monoterapia, debido a una reactivación de dichos genes BRCA a través de mutaciones secundarias (Ashworth 2008, Edwards, Brough et al. 2008, Sakai, Swisher et al. 2008), sobretodo en líneas con mutaciones en el gen *brca2* el cual por su importancia en el mecanismo recombinación homóloga, puede promover alta tasa de mutaciones secundarias.

La alternativa en la utilización de inhibidores de la PARilación en terapia tumoral, es usarlos como potenciadores en tratamientos de quimio o radioterapia; es decir usarlos en terapia combinada por ejemplo con agentes alquilantes, inhibidores de Topoisomerasas I o radiaciones ionizantes en líneas tumorales humanas *in vivo* o incluso en xenógrafos de tumores humanos *in vivo* (Ratnam and Low 2007). Uno de los casos más llamativos lo encontramos en el uso en terapia combinada del inhibidor AG014699 con el agente metilante Temozolomida (Plummer, Jones et al. 2008).

6.3. PARP-1 y otros desórdenes patológicos

Está bien caracterizado que varias proteínas de la familia PARP se activan rápidamente antes distintas condiciones patofisiológicas y que dicha activación es prolongada y continuada en el tiempo, mientras exista el desorden patológico. Un ejemplo es la importante producción de polímero de ADP-Ribosa durante la oclusión de la arteria cerebral media o cuando se dan fenómenos de reperfusión (Faro, Toyoda et al. 2002) . Durante infartos de miocardio severos y en situaciones de trasplantes de corazón, también hay una importante activación de PARP-1 y PARP-2 (Soriano, Liaudet et al. 2002). En general el *shock* tanto hemorrágico como séptico, induce actividad PARP en pulmones de ratones sometidos a un modelo agudo de Síndrome de Fatiga Respiratoria; del mismo modo en modelos de diabetes también se observa dicha actividad (Pacher, Liaudet et al. 2002, Pyriochou, Olah et al. 2008). A continuación analizamos algunos de los desórdenes patológicos más destacados donde se ha descrito una función para Poli (ADP-

Ribosilación) y en los que se deriva un beneficio tras el tratamiento con inhibidores de PARPs.

6.3.1. Regulación del Sistema Inmunológico: Las proteínas PARPs tienen una gran influencia sobre el sistema inmunológico, siendo capaces de regular distintas enfermedades inflamatorias. Es conocido que influyen en la maduración y diferenciación de células inmunológicas. Durante la recombinación VDJ de las Inmunoglobulinas, que ocurre tanto en linfocitos B como T, surgen reordenamientos continuos del ADN que pueden desencadenar fallos y rupturas de doble cadena; se ha propuesto un papel activo en la señalización de dichos fallos por parte de proteínas PARPs para que sean reparados satisfactoriamente (Taccioli, Rathbun et al. 1993) ya que se sabe que el uso de inhibidores de PARPs provoca una alteración en la síntesis de anticuerpos y una deficiente respuesta humoral en el organismo (Ambrose, Willimott et al. 2009). No solo se ve afectada la producción de inmunoglobulinas, sino que se sabe que ratones *parp-1^{-/-}* muestran un alto porcentaje de fenotipos anormales de linfocitos B, debido a alteraciones en la transcripción del gen *Bcl6* (dependiente de la falta de unión de PARP-1 a su región promotora), que causa que los linfocitos no puedan madurar desde sus líneas germinales (Ambrose, Papadopoulou et al. 2007). El caso de linfocitos T es muy similar y se conoce que animales *parp-1^{-/-}* presentan bajas poblaciones de células CD4⁺T y prácticamente no sintetizan Interleuquina-2 (IL-2), por lo que la respuesta inflamatoria en estos animales está anulada (Nasta, Laudisi et al. 2010). PARP-2 también afecta al número de células T a través de una parada en el proceso Timopoiesis. Como ya se dijo en el apartado de funciones de PARP-2, esta proteína está muy expresada en el región Subcapsular del Timo y su alteración provoca una anormal producción de células T (apartado 4.2 de la Introducción) (Yelamos, Monreal et al. 2006, Nicolas, Martinez et al. 2010).

6.3.2. PARP-1 en Patologías Neuronales: Está constatado que PARP-1 juega un papel activo en la muerte celular necrótica que ocurre en tejido neuronal bajo condiciones de exotoxicidad, isquemia, reperusión o incluso cuando existe una daño traumático cerebral (Tentori, Lacal et al. 2007). La Lesión Traumática Cerebral o TBI (*Traumatic Brain Injury*), también conocida como lesión intracraneal, ocurre cuando se dan fuerzas extremas sobre el cráneo, la cuales causan un trauma físico sobre el cerebro. Este tipo de lesiones causa un importante

porcentaje de muertes entre niños y personas adultas al año en todo el mundo. Dentro de la patofisiología del TBI se produce un importante incremento del estrés oxidativo y nitrosativo que acarrea una potente activación de PARP-1 (Martin-Oliva, Aguilar-Quesada et al. 2006, Bryant, Petermann et al. 2009, Rodriguez, Gonzalez-Flores et al. 2011), en respuesta a los daños al ADN ocasionados por la especies reactivas de tipo ROS y RNS. La presencia persistente en el tiempo de Peroxinitritos durante lesiones tipo TBI hace que PARP-1 se active a los 30 minutos tras producirse el trauma y se prolongue hasta 72 horas después del mismo (Virag and Szabo 2002, Pacher, Beckman et al. 2007). Se ha visto como distintos inhibidores de PARPs como INH2B (*5-iodo-6-amino-1,2-benzopyrone*), INO-1001, PJ34 (*[N-(6-Oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)-N,N-imethylacetamide]*), o incluso su eliminación genética, impiden el daño neurotóxico inducido por TBI (LaPlaca, Raghupathi et al. 1999, Besson, Croci et al. 2003, Besson, Margail et al. 2003, Pacher, Beckman et al. 2007).

6.3.3. PARP-1 en Infección con VIH: Existen multitud de resultados que evidencian un papel activo de PARP-1 en la infección por el virus del SIDA. Impedir la localización nuclear de PARP-1 tiene consecuencias durante la infección (Molnar, Toth et al. 2006), ya que se relacionaría a PARP-1 con la mayor susceptibilidad de la célula hospedadora a incorporar la secuencia vírica en su ADN. Estudios independientes han demostrado que inhibidores de primera generación de PARPs como son los derivados de la benzopironas y de las Nicotinamidas, presentan potentes efectos antivirales en células infectadas por VIH (Pacher and Szabo 2006). En la actualidad se cree que PARP-1 es necesaria para la integración y la transcripción de virus, pero el mecanismo por el cual actúa y que permitiría utilizarla como diana terapéutica aún no se conoce.

6.3.4. PARP-1 y la Enfermedad del Parkinson: El Parkinson es un desorden neurológico del Sistema Nervioso Central, que implica muerte de neuronas que contienen dopamina, localizadas en la sustancia negra cerebral. Se ha demostrado la producción y relación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) con la neurotoxicidad inducida por la toxina MPTP; hay evidencias directas de que dicha toxina se relaciona con la inducción de la enfermedad de Parkinson en modelos de ratón (Akiyama, Takasawa et al. 2001). Tratamientos simultáneos con 5 inhibidores de PARPs aminoran la pérdida de

catecolaminas inducidas por la toxina MPTP, por lo que podrían utilizarse como fármacos putativos en el tratamiento de la enfermedad (Oliver, Menissier-de Murcia et al. 1999, Stevens, Li et al. 2007).

INTRODUCCIÓN II: Procesos de Muerte Celular

1. Concepto de Muerte Celular y Clasificación

El proceso de muerte celular es considerado como un conjunto de cambios que ocurren en el interior de la célula, que desembocan en que ésta pierda la capacidad de desarrollar sus funciones vitales básicas, llevando a un colapso metabólico y una pérdida total de su viabilidad. Los procesos de muerte celular ocurren continuamente en los tejidos que conforman a un organismo y constituyen un aspecto crucial en el desarrollo, mantenimiento y reparación de los mismos; se sabe que diariamente entre 50 y 70 millones de células mueren de forma programada en un humano adulto sano, como consecuencia de la renovación tisular (Reed 1999). Así en organismos multicelulares el balance entre proliferación y muerte celular es esencial para el control del número de células que conforman el tejido o el órgano (Broker, Kruyt et al. 2005). Se puede establecer que el mantenimiento de la homeostasis celular en los tejidos no es solo el principal factor que desencadena procesos de muerte celular. Las respuestas fisiológicas y patofisiológicas a lesiones físicas o genéticas, desarrollo embrionario, privación de nutrientes u oxígeno, pérdida de contacto célula-célula o la infección con diversos patógenos, también son factores desencadenantes de un tipo u otro de muerte celular (Cory and Adams 2002, Cory, Huang et al. 2003, Broker, Kruyt et al. 2005, Kroemer, Galluzzi et al. 2009).

En relación con procesos patológicos, hay que destacar que el cáncer suele caracterizarse por una muerte celular insuficiente debido a deficiencias genéticas en los mecanismos de activación y ejecución de los procesos de muerte celular. Además se conoce que multitud de enfermedades degenerativas que afectan al sistema inmunológico, nervioso y cardiovascular, como el SIDA, Alzheimer o Parkinson, tienen en común una activación inadecuada de los procesos de muerte celular, lo que afectaría fuertemente al número de células funcionales que se presenten en los tejidos u órganos más afectados (Ranger, Malynn et al. 2001).

Algo que caracteriza a todo proceso de muerte celular es la presencia del denominado **Punto de No Retorno**, es decir, el momento a partir del cual el proceso de muerte celular es totalmente irreversible y conllevará la pérdida total

de viabilidad en la célula. Debido a que el Punto de No Retorno varía entre los distintos procesos de muerte, se organizó en 2005 un Comité para la Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD) o *Nomenclature Committee on Cell Death*, el cual propone que una célula se considera como “muerta” cuando presenta alguna (o todas) de las siguientes características morfológicas o bioquímicas (Kroemer, El-Deiry et al. 2005):

- ❖ Pérdida total de la integridad de la membrana plasmática, lo que resulta en una pérdida de la integridad celular.
- ❖ Fragmentación celular que origina los denominados “Cuerpos Apoptóticos”.
- ❖ Captura y digestión por parte de células adyacentes *in vivo*, de la célula completa o de fragmentos de la misma.

El comité NCCD propuso una serie de criterios más específicos que permitirían definir cada proceso de muerte celular e incluirlo en un grupo general que mantuviese características similares. Primero definiré los criterios y a continuación estableceré los grupos de clasificación.

La muerte celular puede ser clasificada de acuerdo a 4 grandes grupos de criterios: (A) Apariencia Morfológica donde se incluirán los procesos de apoptosis, necrosis, autofagia, entosis, etcétera. (B) Criterios Enzimológicos en función de que intervengan o no nucleasas y proteasas degradativas. (C) Aspectos Funcionales que permitirán establecer si el proceso de muerte está o no programado genéticamente, o es resultado de un proceso patológico. (D) Características Inmunológicas en función de que intervenga o no el Sistema Inmunológico del Organismo (Melino 2001, Kroemer, El-Deiry et al. 2005).

Atendiendo a las características morfológicas o bioquímicas propuestas, el comité NCCD estableció **3 grandes grupos de Procesos de Muerte Celular:**

- ❖ **Muerte Celular Programada:** aquella que ocurre durante el proceso embrionario, post-embrionario o durante el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos.

- ❖ **Muerte Celular Regulada:** aquella que siendo o no programada, su inicio o ejecución está mediado por una maquinaria celular determinada por lo tanto es fácil de controlar mediante herramientas terapéuticas.
- ❖ **Muerte Celular Accidental:** aquella que ocurre tras un daño severo al organismo o a la célula, que prácticamente es irreversible y que se manifiesta con características de necrosis.

En el año 2012 el NCCD propone una serie de recomendaciones para definir correctamente las distintas morfologías de muerte celular y usar la terminología adecuada para cada proceso. Esto supone un gran progreso en la exploración bioquímica y genética de cada proceso, estableciendo una clasificación funcional de la siguiente forma (Galluzzi, Vitale et al. 2012):

- ❖ Apoptosis

Por Ruta Extrínseca Por Ruta Intrínseca

- ❖ Necrosis

- ❖ Muerte Celular Autofágica

- ❖ Otros tipos:

Cornificación Muerte por PARtanatos (*PARthanatos*)

Catástrofe Mitótica Piroptosis

Anoikis Netosis Paraptosis

Entosis *Pyronecrosis* Exotoxicidad

2. Apoptosis: Muerte Celular Programada de Tipo I

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que fisiológicamente está conservado en todos los organismos eucariotas superiores, desde nematodos hasta vertebrados superiores, pasando por plantas (Ellis, Yuan et al. 1991). Como tal, tiene gran importancia durante el desarrollo embrionario y en la etapa adulta del individuo, ya que es uno de los principales métodos de eliminación celular para el mantenimiento de la homeostasis tisular (Ellis, Yuan et al. 1991). Se caracterizó por primera vez en el año 1972 por Kerr (Kerr, Wyllie et al. 1972); el mecanismo molecular de la apoptosis está bien conservado a lo largo de

la evolución y la mayor parte del conocimiento en la ruta lo aportó un pequeño gusano *Caenorhabditis elegans*, en el cual se identificaron por primera vez los genes implicados en la ruta o genes *ced* (*cell death abnormal*) concretamente los genes *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* (Hengartner and Horvitz 1994, Hengartner and Horvitz 1994, Hengartner 1996, Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1997, James, Gschmeissner et al. 1997). Estudios posteriores demostraron la existencia de genes homólogos a *ced*s en humanos, lo cuál ha sido crucial en el avance de la biomedicina en distintas patologías y enfermedades; tanto es así que el premio nobel de Medicina recayó en el año 2002 sobre los científicos Sydney Brenner, John Sulston y H. Robert Horvits, por sus trabajos en los cuáles demostraron qué genes de la familia *ced* tenían función iniciadora de la apoptosis (genes pro-apoptóticos) y cuáles era capaces de reprimir el proceso (genes anti-apoptóticos).

El proceso de apoptosis se caracteriza por la aparición de una serie de eventos moleculares y morfológicos que se encuentran bien definidos (Wyllie, Kerr et al. 1980) y que se resumen en las siguiente etapas: (A) Condensación del citoplasma y compactación de la cromatina (B) Activación de Endonucleasas celulares y fragmentación oligonucleosomal del ADN en fragmentos de 180 pares de base o múltiplo de éstos y (C) Fragmentación Celular en unas estructuras características que pasaremos a llamar “Cuerpos Apoptóticos”, en un proceso que tradicionalmente se ha denominado *Blebbing*. Este proceso surge por una importante dilatación del Retículo Endoplasmático que origina vesículas, que tienden a unirse a la membrana plasmática, adquiriendo esta forma característica en burbujas. Al mismo tiempo se produce una reorganización de la membrana celular, en la cual las moléculas de Fosfatidilserina quedan expuestas a la cara externa de la membrana, convirtiéndose en una señal para que las células vecinas fagocíticas las eliminen (Fadok, Bratton et al. 2000). La activación de las proteasas llamadas Caspasas, es el principal responsable de los cambios en la morfología celular que caracteriza a la apoptosis (**Figura INT.16**).

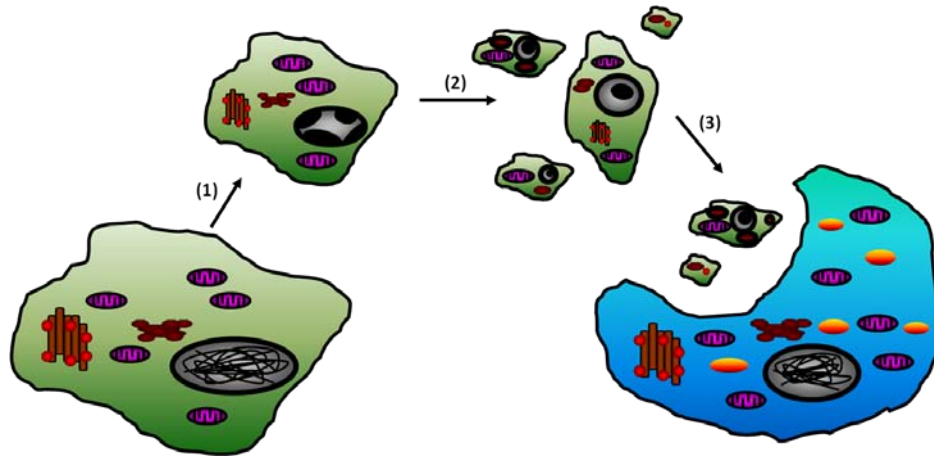
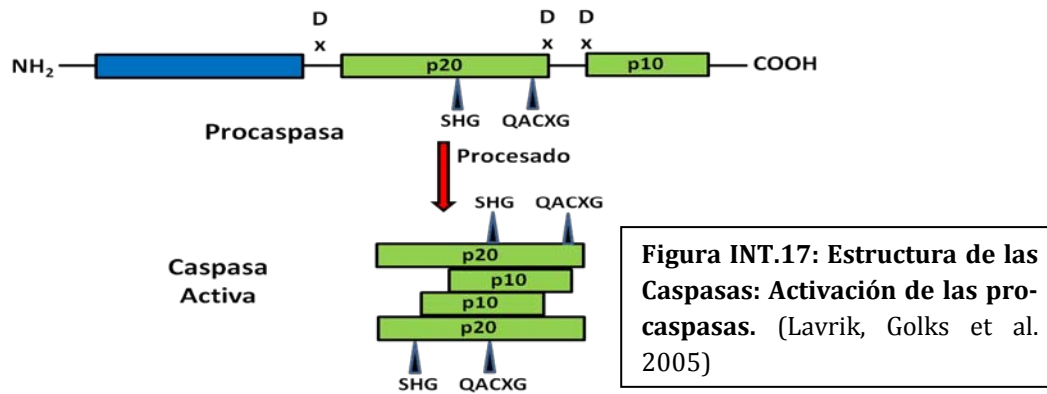


Figura INT.16: Etapas de la Apoptosis. (1) Disminución del volumen celular y condensación de la cromatina **(2)** Fragmentación del ADN, aparición de protuberancias en la célula. Proceso de *Blebbing* y fragmentación celular **(3)** Fagocitosis

Los cuerpos apoptóticos van a ser eliminados mediante fagocitosis por macrófagos y por las células vecinas, evitando así que el material intracelular de la célula apoptótica entre en contacto con el Sistema Inmunológico, lo que podría desencadenar una respuesta inflamatoria no deseada.

2.1. Caspasas: Constituyen un conjunto de proteasas de la familia de las Cisteín Proteasas (*cystein aspartyl-specific proteases*), tremendamente conservadas en la evolución y principal componente regulador y ejecutor de la apoptosis. El acrónimo caspasa fue adoptado por convenio en 1996 (Alnemri, Livingston et al. 1996). En las células están constitutivamente expresadas como proenzimas o zimógenos y se activan por proteólisis, tras la estimulación de la apoptosis.

En humanos existen 11 genes que codifican para las 11 caspasas descritas hasta la fecha, de la caspasa 1 a la caspasa 10 y la caspasa 14 que tan solo se expresa en queratinocitos (Pop and Salvesen 2009). Como ya he comentado, todas ellas se sintetizan en forma de zimógenos o procaspasas. De forma general todas las procaspasas contienen un prodominio N-Terminal, una subunidad grande o p20 y una subunidad pequeña o p10 (**Figura INT.17**).

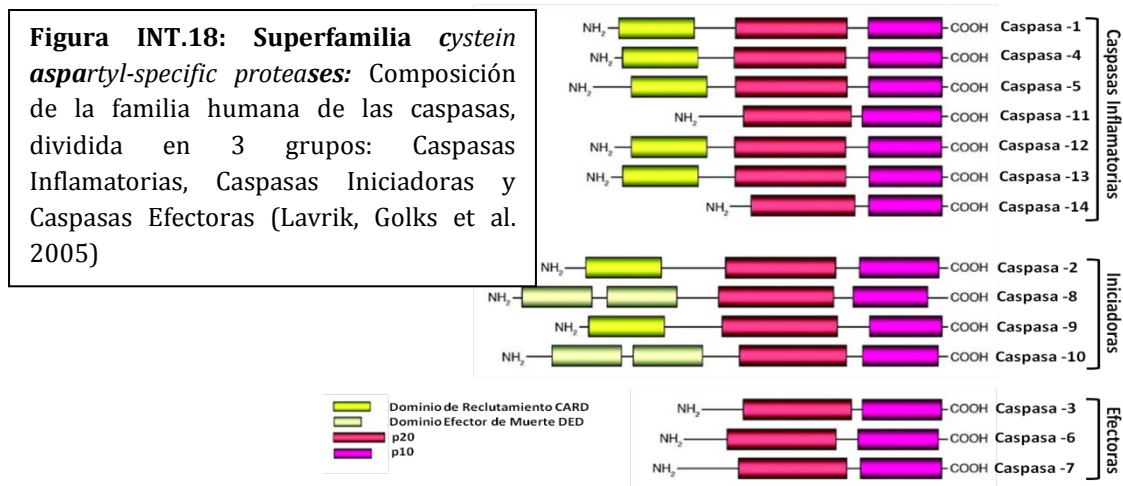


El centro catalítico de las caspasas se localiza en la subunidad p20, donde se localiza un residuo de Cisteína o residuo 285, que forma parte de una pequeña secuencia "QACXG" muy conservada dentro de la familia. Entre la subunidad p20 y p10 forman el punto de reconocimiento y anclaje al sustrato, pero la especificidad sobre el mismo, recaerá sobre subdominios específicos de la región p10. La proteólisis que procesa la procaspasa hacia proteasa activa, se lleva a cabo sobre la unión del prodominio N-Terminal con la región p20, quedando libre el prodominio y dejando una forma activa del enzima (Lavrik, Golks et al. 2005). Por su estructura característica, las caspasas activas van a presentar dos sitios catalíticos, uno por cada monómero que las forman. Van a ser capaces de reconocer secuencias de cuatro aminoácidos P4-P3-P2-P1, de forma que cortan después del aminoácido carboxiterminal o P1, que suele ser un residuo de Aspártico (Li and Yuan 2008). Se ha descrito que el residuo P3 suele ser un Glutámico mientras que P2 y P4 son variables, así la secuencia de reconocimiento de corte mantiene la morfología X-Glu-X-Asp(Lavrik, Golks et al. 2005).

2.2. Tipos de Caspasas: Atendiendo a sus características morfológicas y funcionales se suelen agrupar a las caspasas en 3 familias funcionales. A pesar de ser caspasa, algunas de ellas pueden estar relacionadas con funciones no apoptóticas como son diferenciación celular, migración o incluso en la proliferación de líneas de linfocitos (Kuranaga and Miura 2007). Así los tres grupos que establecemos son Caspasas Pro-apoptóticas, Caspasas Pro-inflamatorias y Caspasa 14, específica de la diferenciación de queratinocitos. Clásicamente se solían agrupar únicamente en dos grupos funcionales, así se las denominaba Caspasas Iniciadoras y Caspasas Ejecutoras o Efectoras. El concepto de caspasa pro-inflamatoria hace referencia a ciertas funciones atribuibles a un pequeño

grupo de caspasas, relacionadas con la sobreactivación de células implicadas en la respuesta inflamatoria (Pop and Salvesen 2009).

Las **Caspasas Iniciadoras** son capaces de activarse por recepción de la señal pro-apoptótica y también por autocatálisis por proximidad; este grupo lo componen las caspasas 8, 9, 10, 2, 1, 4 y 5 y todas ellas son capaces de transmitir la señal apoptótica a las ejecutoras. Las **Caspasas Ejecutoras o Efectoras** serían las caspasas 3, 6 y 7 y son las encargadas del desmantelamiento de la arquitectura celular por presentar multitud de sustratos relacionados con supervivencia celular (proteínas del citoesqueleto tipo actina, fodrina o plectina), reparación de daños al ADN (PARP-1 entre otras) y proteínas implicadas en el control del ciclo celular (MDM2 por ejemplo). El hecho de que las caspasas efectoras se activen por proteólisis inducida por caspasas iniciadoras, hace que a la apoptosis en ocasiones se la denomine Cascada Apoptótica (**Figura INT.18**).



2.3.Principales Vías de Activación de las Caspasas: Dos pueden ser consideradas las principales vías de inducción y desarrollo de la apoptosis.

2.3.1. Vía Extrínseca o a través de Receptores de Muerte: La caspasa responsable del inicio de la vía extrínseca es la caspasa iniciadora 8. Es una ruta que se induce a partir de la unión de distintos tipos de ligandos de muerte como son TRAIL, TNF- α o Fas-L, a sus respectivos receptores que se localizarían en la membrana celular. El resultado de la unión ligando-receptor es la trimerización de éste y la formación de un complejo multiproteico conocido como DISC (Complejo Inductor de Señales de Muerte o *Death Inducing Signaling Complex*). Sobre DISC se podrá unir la caspasa 8 que a través de un mecanismo de activación por

aproximación se auto-activa y desencadena toda la ruta apoptótica (Strasser, O'Connor et al. 2000, Igney and Krammer 2002, Lavrik, Krueger et al. 2003, Lavrik, Golks et al. 2005) (**Figura INT.19**).

De forma general, todos los receptores de muerte son proteínas transmembrana de Tipo-I, por lo cual se conforman de un único dominio transmembrana con su extremo N-Terminal hacia el medio extracelular y el C-Terminal hacia el medio intracelular. En el extremo N-Terminal localizamos de dos a cuatro dominios extracelulares ricos en Cisteínas que denominamos Dominio CRD (*Cystein-Rich Domain*) que están implicados en la interacción con el ligando de muerte. En el extremo C-Terminal localizamos la secuencia o dominio de muerte DD (*Death Domain*) que presenta en torno a 80 aminoácidos y que van a servir para reclutar las proteínas adaptadoras TRADD o FADD (Ashkenazi and Dixit 1998).

Se han descrito 3 vías de señalización de ligandos de muerte, una por cada ligando conocido, TRAIL, Fas-L o TNF- α ; manteniendo éstos sus 3 receptores respectivos. La unión entre **TNF- α y su receptor TNFR1**, resulta en la formación de un Complejo I en la superficie celular que transduce una señal intracelular que incrementaría la expresión de NF- κ B, el cual activa genes relacionados con la supervivencia celular. Además se origina un segundo complejo intracitosólico o Complejo II, que sería capaz de activar la ruta extrínseca de apoptosis. La formación del Complejo I permite la unión de TRADD a los dominios de muerte DD del receptor; esto permite que la proteína RIP1 (*Receptor Interacting Protein Kinase 1*) se le una también a DD (Ashkenazi and Dixit 1998). La configuración final del complejo I la constituyen las proteínas TRAF2/5 (*TNFR-Associated Factor 2/5*) y c-IAP1, y localizándose ya en los *Lipid Rafts* (Legler, Micheau et al. 2003). De este modo se permite la activación de NF- κ B (Hsu, Shu et al. 1996, Baud and Karin 2001, Varfolomeev and Ashkenazi 2004). Para que se origine el Complejo II se necesita que tras la trimerización del receptor, se libere la proteína inhibidora SODD (*Silencer of Death Domain*) del dominio intracelular de TNFR1 y permitiendo que se le una la proteína adaptadora TRADD (*TNFR-Associated Death Domain*), que va a servir de proteína acopladora para el resto de componentes que configurarán el complejo DISC (Smith, Farrah et al. 1994). Algo especial del TNF- α radica en su

capacidad de inducir tanto procesos de muerte como de supervivencia. Esto ha supuesto que a pesar de haber sido descrita inicialmente como una importante citoquina en el tratamiento antitumoral, su uso esté sujeto a multitud de controversias (Bertazza, Mocellin et al. 2008). **(Figura INT.19)**.

La unión de **Fas-L (Fas, CD95 o APO-1) con su receptor Fas-R** produce una rápida formación del complejo DISC a través de los dominios DD (Medema, Scaffidi et al. 1997), requiriendo de nuevo la unión de FADD, el cual a través de su dominio DED interacciona por una parte con el dominio DD del receptor Fas-R y por otra con la pro-caspasa 8. Una vez que se agreguen 2 o más moléculas de pro-caspasa 8, se auto-activan por proximidad, es decir por auto-proteólisis. La activación de las pro-caspasas 8 puede inhibirse por FLIP, que también presenta el dominio DED, que le relaciona estructuralmente a caspasa 8, pero sin llegar a tener la actividad proteasa de ésta. FLIP por lo tanto presentaría una función claramente antiapoptótica (Rasper, Vaillancourt et al. 1998) en este modelo. Se ha demostrado que la unión Fas-L/Fas-R no siempre da lugar a procesos de muerte apoptótica y recientemente se ha identificado la activación de diversas rutas de supervivencia mediadas por Fas-L. Así por, ejemplo, es capaz de activar la ruta de NF- κ B y MAPk (concretamente ERK1/2, JNK 1/2 y p38) lo que ~~es~~ estrechamente relacionado con fenómenos de proliferación e invasividad en células tumorales (Barnhart, Legembre et al. 2004, Legembre, Barnhart et al. 2004), por lo que se uso en clínica es controvertido.

El tercer caso lo encontramos en TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) que es una proteína transmembrana tipo II, expresada en la mayoría de células del Sistema Inmunológico y que juega un papel en la eliminación de células infectadas por virus o tumorogénicas (Hayakawa, Screpanti et al. 2004). La unión entre **TRAIL y sus receptores TRAIL-R** es más compleja que en los casos anteriores, básicamente porque en humanos se localizan hasta 5 receptores TRAIL-R, numerados de TRAIL-R1 a TRAIL-R5. Se conoce que la unión entre TRAIL y TRAIL-R1 y TRAIL-R2 va a inducir apoptosis (Screaton, Mongkolsapaya et al. 1997, Sheridan, Marsters et al. 1997, Walczak, Degli-Esposti et al. 1997). Se sabe que el estrés del Retículo Endoplasmático a través de la activación del factor de transcripción CHOP o los daños al ADN, a través de p53, pueden inducir expresión

de TRAIL-R2, lo cual favorece su unión con TRAIL y la inducción de apoptosis (Wu, Burns et al. 1997, Yamaguchi and Wang 2004). Se sabe que la expresión o sobreexpresión de los receptores TRAIL-R3 y TRAIL-R4 desencadena una represión de la apoptosis, incluso en el caso de TRAIL-R4 se sabe que es capaz de activar la ruta de NF- κ B, con lo cual favorece la supervivencia celular y una respuesta claramente antiapoptótica (Degli-Esposti, Dougall et al. 1997, Kimberley and Screaton 2004). Está descrito que el balance entre las rutas de apoptosis y de supervivencia que regulan los receptores de TRAIL, puede marcar el destino final de una célula; por lo tanto en células tumorales donde se tiende a mantener inhibidas o reprimidas las rutas de muerte apoptótica, ciertos receptores de TRAIL estarían encaminados a la supervivencia, adaptación y proliferación del tumor. Esto ha implicado a TRAIL en muchos tipos de tumores como molécula señalizadora importante, capaz de inducir procesos tales como la autofagia adaptativa cuando se las somete a tratamiento con TRAIL en monoterapia (Herrero-Martin, Hoyer-Hansen et al. 2009). **(Figura INT.19)**.

2.3.2. Vía Intrínseca o Mitocondrial: es una vía que se activa principalmente como respuesta a daños celulares inducidos por radiación ultravioleta, agentes genotóxicos y retirada de factores de crecimiento. A pesar de que la mitocondria supone el soporte energético vital de todas las células, también son orgánulos que se relacionan con los procesos de muerte celular en respuesta a determinados tipos de estrés. El fundamento de esta vía es la liberación de componentes del espacio intramembranoso mitocondrial al citosol, en respuesta a tipos concretos de estrés. Las principales proteínas pro-apoptóticas mitocondriales liberadas durante la vía mitocondrial son Citocromo-C, Smac/Diablo, AIF, Omi/htrA2 y las Endonucleasas G (Green and Reed 1998, Shimizu, Narita et al. 1999, Lemasters, Qian et al. 2002, Bras, Queenan et al. 2005).

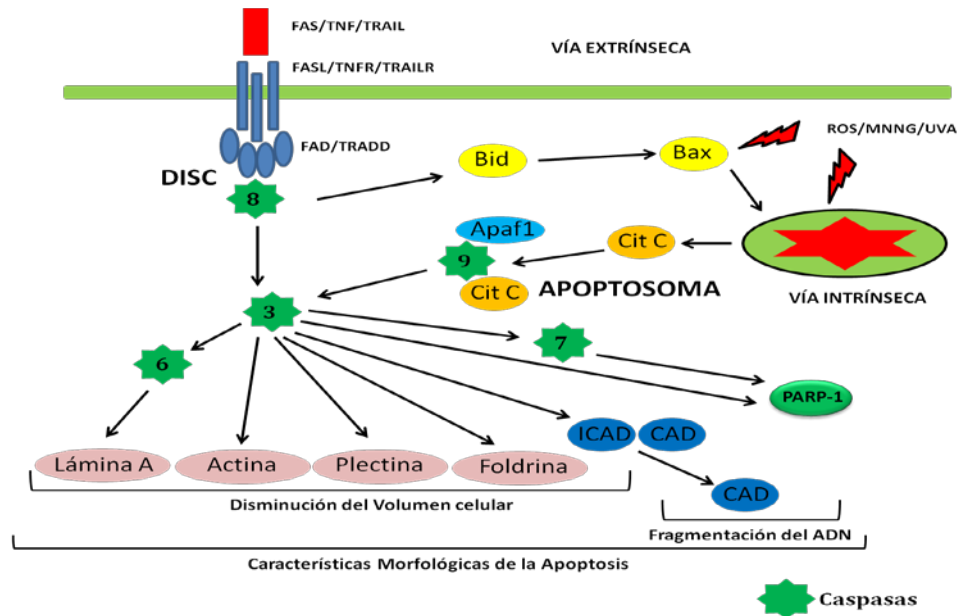


Figura INT.19: Principales Rutas de la Apoptosis: (1) Vía Extrínseca o Por Receptores de Muerte (2) Vía Intrínseca o Mitocondrial. Formación del Complejo Iniciador DISC y los distintos componentes del Apoptosoma. Una vez que se ha producido la activación de las distintas caspasas efectoras, éstas ejercen su función como proteasas sobre distintos sustratos, produciéndose una condensación de la cromatina y una ruptura del ADN. Posteriormente la célula sufrirá un proceso de fragmentación celular que favorecería su eliminación por células fagocíticas.

La ruta intrínseca está controlada por las proteínas de la familia Bcl-2 (Green and Reed 1998) formada por más de 20 miembros, organizados en 3 grandes grupos: (A) **Proteínas Anti-apoptóticas:** que interfieren la ruta mediante su unión a miembros pro-apoptóticos; destacamos los miembros Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, BFL-1 y Bcl-w (Zha, Aime-Sempe et al. 1996). El principal miembro es Bcl-2, cuyo gen *bcl-2* fue descrito como un oncogén que se activa en linfomas foliculares humanos de células B (Hanada, Krajewski et al. 1993, Zha, Aime-Sempe et al. 1996). (B) **Proteínas Pro-Apoptóticas tipo Bax:** Los miembros conocidos de este grupo son Bax, Bak y Bok y todos ellos son esenciales en la ejecución de la ruta mitocondrial de la apoptosis. Se cree que ejercen su función apoptótica induciendo una fuerte permeabilización de la membrana mitocondrial externa, produciendo así la liberación de las proteínas pro-apoptóticas alojadas en el espacio intermembrana (Korsmeyer, Wei et al. 2000, Wei, Zong et al. 2001). La proteína Bax se localiza en el citosol en forma de monómero, pero tras el estímulo pro-apoptótico es capaz de oligomerizar y migrar a la superficie de la mitocondria (Hsu, Kaipia et al. 1997); por el contrario la proteína Bak se encuentra en la

membrana mitocondrial externa en forma de oligómero (Chittenden, Harrington et al. 1995). (C) **Proteínas “solo BH3”**: este grupo lo conforman Bid, Bim_L, Bad, Noxa, Puma, Bmf y Hrk. Se caracterizan todos ellos por presentar el dominio de homología BH3, el cual es necesario y suficiente como para que posean la capacidad de inducir apoptosis. Concretamente las proteínas Bim_L y Bid ejercen su función pro-apoptótica a través de la interacción con las proteínas Bax y Bak, produciendo en éstos una serie de cambios conformacionales que inducen su oligomerización y activación (Korsmeyer, Wei et al. 2000). Las proteínas Bid, Bad y Noxa interaccionan con Bcl-2 y Bcl-x_L de forma que impiden la función antiapoptótica de éstos (Willis and Adams 2005). **(Figura INT.19)**.

3. Muerte Celular por Necrosis

El proceso de muerte celular necrótica o necrosis se caracteriza morfológicamente por un incremento en el volumen celular (Oncosis), una ruptura de la membrana plasmática y en consecuencia una pérdida del contenido intracelular (Trump, Berezsky et al. 1997) **(Figura INT.20)**.

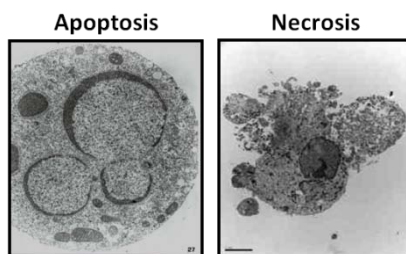


Figura INT.20: Comparación Morfológica entre Apoptosis y Necrosis. Imágenes representativas de microscopía electrónica que muestran las diferencias estructurales entre ambos procesos de muerte celular.

Durante mucho tiempo la necrosis ha sido considerada un proceso incontrolado y “sucio” de muerte celular; sin embargo en la última década han aparecido multitud de evidencias de peso que confirman que la ejecución de los procesos de muerte necrótica están muy regulados desde el estímulo inductor hasta el mecanismo catabólico que desencadenen, pasando por una importante cascada de transducción de señales (Festjens, Vanden Berghe et al. 2006, Golstein and Kroemer 2007). Así por ejemplo se conoce que receptores con dominios de muerte, clásicos en la ruta extrínseca apoptótica, como son TNFR1, Fas/CD95 o TRAIL-R o incluso receptores tipo *Toll-Like Receptors* (TLR3 y TLR4) pueden inducir necrosis en presencia de inhibidores de caspasas. En todos los casos, la muerte necrótica inducida por receptores de muerte, está mediada y regulada por las quinasas RIP1 (Holler, Zaru et al. 2000); estos descubrimientos fueron

demostrados usando líneas *knockout* y los inhibidores químicos Necrostatinas (Degterev, Huang et al. 2005, Degterev, Hitomi et al. 2008). Bajo condiciones pro-apoptóticas insuficientes para generar apoptosis, TNF- α es capaz de interactuar con TNFR1 e inducir el reclutamiento de RIP1 y otras proteínas para generar el Complejo I típico de la apoptosis, pero que no tendrá dicho papel en el desarrollo de esta ruta. En una etapa posterior, RIP1 disociaría del complejo I completamente activa y se volvería a asociar con otras proteínas citosólicas como son RIP3, FADD y Caspasa 8 para generar el complejo IIb que es capaz de inducir Necrosis y no apoptosis (Christofferson and Yuan 2010, Dunai, Bauer et al. 2011).

A raíz de estos descubrimientos, se comenzó a denominar a la necrosis como **Necroptosis**, haciendo referencia a su grado de control y regulación, definiéndola por el Comité NCCD como un proceso de muerte celular que puede ser anulado por inhibición de las quinasas RIP1, tanto por medios químicos como por silenciamiento genético (Degterev, Hitomi et al. 2008, Kroemer, Galluzzi et al. 2009). Actualmente se ha conseguido discernir entre situaciones de Necroptosis totalmente fortuitas en la célula y aquellas que se encuentran programadas de forma genética.

Distintos mediadores, orgánulos y procesos bioquímicos han sido implicados en el desarrollo de la Necroptosis, pero aún hoy en día hay existe mucha discrepancia entre la comunidad científica sobre cuáles regulan y cuáles son más importantes. Se ha propuesto que podrían darse incluso fenómenos de Vecindad o *Bystander* intracelulares capaces de regular el proceso en sí. Por ejemplo, alteraciones en las mitocondrias (desacoplamiento mitocondrial, generación de ROS, estrés nitrosativo, pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial), cambios lisosomales (generación de ROS por reacciones tipo Fenton, caídas en la permeabilización de las membranas lisosomales), cambios nucleares (sobreactivación de PARP-1 y colapso energético), degradación lipídica (activación de fosfolipasas, lipooxigenasas y esfingomielinasas) o incrementos en las concentraciones citosólicas de Ca²⁺, pueden inducir activación de proteasas no-caspasas y desencadenar Necroptosis (Nicotera, Bernassola et al. 1999, Nicotera and Melino 2004, Golstein and Kroemer 2007).

4. Muerte Celular Autofágica

La autofagia es un proceso catabólico que se encarga del reciclado de orgánulos y proteínas de larga vida en todas las células. Es un proceso crucial en el cual distintas fracciones del contenido citosólico son secuestradas en estructuras de doble membrana o Autofagosomas, para posteriormente fusionarse con lisosomas, formando una estructura vesicular denominada Autolisosoma. Como resultado del proceso ocurrirá el reciclado del contenido de los autolisosomas a través de la proteasas ácidas que contenían los lisosomas (Levine and Klionsky 2004, Levine and Kroemer 2008). Dependiendo del estímulo, su durabilidad y la intensidad con que se desencadena la autofagia en una célula, este proceso puede volverse un proceso de muerte celular programada. Así por ejemplo, si la fusión con lisosomas está bloqueada, se produce un acúmulo de autofagosomas que conducirá a la muerte de la célula por incapacidad de reciclar el contenido de los mismos y volver a su estado basal. Es quizás en la autofagia, donde el concepto de Punto de No Retorno está más arraigado. Según el comité NCCD, la Muerte Celular Autofágica o A Consecuencia de la Autofagia se caracteriza morfológicamente como un proceso de muerte celular que ocurre en ausencia de condensación de la cromatina, pero que va acompañada de una vacuolización autofágica masiva en el citoplasma celular (Baehrecke 2005).

El concepto, ruta e implicaciones de la autofagia en la fisiología y patofisiología celular serán motivo de estudio en un apartado posterior de esta Memoria. En la tabla 1 quedan recogidas las principales diferencias morfológicas entre apoptosis, necrosis, autofagia y PARTanatos (Clarke 1990, Kroemer, Galluzzi et al. 2009) (**Tabla 1**).

5. Cornificación

La Cornificación es un tipo muy específico de muerte celular de la epidermis. Morfológica y bioquímicamente es distinta en comparación con el proceso clásico de apoptosis. Conduce a la formación de **Corneocitos** que son queratinocitos muertos que acumulan una amalgama de proteínas, entre las que cabe destacar Queratina, Loricrina o Involucrina; y de lípidos, destacando ácidos grasos variados y ceramidas. El acúmulo sin control de todas estas sustancias les acarrearán la muerte a los queratinocitos. Desde un punto de vista fisiológico, la

Cornificación es necesaria para formar la primera capa de piel del organismo que al estar cornificada, supone la primera barrera de resistencia mecánica del organismo frente al medio externo que le rodea. El proceso de Cornificación dota a la piel de elasticidad, resistencia a temperatura, humedad o agentes químicos y supondrá una barrera importante y muy inexpugnable frente a la mayoría de patógenos y a una gran cantidad de parásitos. Se la considera como un programa final de diferenciación celular (Candi, Schmidt et al. 2005, Lippens, Denecker et al. 2005). El hecho de que pueda ser parcialmente bloqueada si se inhibe la Caspasa-14, hace pensar que es un proceso de muerte celular regulado por ciertos componentes de la vía apoptótica (Garrido and Kroemer 2004), considerando por ello algunos autores, que ciertos componentes apoptóticos regularían este tipo de muerte celular, imprescindible en el desarrollo del organismo (Galluzzi, Joza et al. 2008).

A nivel molecular la Cornificación sigue un patrón específico de diferenciación epitelial, durante el cual las células expresarían todos los enzimas y sustratos requeridos para construir la barrera epidérmica. Algunas de las principales enzimas que los queratinocitos deben expresar durante la Cornificación son las Transglutaminas 1, 3 y 5, las cuales presentan como sustratos específicos las proteínas Loricinas, Involucrinas o SP100 (Melino, Candi et al. 2000). Además estas células deben sintetizar una batería específica de lípidos que deben exportar al espacio extracelular, donde interaccionarán con proteínas cornificadas y proteasas, para dotar de impermeabilidad y descamación a la piel.

6. Muerte por *PARthanatos* (Muerte Mediada por AIF)

El proceso de muerte celular por *PARthanatos* consiste en una muerte a través de la sobreactivación de la proteína nuclear PARP-1. Como consecuencia de una activación masiva de PARP-1 en respuesta a daños al ADN, no solo se produce un colapso energético debido a la propia actividad del enzima que podría acarrear fenómenos de necrosis; sino que la presencia de pequeños oligómeros de ADP-Ribosa en el núcleo, podría trascender en una traslocación de estas moléculas de pequeño tamaño hacia el citosol. Una vez allí por un mecanismo aún no conocido serán capaces de alterar la permeabilidad de la membrana mitocondrial, permitiendo la salida del factor pro-apoptótico AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) que

migrará al núcleo donde propiciaría condensación de la cromatina y rupturas en el ADN. Finalmente la célula moriría mediante un proceso con características de apoptosis (Yu, Wang et al. 2002, Andrabi, Kim et al. 2006, Yu, Andrabi et al. 2006) (Tabla 1 y Figura Anexa 3).

	Apoptosis	Necrosis	Autofagia	PARthanatos
Membrana	Cuerpos Apoptóticos <i>Blebbing</i> Externalización PS	Disrupción Pérdida de Integridad <i>Blebbing</i>	Formación de Autofagosomas de Doble Membrana	Pérdida de Integridad Externalización PS
Citoplasma	Morfología intacta Condensación	Vacuolización total Disgregación Hinchazón Celular	Vacuolas Autofágicas Degradación Lisosomal	Condensación
Mitocondria	Despolarización Liberación de Citocromo C	Pérdida de la Ultraestructura Mitocondrial	Degradación	Despolarización Traslación AIF al Núcleo
Núcleo	Condensación Cromatina Encogimiento	Cambios Morfológicos Digestión de Cromatina	-	Condensación Cromatina Encogimiento
ADN	Fragmentación ADN (<i>DNA ladder</i>)	Hidrólisis ADN (<i>smear</i>)	-	Rotura ADN en fragmentos grandes (≈50 kb)
ATP	Dependiente de Energía	No Require Energía	Dependiente de Energía	Independiente de Energía
Mediadores	Caspasas	Quinasas RIP	AMPk/mTORC1 Complejo ULK1 Proteínas ATGs	Activación de PARP-1 Poli (ADP-Ribosilación) Independiente Caspasas
Ioduro de Propidio	-	+	+	+
AnexinaV V	+	-	-	+
Proceso Inflamatorio	-	+	-	-
Desórdenes Asociados	Citotoxicidad, Isquemia, Trauma, AD, PD, ALS, HD, Ataxias	Epilepsia, Citotoxicidad, Isquemia, Trauma, AD, PD, ALS, HD,	AD, PD, ALS, HD,	Citotoxicidad, Isquemia, Trauma, AD, PD, ALS, HD,

Tabla 1. Morfología de los Procesos de Muerte Celular. AD: Enfermedad de Alzheimer; **ALS:** Esclerosis Lateral Amiotrófica; **HD:** Enfermedad de Huntington; **PD:** Enfermedad de Parkinson.

7. Modalidades Atípicas de Muerte Celular

7.1. Catástrofe Mitótica: es un proceso de muerte celular que ocurre durante o a consecuencia de importantes fallos en la mitosis. Normalmente va acompañado de cambios morfológicos que incluyen fenómenos de Micronucleación (fragmentación nuclear que hace que los cromosomas se fragmenten y acumulen en los distintos “núcleos hijos) o Multinucleación (presencia de dos o más núcleos que pueden ser de tamaños similares u heterogéneos, derivando a una incorrecta separación durante la Citocinesis). A pesar de estar caracterizada morfológicamente, no existe consenso a la hora de usar este término (Roninson, Broude et al. 2001, Castedo, Perfettini et al. 2004, Okada and Mak 2004). Como consecuencia el comité NCCD aconseja desde 2005 usar el término “Muerte Celular Precedida por Multinucleación” o “Muerte Celular Ocurre Durante la Metafase”, que es mucho más preciso e informativo (Kroemer, El-Deiry et al. 2005).

7.2. Anoikis: Se trata de un proceso de muerte celular apoptótica inducida por pérdida de adhesión al sustrato o a otras células (Gilmore 2005). A pesar de compartir similitudes bioquímicas con la apoptosis no es considerada como tal, sino como una alternativa poco común y a veces no fiable de la misma, inducida simplemente por ese desacoplamiento de sustratos o interacción con las células fagocíticas (Grossmann 2002). Las características bioquímicas más importantes que se dan durante la Anoikis son la pérdida de la expresión de la proteína $\beta 1$ -integrina y de la señalización de EGF (*epidermal growth factor*). Además se produce una importante inhibición de la ruta de señalización de la quinasa ERK1/2 (*extracellular-regulated Kinase-1/2*) y la sobreexpresión de Bim_L que ejercerá su función pro-apoptótica a través de la interacción con las proteínas Bax y Bak (Fischer, Kasales et al. 1994, Gilmore 2005)

7.3. Entosis: Originalmente fue descrita como un proceso de “canibalismo” en linfoblastos de pacientes con Enfermedad de Huntington (Mormone, Matarrese et al. 2006). En este tipo de muerte celular las células vecinas se secuestran las unas a las otras (en un proceso independiente de fagosomas) para posteriormente ser degradadas a través de la vía lisosomal. La entosis se ha identificado en líneas tumorales, concretamente en células epiteliales de cáncer de mama MCF7 (Le Bot 2007, Overholtzer, Maillieux et al. 2007). Se ha demostrado la independencia de la apoptosis, ya que ni la sobreexpresión de Bcl-2 ni el tratamiento con inhibidores de caspasas, es capaz de inhibir la entosis.

7.4. Piroptosis: Es un proceso de muerte celular descrito en macrófagos y que implica la activación de la Caspasa-1 y la liberación de interleuquinas IL-1 β e IL-18; ambas citoquinas estarían implicadas en la respuesta inflamatoria. La Piroptosis suele estar inducida por los siguientes patógenos: *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas auriginosa* y *Shigella flexneri*, cuando invaden macrófagos (Brennan and Cookson 2000). En ocasiones macrófagos que sufren de Piroptosis, no solo exhiben características apoptóticas sino también necróticas (Labbe and Saleh 2008).

7.5. Pyronecrosis: Macrófagos infectados por *Shigella flexneri* que presenten una alta carga bacteriana, van a experimentar un tipo de muerte necrótica caracterizada por la liberación de la histona HMGB1, activación de caspasa-1 y de la interleuquina IL-1 β , que se denominaba *Pyronecrosis*. La única

distinción entre *Pyronecrosis* y Piroptosis radica en la temporalidad de activación de caspasa-1. Recientes investigaciones han demostrado que existe activación de la quinasa RIP1 en el proceso de *Pyronecrosis*, lo que lo volvería aún más regulado que la Piroptosis (Martinon, Gaide et al. 2007, Ting, Willingham et al. 2008).

7.6. Paraptosis: En la mayoría de células donde se ha descrito este proceso de muerte no apoptótica, se presentó un alto nivel de expresión del *insulin-like growth factor receptor I*, que se relaciona con una importante vacuolización del citoplasma celular y un hinchazón de las mitocondrias, pero sin que ocurra liberación de factores pro-apoptóticos mitocondriales (Sperandio, de Belle et al. 2000). Ningún fenómeno de Paraptosis descrito hasta el momento, ha podido ser inhibido mediante la sobreexpresión de Bcl-2 o mediante el uso de inhibidores de caspasas; normalmente la cascada de señalización que se dispara suele estar mediada por las quinasas activadas por mitógeno (Sperandio, de Belle et al. 2000). El comité NCCD aún no establece si la Paraptosis es un proceso de muerte en sí o un compendio de características puntuales de muerte.

7.7. Exotoxicidad: Este tipo de muerte celular ocurre en neuronas que presentan altas concentraciones de aminoácidos excitatorios como son el Glutamato. Esto permite la apertura de canales de Ca^{+2} , con lo cual la carga catiónica de Ca^{+2} en el citosol actuaría como señal de letalidad en la célula (Orrenius, Zhivotovsky et al. 2003). Generalmente la exotoxicidad suele solapar o, como suele ocurrir en la mayoría de los casos, desencadenar procesos de apoptosis o necrosis clásicos, generando como evento crítico la pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Por estas razones, el comité NCCD no la considera como una modalidad de muerte celular propiamente dicha (Melino, Bernassola et al. 1997).

INTRODUCCIÓN III: Autofagia

1. Introducción y Concepto

Las células que se encuentran en condiciones fisiológicas óptimas para su crecimiento, requieren de un equilibrio bien controlado entre la síntesis de proteínas y biogénesis de sus orgánulos, en relación con el reciclado o *turnover* tanto de las proteínas como de los orgánulos que las componen. Las principales rutas que se encargan del reciclado de las proteínas celulares, tanto las de larga vida como las que son esenciales en un determinado momento del ciclo vital de la célula, son la Autofagia y la eliminación mediante Proteasoma (Klionsky and Emr 2000). Todas las rutas degradativas de proteínas son importantes a lo largo del desarrollo y en particular bajo ciertos tipos de estrés ambiental o celular. Por ejemplo, cabría destacar el reciclado de proteínas bajo condiciones de carencia nutricional, bajo estrés genotóxico o la reabsorción y remodelado de estructuras celulares completas que ocurre en los tejidos en desarrollo (Mortimore, Miotto et al. 1996, Vittorini, Paradiso et al. 1999). En muchos casos el reciclado o desaparición de células completas está relacionado no con procesos de desarrollo, sino con rutas de muerte celular. Generalmente el reciclado o *turnover* ocurre a una escala subcelular y bajo condiciones muy particulares; quizá la más destacada, por su obviedad, sea la privación nutricional, que va a hacer que las células ante la carencia de fuentes externas proteicas, utilicen las que disponen endógenamente en su citosol, para obtener Aminoácidos necesarios en la síntesis de nuevas estructuras y para el mantenimiento de la homeostasis metabólica (Rabinowitz and White 2010).

La **Autofagia** puede ser definida como un proceso por el cual la célula va a degradar parte de su material intracelular, utilizando para ello un sistema catabólico de secuestro y degradación de dicho material. Se considera como la principal vía de degradación de proteínas de larga vida y orgánulos aberrantes (Klionsky 2007, Rabinowitz and White 2010). Es una ruta que se encuentra muy conservada en todos los organismos eucariotas superiores y está tremendamente regulada (Klionsky 2007). Morfológicamente consiste en el secuestro de porciones citoplasmáticas por vesículas de doble membrana, conocidas como Vacuolas Autofágicas en Mamíferos y Autofagosomas en Levaduras (Kim and Klionsky

2000), que posteriormente van a fusionarse con Lisosomas en el caso de mamíferos y con vacuolas en el caso de levaduras, para que el contenido citosólico, en ellas secuestrado, sea degradado y reciclado.

La autofagia se considera un proceso esencial desde un punto de vista evolutivo y adaptativo, para el correcto mantenimiento de la homeostasis celular; sin embargo son muchos los desórdenes patológicos que se asocian con alteraciones de la ruta autofágica. Considerando a la autofagia como vía de adaptación, supervivencia y de escape frente distintos procesos de muerte celular, es fácil adivinar la gran importancia de tener una ruta autofágica controlada en patologías como el cáncer (Kourtis and Tavernarakis 2009).

2. Morfología del proceso de Autofagia

Desde un punto de vista morfológico el proceso de autofagia es considerado como un proceso tanto de “autocanibalismo” como de “secuestro” y la explicación es bien simple. El término autofagia deriva de las raíces griegas “*auto*” o “a sí mismo” y “*phagos*” o “comer”, por lo que haríamos referencia a un proceso de “comerse a uno mismo”, es decir, es un término aplicable a un tipo específico de autocanibalismo que practican las células en momentos determinados de su ciclo vital. Para llevar a cabo el proceso de autofagia, la célula tiene que tener las herramientas necesarias para apoderarse de determinadas porciones citosólicas y poder degradarlas; de ahí que la autofagia consiste morfológicamente en un secuestro citosólico no solo de moléculas, sino de porciones completas de citoplasma que pueden incluir a orgánulos completos (Meijer and Codogno 2004, Kondo, Kanzawa et al. 2005). El secuestro comenzaría con la formación de una estructura de doble membrana lipídica en la zona del Trans-Golgi que se denomina **Fagóforo** (*Phagophore*) que va a comenzar a envolver al material citoplasmático que será degradado; esta primera etapa se le denomina Etapa de Iniciación o **Nucleación**; una segunda etapa consiste en una **Elongación** del fagóforo para completar el secuestro del material que será degradado y que finalizaría con la etapa de **Fusión** de los dos extremos de la doble membrana para constituir un **Autofagosoma** maduro; en ocasiones la formación de autofagosomas suele coincidir con su fusión con ciertos endosomas cuyo contenido también ha de ser reciclado, en este caso el autofagosoma pasa a llamarse **Anfísoma** y cumplirá el

mismo destino que los autofagosomas. Finalmente los autofagosomas se fusionan con lisosomas celulares, para constituir una estructura denominada **Autolisosoma**, en una etapa de Resolución o **Reciclado**, que finaliza con la acción de las proteasas ácidas lisosomales que actúan sobre el contenido del autofagosoma y el reciclado de todos los componentes secuestrados (Gozuacik and Kimchi 2004, Levine and Klionsky 2004, Checinska and Soengas 2011)(**Figura INT.21**).

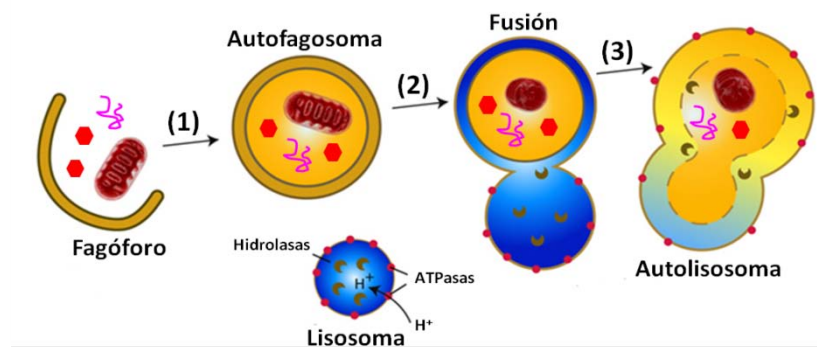


Figura INT.21: Fases de la Autofagia: Formación del Autolisosoma. (1) Etapas de Nucleación y Elongación (2) Etapa de Fusión Lisosomal (3) Etapa de Reciclado.

3. Tipos de Autofagia

A la hora de establecer una clasificación de los procesos de autofagia hay que hacer dos reseñas importantes; una es que son muchos y variados los estímulos que inducen autofagia, la mayoría buscan desencadenar una respuesta en la célula que le permita adaptarse y sobrevivir al estrés desencadenante. Hay desde estímulos fisiológicos como son la carencia de nutrientes en el medio o de oxígeno, hasta patofisiológicos como alteraciones en los sistemas de plegamiento de proteínas, existencia de orgánulos aberrantes o infecciones con agentes patógenos como virus o bacterias (Kuma, Hatano et al. 2004, Nakagawa, Amano et al. 2004). La otra reseña a tener en cuenta es que en función del estímulo, de la intensidad y de la durabilidad del mismo, la autofagia podría ser considerada un proceso de muerte celular, por lo tanto mientras la intensidad con que un estímulo pro-autofágico ataca a una célula, no sea excesivo ni pernicioso, no podremos hablar de muerte por autofagia (Gozaucik and Kimchi 2004, Komatsu, Waguri et al. 2005)(**Figura INT.22**). A continuación detallaré la fina barrera que separa al mecanismo adaptativo del mecanismo de muerte celular.

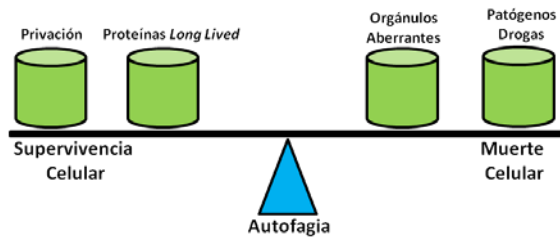


Figura INT.22: Efectos enfrentados de la Autofagia.

Dependiendo del estímulo, su intensidad y durabilidad, la autofagia puede marcar el destino final de una célula hacia la adaptación y supervivencia o hacia la muerte celular.

3.1. Autofagia Adaptativa y de Supervivencia: es aquella que va encaminada a que la célula sobreviva a un tipo de estrés concreto, sin que para ello se autoinfrinja daños irreparables. Es el tipo de proceso que disparan estímulos carenciales, que normalmente son cortos en el tiempo y no demasiado intensos. No solo la carencia tiene características pro-autofágicas, sino que la presencia de algún orgánulo aberrante, proteínas mal plegadas o el ataque de patógenos, activa esta autofagia de supervivencia (Mizushima 2004). Clásicamente en función del tamaño o volumen del material citoplasmático que va a ser secuestrado en los autofagosomas, podemos considerar 3 tipos de autofagia de supervivencia:

3.1.1. Macroautofagia: generalmente referida como Autofagia. Cuando el volumen o masa del componente citosólico (carga autofágica) es grande; por ejemplo una mitocondria aberrante. Es el proceso más estudiado y conocido y en el que centraremos el desarrollo de esta tesis doctoral (Xie and Klionsky 2007).

3.2.1. Microautofagia: cuando el cargo citosólico es incorporado directamente a los lisosomas por invaginación, protusión o septación; por lo tanto no es necesaria la formación de los autofagosomas (Behrends, Sowa et al. 2010).

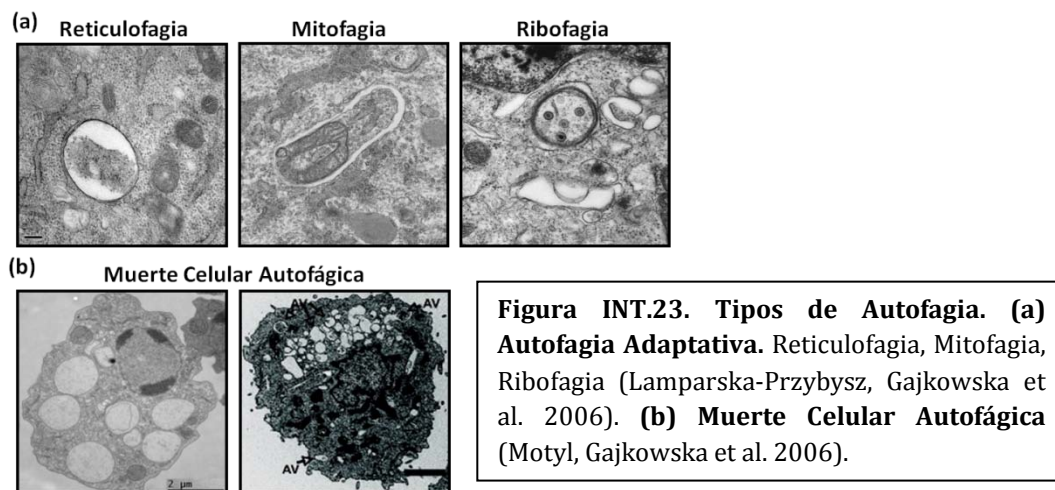
3.3.1. Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA): proceso en el cual se emplean chaperonas como proteínas que permitan la traslocación específica de proteínas citosólicas al interior de los lisosomas (Arias and Cuervo 2011).

Teniendo en cuenta que el proceso de Macroautofagia es el más importante, actualmente se ha subdividido en distintos grupos específicos que hacen referencia al orgánulo en concreto que va a ser degradado; así podemos considerar como proceso de Macroautofagia a: (1) **Mitofagia** o autofagia específica de la Mitocondrias aberrantes resultantes del proceso de fisión o que han alterado profundamente su permeabilidad de membrana; encaminada a evitar que en una posible ruptura de las membranas mitocondriales, se liberen factores proapoptóticos del espacio intermembrana o del lumen mitocondrial (Narendra,

Tanaka et al. 2008, Rambold, Kostecky et al. 2011, Rambold and Lippincott-Schwartz 2011). Incluso se ha propuesto que en situaciones de privación nutricional el origen de las membranas de los Fagóforos no solo lo encontraríamos en el Aparato de Golgi, sino que procedería de mitocondrias que han sido parcialmente digeridas en autofagosomas(Hailey, Rambold et al. 2010) (2) **Peroxisfagia** o autofagia específica de los Peroxisomas; cuando un elevado e innecesario número de peroxisomas son eliminados a través de un sistema autofagosomas(Iwata, Ezaki et al. 2006). (3) **Ribofagia y Reticulofagia** o autofagia específica de los Ribosomas y Retículo Endoplasmático; descritas recientemente en distintas líneas tumorales no solo como procesos de reciclado de orgánulos aberrantes, sino como adaptación al tratamiento farmacológico y drogas que afectan al ensamblaje de ambos orgánulos (Lamparska-Przybysz, Gajkowska et al. 2006, Cebollero, Reggiori et al. 2012)(**Figura INT.23.A**).

3.2. Muerte Celular Autofágica: A pesar de ser un mecanismo de supervivencia y evitar fenómenos apoptóticos como ya se ha dicho anteriormente, (fenómeno de Mitofagia) la autofagia prolongada acarrea muerte celular. El comité NCCD define la Muerte Celular Autofágica o Muerte Celular Programada Tipo II, como aquella que deriva del acúmulo excesivo de autofagosomas, lo cual acarrea la pérdida de gran parte de los componentes citosólicos y por tanto de la viabilidad celular (Kroemer, Galluzzi et al. 2009). Aparte existen otras características morfológicas asociadas a la muerte autofágica: (1) **Nucleares:** a diferencia de la apoptosis los núcleos permanecen intactos hasta los últimos momentos y no se observa fragmentación del ADN (2) **Citoplasmáticas:** gran acumulación no solo de autofagosomas sino también de vacuolas y de autolisosomas, por lo tanto existe un incremento importante de la actividad lisosomal. Además suele producirse una considerable movilización de lípidos en forma de vesículas o *Lipid Droplets*; este fenómeno suele ser muy notable en autofagia inducida por retirada prolongada de nutrientes. Un tercer criterio morfológico es la dilatación que sufrirá el Retículo Endoplasmático y las cisternas del Aparato de Golgi (**Figura INT.23.B**). Todas estas características están recogidas en la tabla comparativa entre apoptosis, necrosis, PARTanatos y autofagia (Klionsky 2007, Klionsky, Abeliovich et al. 2008, Kroemer, Galluzzi et al. 2009)(**Tabla 1**).

El hecho de que la autofagia sea considerada como un proceso de muerte celular, implica que tiene un **Punto de No Retorno**, que como ya definimos anteriormente, es aquél a partir de cual los daños en la célula son tan graves que es incapaz de volver a su estado basal fisiológico, implicando la pérdida total de viabilidad (Gozuacik and Kimchi 2004). En el caso de la autofagia, el punto de no retorno hace referencia al momento en el cual, tal cantidad de material citosólico está siendo señalado para su degradación en los autofagosomas, que aunque las condiciones pro-autofágicas desaparecieran y se volviera a una situación sin estrés, privación o alteración, la célula sería incapaz de reconstituir su citoplasma y alcanzar un estado de homeostasis general; la consecuencia sería la muerte de la célula (**Figura INT.22**).



Actualmente la comunidad científica mantiene desacuerdos en los términos por los cuales se debe nombrar o hacer referencia a la autofagia como muerte celular programada. Gran parte de los investigadores en el área, mencionan la muerte autofágica como tal, es decir, la nombran como Muerte Por Autofagia; sin embargo hay un grupo creciente de autores que hablan de Muerte A Consecuencia de la Autofagia. Las similitudes y diferencias entre ambos términos han llevado a profundas reflexiones pero sin haberse alcanzado aun un consenso. Lo que parece estar claro es que aquéllos que hablan de que las células mueren por autofagia, hacen referencia a que el acúmulo excesivo de autofagosomas y el sobrepasar el punto de no retorno, es suficiente como para causar un colapso metabólico que va a matar a la célula. En contraposición el resto de autores aseguran que muchos de los procesos de muerte celular que ocurren en el organismo, por ejemplo durante

el desarrollo embrionario o durante el mantenimiento tisular, son consecuencia directa de una autofagia selectiva frente a estructuras vitales de la célula, que hace que ésta entre en apoptosis o Necroptosis. En los últimos años el concepto de muerte a consecuencia de la autofagia está siendo más aceptado por la comunidad científica ya que se ha visto como hay interconexión entre autofagia y apoptosis (Allan and Clarke 2009) y como componentes de la ruta necrótica, en concreto la histona HMGB1, regulan la autofagia bajo ciertos estreses celulares (Tang, Kang et al. 2010).

4. Mecanismo Básico de la Macroautofagia

La maquinaria bioquímica que controla y ejecuta la autofagia es extremadamente compleja y se encuentra muy regulada en distintos puntos. El hecho de ser una ruta tan controlada, la relaciona con diversas patologías y desórdenes bioquímicos. Como proceso, la autofagia fue descrita en Levaduras hace aproximadamente 40 años. En estos organismos fue donde se caracterizaron los genes que regulan la ruta, llamados Genes Autofágicos ATGs (*Autophagy Related Genes*) (Nakatogawa, Suzuki et al. 2009, Yang and Klionsky 2010). Hasta la fecha se han descrito 33 genes ATGs que están implicados en la ruta degradativa lisosomal (mamíferos) o vacuolar (levadura) que constituye la autofagia (Inoue and Klionsky 2010). Recientemente en mamíferos se han descrito nuevos intermediarios en la ruta autofágica y se considera que hasta 400 factores distintos pueden regular el proceso (Behrends, Sowa et al. 2010, Lipinski, Hoffman et al. 2010). Teniendo en cuenta toda la bibliografía existente, se puede desglosar cada una de las etapas morfológicas de la autofagia con los distintos componentes reguladores de las mismas.

5. Inicio de la Autofagia: Formación de Autofagosomas

Como se ha mencionado en el apartado anterior, son muchos y muy diversos los estímulos que pueden inducir autofagia en una células, pudiéndose clasificar desde estímulos fisiológicos como la privación, presencia de proteínas mal plegadas o agregados proteicos, hasta estímulos de estrés o patológicos como la existencia de orgánulos aberrantes, presencia de patógenos, pH, presencia de ROS o incluso daños al ADN (Deretic 2008, Chen and Klionsky 2011, Rodriguez-Vargas, Ruiz-Magana et al. 2012). Muchos de los estímulos que desencadenarán la

formación del autofagosoma, ejercen un efecto inicial sobre las proteínas TOR (*Target of Rapamycin*), que tienen sus homólogos mamíferos en mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) (Kroemer, Marino et al. 2010). mTOR es el principal regulador negativo de la autofagia; es considerado como el sensor nutricional de la célula y se encarga de mantener el equilibrio entre la síntesis de proteínas y la degradación controlada de las mismas por autofagia o proteasoma, para obtener sustratos aminoacídicos que se emplearían para el Anabolismo Celular (Chen and Klionsky 2011). Una vez que mTOR está inhibido se pueden activar los sistemas ATGs, concretamente ATG1 en levaduras o su homólogo ULK1 humano para que se inicie la formación del autofagosoma. El proceso que va desde la aparición del estímulo pro-autofágico hasta que mTOR es inhibido y ULK1 es activada (para iniciar la formación del fagóforo), es muy complejo y está controlado por distintas quinasas. En el contexto de un estímulo pro-autofágico fisiológico como es la carencia de nutrientes, la quinasa que controla el proceso es AMPk, que se puede definir como el sensor energético celular. El balance entre la correcta activación de AMPk, la inhibición total de mTOR y el inicio de la formación del autofagosoma a través de núcleo proteico ULK1, es esencial para el desarrollo de la autofagia y va a ser motivo de estudio detallado en los siguientes apartados.

5.1. mTOR

TOR (*target of Rapamycin*) es una Serina/Treonina quinasa (*serine/threonine kinase*) perteneciente a la familia PIKK (*PIKK Family or phosphoinositide 3-kinase (PI3k)-Related kinase Family*) muy conservada a lo largo de la escala evolutiva. Podemos considerarlo como el sensor nutricional de la célula, capaz de regular procesos anabólicos para la obtención de macromoléculas esenciales en el crecimiento celular; esto hace que las quinasas TOR mantengan una estrecha relación con los sensores energéticos celulares representados por las quinasas LKB1 y AMPk (de las cuales se hablará más adelante) y con los procesos catabólicos, como es el caso de la ruta de autofagia. Es la principal proteína-quinasa capaz de regular el crecimiento y la supervivencia celular. Al tratarse de una proteína crucial en la homeostasis celular, TOR (o como nos referiremos en mamíferos mTOR) está implicada en un alto número de condiciones patológicas como son cáncer, obesidad, diabetes tipo II y enfermedades neurodegenerativas (Sabatini 2006, Laplante and Sabatini 2012). Debido a la importancia que tiene en

situaciones fisiológicas y patofisiológicas, mTOR se ha convertido en una diana molecular para un amplio espectro de ensayos farmacológicos (Rosner, Hanneder et al. 2008).

Fue descubierta en los años 90 en levaduras como una quinasa capaz de controlar el crecimiento celular y que presentaba una alta sensibilidad a la inhibición por Rapamicina, que es un macrólido producido por *Streptomyces hygroscopicus* (Cafferkey, Young et al. 1993). En levaduras se identificaron 2 proteínas TOR, denominadas TOR1 y TOR2, ambos sensibles al efecto de la Rapamicina sobre las levaduras (Kunz, Henriquez et al. 1993). Será entre los años 1994 y 1995 cuando se descubra un homólogo mamífero de TOR, al cual se le denominó mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) que también presentaba alta sensibilidad a la inhibición causada por la Rapamicina (Brown, Albers et al. 1994, Sabatini, Erdjument-Bromage et al. 1994, Sabers, Martin et al. 1995). Recientemente se han descubierto compuestos mucho más efectivos que la Rapamicina para la inhibición de la actividad quinasa de mTOR; incluso se ha profundizado tanto en el estudio de mTOR que se han descubierto varias proteínas mTOR, algunas de las cuáles sin inocuas al efecto inhibitorio de la Rapamicina (Martin and Blenis 2002).

5.1.1. Estructura de mTOR: Se han identificado dos complejos mTOR en mamíferos a los que se les denominó mTORC1 y mTORC2 y ambos presentan distinta sensibilidad a la Rapamicina (Kim, Sarbassov et al. 2002, Yip, Murata et al. 2010). Tanto mTORC1 como mTORC2 son complejos multiproteicos formados por un alto número de proteínas, concretamente 6 proteínas constituyen mTORC1 y 7 mTORC2 (Laplante and Sabatini 2012).

Complejo mTORC1

- ❖ **mTOR:** es el centro activo del complejo mTORC1, donde recae la actividad Serina/Treonina quinasa (Sabatini, Erdjument-Bromage et al. 1994).
- ❖ **Raptor:** proteína de andamiaje que regula el correcto ensamblado y localización de mTORC1; además permite la unión del complejo al sustrato de

la quinasa mTOR. Actúa como diana para la Rapamicina (Hara, Maruki et al. 2002, Kim, Sarbassov et al. 2002).

- ❖ **PRAS40:** es un componente inhibidor del complejo. Está enriquecido en residuos de Prolina. (Sancak, Thoreen et al. 2007, Thedieck, Polak et al. 2007, Vander Haar, Lee et al. 2007).
- ❖ **Deptor:** considerado como otra subunidad inhibidora de mTORC1, es una proteína enriquecida en dominios DEP (Peterson, Laplante et al. 2009).
- ❖ **mLST8:** proteína de función desconocida, cuya pérdida no afecta a la actividad de mTORC1. También se la conoce como subunidad β L (Kim, Sarbassov et al. 2003, Jacinto, Loewith et al. 2004)
- ❖ **Complejo Tti1/Tel2:** proteínas de andamiaje que permite el correcto ensamblaje y estabilidad de mTORC1 (Kaizuka, Hara et al. 2010)

Complejo mTORC2

- ❖ **mTOR:** Serina/Treonina quinasa del complejo (Sabatini, Erdjument-Bromage et al. 1994).
- ❖ **Rictor:** proteínas de andamiaje que regula el ensamblaje del complejo y la unión a los sustratos de la quinasa mTOR. Es una unidad semejante al Raptor pero insensible a la Rapamicina (Jacinto, Loewith et al. 2004, Sarbassov, Ali et al. 2004).
- ❖ **mSin1:** proteínas de andamiaje que regula el ensamblaje del complejo y su interacción con SGK1, proteína que se relaciona con desórdenes de infertilidad o epilepsia (Frias, Thoreen et al. 2006, Jacinto, Facchinetti et al. 2006).
- ❖ **Protector 1/2:** proteína que permite que la activación de SGK1 por medio de mTORC2, se incremente (Thedieck, Polak et al. 2007).
- ❖ **Deptor, mLST8, Complejo Tti1/Tel2:** mantienen las mismas funciones que en mTORC1.

5.1.3. Regulación y Funciones de mTORC1: mTORC1 es una quinasa que responde a múltiples factores, destacando la presencia o ausencia de aminoácidos,

factores de crecimiento, oxígeno; y del mismo modo es capaz de regularse a través de ciertos tipos de estreses, estatus energético celular y por la presencia de Rapamicina(Laplante and Sabatini 2012). Es capaz de controlar distintas funciones celulares como son la síntesis de proteínas y de lípidos o los procesos de autofagia (Ma and Blenis 2009)(Figura INT.24). Los niveles de activación de mTORC1 permiten regular de forma coordinada procesos anabólicos y catabólicos al mismo tiempo, con ello se asegura que la célula tenga disponible una adecuada cantidad de energía no solo para la homeostasis general, sino para las funciones básicas de crecimiento y división celular. En este sentido se sabe que mTORC1 es capaz de controlar la progresión del ciclo celular (Ma and Blenis 2009).

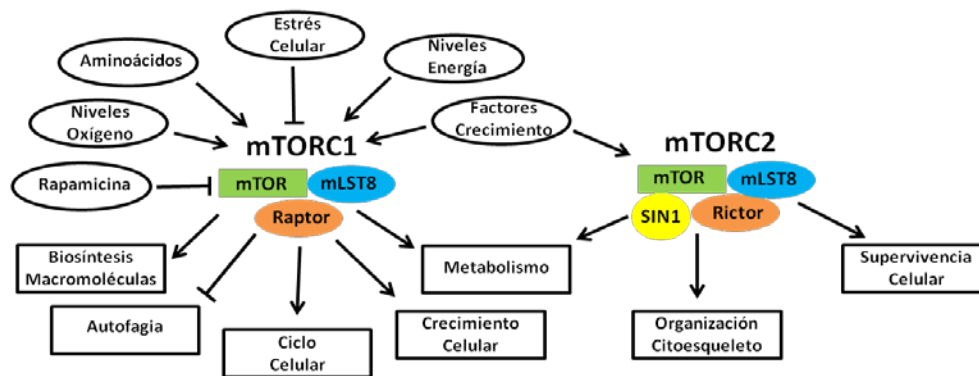


Figura INT.24. Complejos proteicos mTORC1 y mTORC2. Distintos factores que regulan la actividad de ambos complejos. mTORC1 se encarga de modular el crecimiento celular a través de la regulación de procesos anabólicos y catabólicos, además de controlar el ciclo celular. mTORC2 responde básicamente a factores de crecimiento y regula la supervivencia celular, la organización del citoesqueleto y ciertas rutas metabólicas. Adaptado de (Laplante and Sabatini 2012).

5.1.2.1. Regulación de la Síntesis de Proteínas: mTORC1 es una quinasa con un gran número de sustratos, tantos como funciones es capaz de regular. La principal función que se le atribuye al complejo es regular la síntesis de proteínas, por lo tanto ésta es la base para poder modular el crecimiento celular y la biogénesis de distintos orgánulos subcelulares(Sabatini 2006). Los dos sustratos de mTORC1 relacionados con la síntesis de proteínas son 4EBP1 y la quinasa S6k1 (p70^{S6k}).

4EBP1 (*eIF4E binding protein 1*) es una proteína inhibidora del factor de iniciación eIF4E de la síntesis proteica. La fosforilación de mTORC1 sobre 4EBP1 impide que se una a eIF4E y permite que pueda unirse a otro factor de iniciación

llamado eIF4G, de forma que los ARNm pueden comenzar a traducirse (Mamane, Petroulakis et al. 2006, Ma and Blenis 2009).

La quinasa **S6k1** es la responsable de la fosforilación de la proteína S6 que forma parte del ribosoma 40S y está implicada en la traducción de los mensajeros con dominio 5'-TOP, los cuales codifican para la mayoría de proteínas que controlan la síntesis proteica y proteínas ribosomales (Tang, Hornstein et al. 2001). En los últimos años Mamane y colaboradores han descubierto que S6k1 es capaz de modular la activación de otros factores iniciadores de la síntesis de proteínas como son eIF3, eIF4B y eIF4G (Mamane, Petroulakis et al. 2006).

5.1.2.2. Activación por Factores de Crecimiento: La síntesis de factores de crecimiento es tan importante a la hora de mantener unas adecuadas tasas de crecimiento y división celular, como la síntesis de proteínas generales. Para ello se necesita que mTORC1 esté activo y que se promueva la traducción de los ARN mensajeros que codifican para los factores de proliferación y hormonas adecuados (Ma and Blenis 2009). En este proceso son dos las rutas que van a confluir en la regulación de mTORC1; la ruta PI3k-Akt (mecanismo interno de transducción de señales) y la ruta Ras-ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares) (Shaw and Cantley 2006). El proceso por el que ambas rutas estimulan a mTORC1, consiste en la inhibición del complejo supresor de tumores TSC1-TSC2, el cual es un regulador negativo de la actividad de mTORC1 (Hay and Sonenberg 2004). Para que se lleve a cabo esto, Akt, ERK o la quinasa ribosomal S6 deben fosforilar concretamente a la proteína TSC2 del complejo (Hay and Sonenberg 2004).

Cuando Akt es activado a través de receptores tirosín quinasa (RTKs o *Receptor Tyrosine Kinase*) por acción de hormonas o factores de crecimiento, se favorece la fosforilación del lípido de membrana Fosfatidil-inositol-4-5-fosfato o PIP₂ dando lugar a Fosfatidil-inositol-3-4-5-fosfato o PIP₃. La presencia de PIP₃ hace que las quinasas PDK1 (proteína quinasa dependiente de PIP₃) (Walker, Deak et al. 1998) y mTORC2 (Sarbasov, Ali et al. 2004) fosforilen a Akt activándolo. En este mismo instante la proteína supresora de tumores PTEN (fosfatidil-3-4-5-inositol fosfatasa) deja de estar activa y no podrá inhibir a Akt. La activación de Akt conlleva la fosforilación de TSC2, lo que provoca una disociación del complejo

TSC1-TSC2 y hace que TSC1 permanezca inactiva. El resultado es que TSC1 no podrá inhibir a la GTPasa Rheb; manteniéndose activa Rheb se induce activación de mTORC1 (Inoki, Li et al. 2002, Manning, Tee et al. 2002)(Figura INT.25).

5.1.2.3. Inhibición por estrés energético: en contraposición a la acción de las quinasas Akt y ERK, AMPk actuaría como un regulador negativo de la actividad de mTORC1. Dado que AMPk es considerada como la molécula señalizadora de estrés energético intracelular, actuaría como inhibidor directo de la síntesis de proteínas, favoreciendo exclusivamente las vías catabólicas (Sim and Hardie 1988, Inoki, Zhu et al. 2003). Se sabe que para inhibir a mTORC1, AMPk presenta como sustrato a TSC2, pero fosforilándolo en residuos distintos a los de Akt(Inoki, Zhu et al. 2003, Kimura, Tokunaga et al. 2003). El efecto inhibitorio sobre mTORC1 se amplifica debido a que la fosforilación de AMPk sobre TSC2 es reconocida por GSK3 β , de modo que también fosforila en dos residuos distintos a TSC2. La consecuencia es una activación máxima de TSC2 e inactivación total de mTORC1 (Inoki, Ouyang et al. 2006). Recientemente se ha descrito la fosforilación directa de AMPk sobre un componente del complejo mTORC1, concretamente sobre Raptor (**Figura INT.25**)(Gwinn, Shackelford et al. 2008).

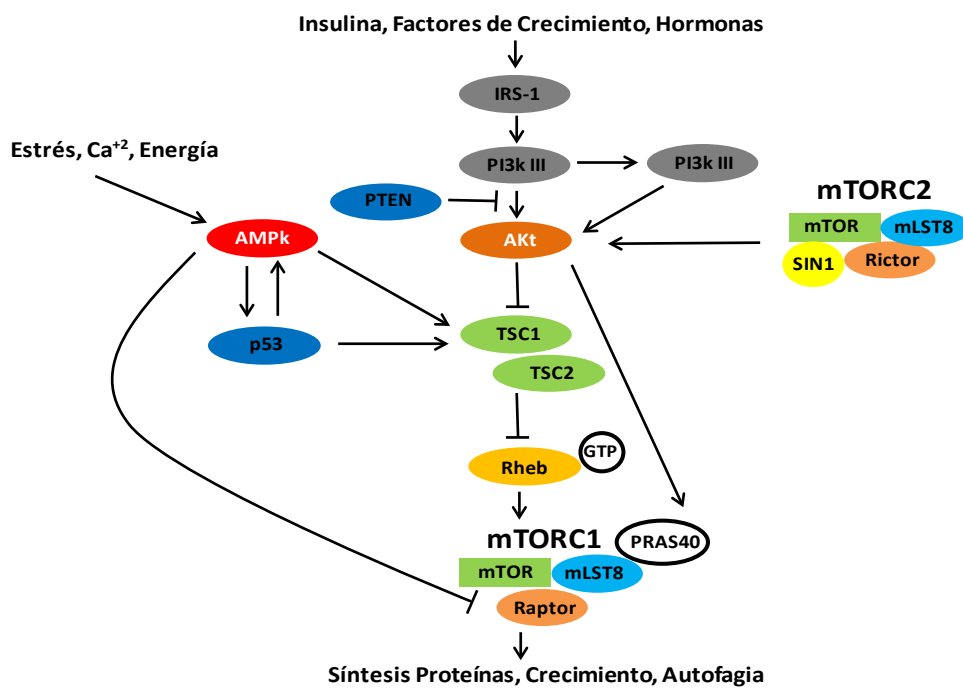


Figura INT.25. Regulación de mTORC1 a través de AMPk y Akt. AMPk actúa como regulador negativo de mTORC1 a través de fosforilación sobre TSC1-TSC2 y por inhibición sobre Raptor. Akt y por conexión mTORC2, regulan positivamente la actividad de mTORC1. Adaptado de (Hartford and Ratain 2007).

Además se sabe que la activación de p53 coopera con AMPk para inducir la inactivación de mTORC1 mediante la inducción de las proteínas Sestrinas 1 y 2, las cuales favorecen la fosforilación de TSC2 por parte de AMPk (Budanov and Karin 2008). p53 también podría inducir el bloqueo de la ruta PI3k-Akt a través de la inducción de la fosfatasa PTEN (que inhibiría a Akt) e induciendo la actividad de la subunidad reguladora β 1 de AMPk, todo ello favorecía la actividad del complejo TSC2-TSC1. Por lo tanto la pérdida o mutación de p53, que ocurre en la mayoría de los tumores, implicaría un incremento de la glucólisis en detrimento de la fosforilación oxidativa, manteniendo por tanto las rutas biosintéticas constitutivamente activas (Feng, Hu et al. 2007).

La interrelación que existe entre los sensores energético y nutricional a la hora de regular el proceso de autofagia es crucial. mTORC1 es considerado como un regulador negativo de la autofagia y su función es antagonista a la que realizaría el sensor energético AMPk. Para llevar a cabo su acción, mTORC1 tendría como sustrato a la quinasa ULK1 (homólogo mamífero de ATG1) que es uno de los componentes más esenciales en la fase de inicio de formación del fagóforo. El mecanismo por el cual mTORC1 y AMPk regulan la autofagia será motivo de estudio en un apartado posterior de esta tesis doctoral.

5.1.1. Regulación y Funciones de mTORC2: Comparada con mTORC1, la ruta de señalización de mTORC2 es mucho menos conocida. Se sabe que este complejo multiproteico es inocuo a la presencia o ausencia de nutrientes y prácticamente no se ve afectado por el macrólido Rapamicina; sin embargo sí que responde a distintos factores de crecimiento y a la presencia de insulina, a través de un mecanismo poco conocido pero que implica la activación de la ruta PI3k. En este novedoso mecanismo se sabe que se necesita de una interacción directa entre mTORC2 y ciertas proteínas ribosomales (Zinzalla, Stracka et al. 2011). mTORC2 es capaz de controlar distintos miembros de la familia de quinasas AGC, donde encontramos a Akt, SGK1 (*serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1*) o la

proteína quinasa α ($PKC-\alpha$). Si tenemos en cuenta que **Akt** puede modular procesos como la supresión de apoptosis, rutas de supervivencia, crecimiento y proliferación celular, mTORC2 jugaría un papel importante en el mantenimiento de la viabilidad celular. En el caso de **GSK1**, se sabe que controla el transporte iónico y el crecimiento celular (Garcia-Martinez and Alessi 2008). Al contrario de lo que ocurre con la actividad de Akt, GSK1 queda totalmente abolida cuando se pierde la actividad mTORC2. La tercera quinasa AGC es **PKC- α** , cuya activación por mTORC2 modula la morfología celular, ya que es capaz de modificar la organización de las actinas en el citoesqueleto y por tanto afectar a la arquitectura celular (Jacinto, Loewith et al. 2004, Sarbassov, Ali et al. 2004)(**Figura INT.24**).

5.2.AMPk

AMPk (quinasa activada por AMP) es una Serina/Treonina quinasa (*serine/threonine kinase*) capaz de fosforilar enzimas que participan en el metabolismo del ATP; igualmente disminuye o incrementa la expresión de ciertos genes involucrados en procesos anabólicos como la Lipogénesis, el metabolismo de la glucosa o la síntesis de proteínas (Hardie 2007). AMPK se encuentra en la mayoría de órganos del cuerpo humano, destacando hígado, músculo, tejido adiposo o corazón, en general órganos que requieren un gran aporte energético (Nielsen, Mustard et al. 2003, Wojtaszewski, MacDonald et al. 2003, Frosig, Jorgensen et al. 2004). Debido a su importancia en el control del metabolismo, AMPk se relaciona con los procesos de regulación de enfermedades metabólicas como Diabetes tipo II asociada a obesidad (Hojlund, Staehr et al. 2003, Hojlund, Mustard et al. 2004) y también con enfermedades cardíacas (Hudson, Pan et al. 2003). En el tejido cerebral juega un papel muy importante regulando el metabolismo de la glucosa y la sensación de apetito (Kahn, Alquier et al. 2005).

5.2.1. Estructura de AMPk: es un complejo proteico heterotrimérico altamente conservado, compuesto por una subunidad catalítica α y 2 subunidades reguladoras β y γ (Gwinn, Shackelford et al. 2008, Mihaylova and Shaw 2011). Existen genes que codifican para ciertas isoformas de las subunidades α y β , concretamente las isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$. Del mismo modo se conocen las isoformas $\gamma 1$ y $\gamma 3$, pertenecientes a la subunidad γ . Existen hasta 12 combinaciones posibles para la formación del complejo AMPk, siendo la

predominante la forma $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (**Figura INT.26.A**). A nivel de la subunidad α presentan cuatro repeticiones en tándem de la secuencia CBS (*crystathionine- β -synthase*), descritas por primera vez por Bateman en 1997 (Bateman 1997), que determinó que se encontraban invariablemente en número par y que formaban estructuras funcionales como dímeros, lo cuales pasarían a llamarse Dominios Bateman; estos dominios van a estar compuestos por dos tándem CBS. Estos dominios Bateman son los responsables de la regulación de AMPk por AMP (Scott, Hawley et al. 2004). La isoforma $\alpha 2$ se encuentra en gran cantidad en el músculo esquelético y en el cardíaco, mientras que en el páncreas predomina la isoforma $\alpha 1$. Las subunidades β poseen ciertos dominios de unión al glicógeno; este dominio es típico de las enzimas Isoamilasas y varias proteínas que tienen unión al almidón. Esta característica estructural a nivel de la subunidad β hace que AMPk se relacione con el metabolismo del glicógeno, realizando, gracias a ello, cambios rápidos en el metabolismo energético celular. Es conocido que los complejos AMPk $\alpha 2$ son más típicos en los núcleos celulares, mientras que los complejos AMPk $\alpha 1$ serían más comunes en el citoplasma (Salt, Celler et al. 1998, Turnley, Stapleton et al. 1999, da Silva Xavier, Leclerc et al. 2000).

5.2.2. Regulación de la actividad de AMPk: es una quinasa que puede regularse alostéricamente por unión del AMP a su subunidad reguladora α (Scott, Hawley et al. 2004). Sin embargo la actividad máxima de AMPk depende de la fosforilación a nivel de su Thr172 (Treonina172 o T172), localizada en el dominio catalítico de AMPk α (Hawley, Davison et al. 1996). Hoy en día se conocen tres quinasas capaces de fosforilar el T172 de AMPk: LKB1, TAK1 y CaMkk β (**Figura INT.26.B**).

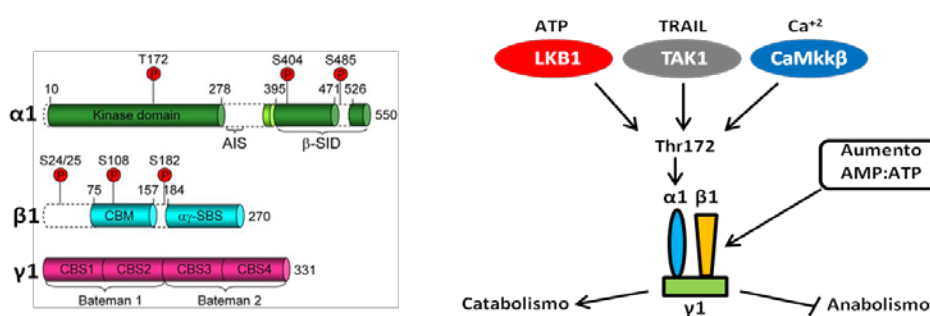


Figura INT.26. (a).Estructura de AMPk $\alpha 1$: Adaptado de Scott, J.W. (Scott, Oakhill et al. 2009). **(b). Regulación de AMPk $\alpha 1$:** fosforilación en el residuo Thr172 y acción directa del AMP sobre la subunidad γ . Consecuencias en el metabolismo celular (Herrero – Martin et al. 2009).

LKB1 (*Liver Kinase-1*): Esta quinasa se compone como un heterotrímero formado por LKB1 y dos proteínas reguladoras llamadas STRAD (*STE20-related adaptor*) y MO25, ambas necesarias para su actividad quinasa (Alessi, Sakamoto et al. 2006). Desde que se descubrió, se pensó en que LKB1 fosforilaba a AMPk previa unión de AMP a la subunidad γ de AMPk (Hawley, Boudeau et al. 2003, Woods, Johnstone et al. 2003), sin embargo se sabe que LKB1 está constitutivamente activa, y la unión de AMP a la subunidad γ lo que impide es la defosforilación (y por tanto inactivación) de PP2C sobre AMPk, aumentando así la activación de AMPk (Sanders, Grondin et al. 2007).

CaMKK β (*calcium/calmodulin-dependent kinase kinase β*): es una quinasa dependiente de Calcio, que activa a AMPK en presencia de un incremento en las concentraciones intracelulares de Calcio (Hawley, Pan et al. 2005, Hurley, Anderson et al. 2005).

TAK1: es un miembro de la familia MAPkkk (*mitogen-activated Protein kinase kinase kinase*) descrita recientemente por Momcilovic en el año 2006. Se identificó como un mediador en la ruta de TGF- β en células de mamífero, por encima de p38 y JNK (Yamaguchi, Shirakabe et al. 1995). Participa en la vía de activación de NF- κ B a través de receptores de citoquinas como TNFR, IL-1R y TLRs (Wang, Deng et al. 2001). Para que se produzca una correcta activación de TAK1, se necesita el estímulo adecuado y que sus proteínas reguladoras TAB1 y TAB2 (*TAK1 binding proteins*) estén unidas a la proteína TAK1, en ese momento TAK1 es capaz de autofosforilarse y activarse (Sanjo, Takeda et al. 2003, Kanayama, Seth et al. 2004). En cuanto a la regulación de TAK1 sobre AMPk, hay que destacar que se ha descrito que el tratamiento de células epiteliales de mama con TRAIL es capaz de inducir activación de AMPk por TAK1 y con ello inducir autofagia (Herrero-Martin, Hoyer-Hansen et al. 2009).

5.2.3. Funciones de AMPk: Cuando se produce un colapso energético en la célula, que suele manifestarse con un desacoplamiento entre los niveles de ATP y AMP, se activa AMPk. Como sensor energético celular tiene la función de inhibir las rutas anabólicas que consumen energía e inducir las rutas catabólicas para restaurar los niveles de ATP, es decir, intentar mantener la homeostasis energética en la célula. Para realizar esta función, AMPk pone en marcha distintas estrategias:

Inhibir la síntesis de ácidos grasos y colesterol: se sabe que AMPK es capaz de fosforilar dos enzimas claves en el metabolismo lipídico: HMGCR (Hidroximetil Glutarato CoA Reductasa) con lo cual consigue inhibir la síntesis de colesterol, y ACC (Acetil CoA Carboxilasa) con lo cual inhibe la síntesis de Malonil-CoA a partir de Acetil-CoA, primera reacción en la síntesis de ácidos grasos (Carling, Zammit et al. 1987). Además inhibiendo la síntesis de Malonil-CoA, también se favorece la importación de ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria para ser degradados.

Inhibición de la síntesis de proteínas: AMPk es capaz de regular negativamente a mTORC1, mediante la fosforilación de la proteína TSC2 (Inoki, Li et al. 2003, Inoki, Zhu et al. 2003) y RAPTOR (Gwinn, Shackelford et al. 2008), tal y como ya se ha explicado anteriormente. En el siguiente apartado de la tesis, desarrollaremos con más detenimiento la regulación de AMPk sobre mTOR y el proceso de autofagia en un contexto de privación de nutrientes o estrés energético.

Control del ciclo celular: AMPk es capaz de fosforilar a p53, activando así la vía p53/p21 de control del ciclo celular (Imamura, Ogura et al. 2001), induciendo una parada en la fase G1 del ciclo. Además se sabe que p53 coopera con AMPk para inducir la inactivación de mTORC1, tal y como ya he explicado en el apartado de regulación de mTORC1 por estrés energético.

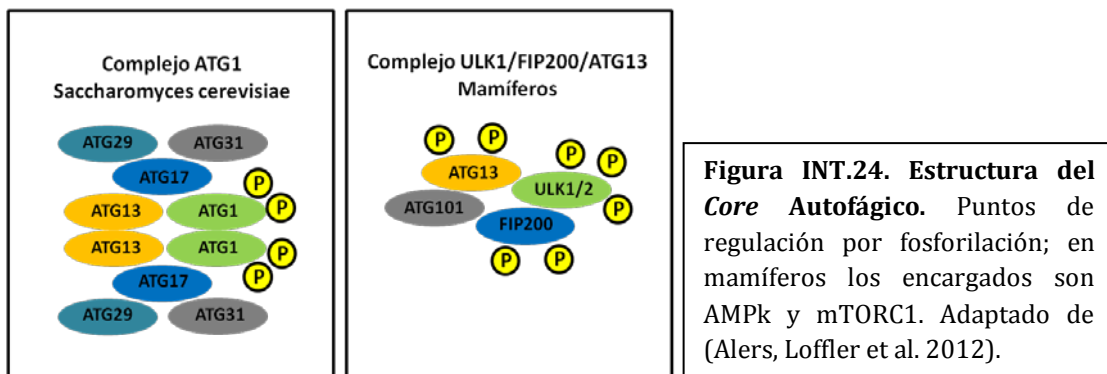
5.3. Control de la Autofagia a través de AMPk/mTORC1/ULK1

Como ya se ha mencionado anteriormente, la privación de nutrientes (*starvation*) es el estímulo pro-autofágico más fisiológico que existe y sobre el que desarrollaré fundamentalmente el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral y el que se va utilizar para explicar la regulación que sufren las quinasas AMPk y mTORC1 durante la inducción de autofagia.

Cuando desaparecen los nutrientes disponibles del medio extracelular se crea una situación de carencia en la célula, que viene marcada por la ausencia de biomoléculas, para la obtención de energía en forma de ATP y de precursores que mantengan activo el Anabolismo. En este momento la situación celular debe cambiar, de forma que se intente obtener energía a partir de las reservas existentes o a partir de estructuras, que bajo estas circunstancias, se vuelven

menos imprescindibles para la célula. Para ello se necesita reprimir el anabolismo y potenciar el catabolismo, lo que se consigue activando AMPk e inhibiendo mTORC1. El resultado será la inducción de la autofagia como mecanismo de supervivencia y adaptación al estrés energético y nutricional.

Una de las primeras proteínas ATGs que se descubrieron en levaduras, concretamente en *Saccharomyces cerevisiae*, fue ATG1 (originalmente conocida como APG1) (Tsukada and Ohsumi 1993). ATG1 es una quinasa que actúa formando un complejo con ATG13 y ATG17 para constituir el primer núcleo o *core* a partir de cual originar el autofagosoma. Sin embargo en los últimos años se ha descrito que el núcleo autofágico en levaduras consta de más proteínas que directamente interaccionan con ATG17, son ATG29 y ATG31 (**Figura INT.27**) (Nakatogawa, Suzuki et al. 2009). En células de mamíferos se han identificado dos ortólogos de ATG1, conocidos como ULK1 y ULK2 (*UNC-51-like kinases 1 and 2*) (Mizushima 2010). Del mismo modo se han caracterizado ortólogos para las proteínas ATG13 y ATG17, llamadas mATG13 y FIP200 (Ganley, Lam du et al. 2009, Itakura and Mizushima 2010). En el complejo además se localiza una cuarta proteína de ensamblaje que denominaremos ATG101 (Jung, Jun et al. 2009) (**Figura INT.27**).



Como ya hemos mencionado anteriormente, tanto AMPk como mTORC1 van a interactuar física y funcionalmente con el núcleo autofágico ULK1-mATG13-FIP200. El proceso de regulación de ambas quinasas dependerá del estatus energético y nutricional de la célula. mTORC1 en condiciones basales y normales de crecimiento celular se encuentra asociado al complejo ULK1-mATG13-FIP200 y lo fosforila directamente en dos de sus componentes, mATG13 y ULK1, en este momento ULK1 es capaz de fosforilarse a sí mismo, incrementando el efecto

inhibitorio de mTORC1. En condiciones basales se sabe que incluso Akt podría fosforilar a ULK1, favoreciendo que la autofagia esté inhibida y de este modo favorecer la síntesis de proteínas. Cuando se produce una carencia nutricional y un estrés energético, AMPk a través de la quinasa LKB1, se activa e inhibe a mTORC1, a través de la vías de TSC1-TSC2 descrita anteriormente o por fosforilación directa sobre Raptor (Inoki, Li et al. 2003, Inoki, Zhu et al. 2003) y RAPTOR (Gwinn, Shackelford et al. 2008) . La consecuencia es una inhibición completa del mTORC1 y su separación del sistema ULK1-mATG13-FIP200 (Roach 2011). Finalmente para activar el proceso de autofagia, AMPk va a unirse a ULK1 y lo fosforilará(Bach, Larance et al. 2011, Kim, Kundu et al. 2011) , la consecuencia directa es que ULK1 fosforilada actuará como quinasa de mATG13 y FIP200 y el proceso de autofagia comenzará (Mao and Klionsky 2011). ULK1 va a ser capaz de fosforilar y modular negativamente tanto a su regulador negativo (mTORC1) (Dunlop, Hunt et al. 2011) como al positivo (AMPk) (Loffler, Alers et al. 2011), de modo que se produce un *feedback* negativo entre las tres proteínas (**Figura INT.28**).

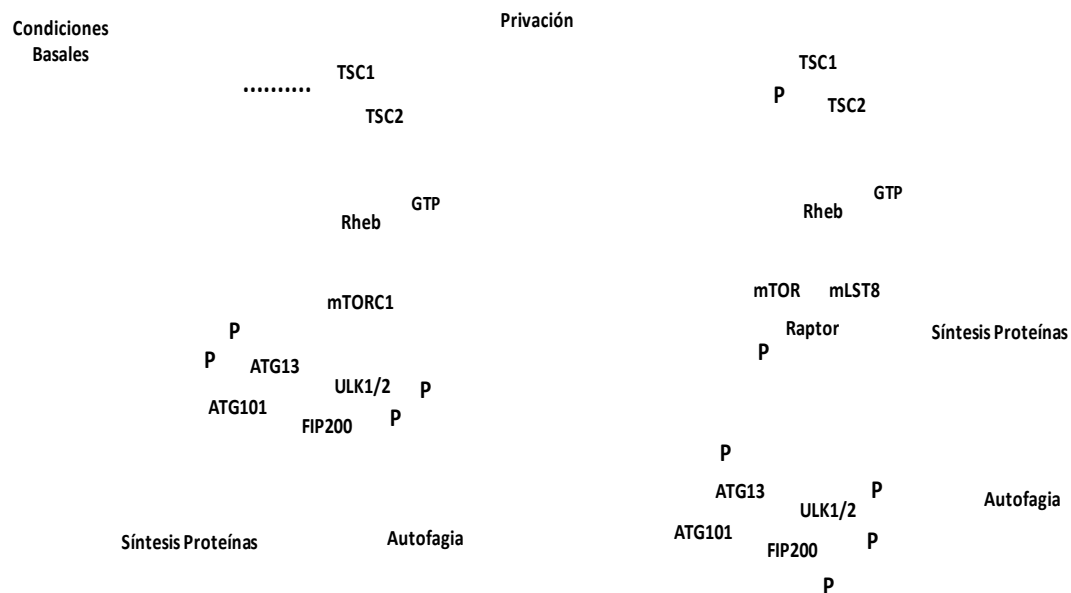


Figura INT.28. Regulación del complejo ULK1/FIP200/ATG13. Durante condiciones ricas en nutrientes, mTORC1 fosforila a ULK1 y ATG13 inhibiendo autofagia (**Amarillo**). Bajo estas condiciones los niveles óptimos de energía mantienen inactiva a AMPk. Durante privación de nutrientes y depleción energética, AMPk que desactiva a mTORC1 a través de TSC1/TSC2 y Raptor (**Azul**); en este momento mTORC1 se separa del complejo ULK1. AMPk se une a ULK1 y lo fosforila (**Azul**), entonces la actividad quinasa de ULK1 fosforila a FIP200 y ATG13 (**Verde**) y el complejo queda activo para comenzar la síntesis del autofagosoma. Adaptado de (Mao and Klionsky 2011).

6. Nucleación de los Autofagosomas

Una vez que el *core* está activo comienza la formación de la membrana del fagóforo. Existe discrepancia de cuál es el origen de la doble membrana lipídica que generará el autofagosoma; clásicamente se ha localizado el punto de inicio en la zona del Trans-Golgi o cerca del Retículo Endoplasmático, aunque también se considera que las mitocondrias aberrantes o incluso la membrana plasmática son fuentes de pequeñas porciones de membrana que originarían el fagóforo (Longatti, Orsi et al. 2010). Los eventos más tempranos incluyen la formación de PIP₃ (en la zona donde se activó el complejo ULK1-mATG13-FIP200), que se asociará con el efector fosfolipídico WIPI-1/2, todo este proceso va a estar modulado por la PI3k de clase III, renombradas para dicha función como VSP34. A VSP34 se le unen Beclin-1 y VSP15, formando un macrocomplejo que va a estar regulado positivamente por las proteínas AMBRA1, ATG14, UVRAG y EXO84 e inhibido por las proteínas antiapoptóticas BCL-2 y BCL_{xL} y por RUBICON (Mizushima 2007, Matsunaga, Saitoh et al. 2009, Bodemann, Orvedahl et al. 2011)(Figura INT.29).

7. Elongación de la Membrana de los Autofagosomas

En levaduras esta etapa la realizan dos sistemas de conjugación similares a las ubiquitinas (*ubiquitin-like conjugation System*) que son ATG8 y ATG12 (Geng and Klionsky 2008). ATG8 debe ser proteolizado por las proteasa ATG4, volviéndolo accesible a Fosfatidil Etanolamina (PE); al mismo tiempo ATG12 se conjugará con otras ATGs como ATG5, ATG16 o ATG7, en una reacción E2 similar al proceso de Ubiquitinización (Inoue and Klionsky 2010). Este sistema basado en dos etapas de ubiquitinas también se ha identificado en mamíferos, aunque no está totalmente caracterizado. Se obtuvo el homólogo de ATG8, llamado LC3, el cual presenta dos isoformas. LC3-I o forma citosólica, la cual tras proteolizarse por ATG4 y lipidarse con PE o Fosfatidil Etanolamina, pasa a llamarse LC3-II o forma localizada en la superficie del autofagosoma. Recientes estudios han demostrado la existencia de 7 homólogos de LC3 (LC3A, LC3B, LC3C, GATE-16/GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 y GABARAPL3) pero no está claro cuál es su mecanismo de acción durante la fase de elongación (Chen and Klionsky 2011) . La conversión de LC3-I o LC3A a LC3-II o LC3B es el principal marcador bioquímico de inducción de autofagia utilizado en investigación (Figura INT.29).

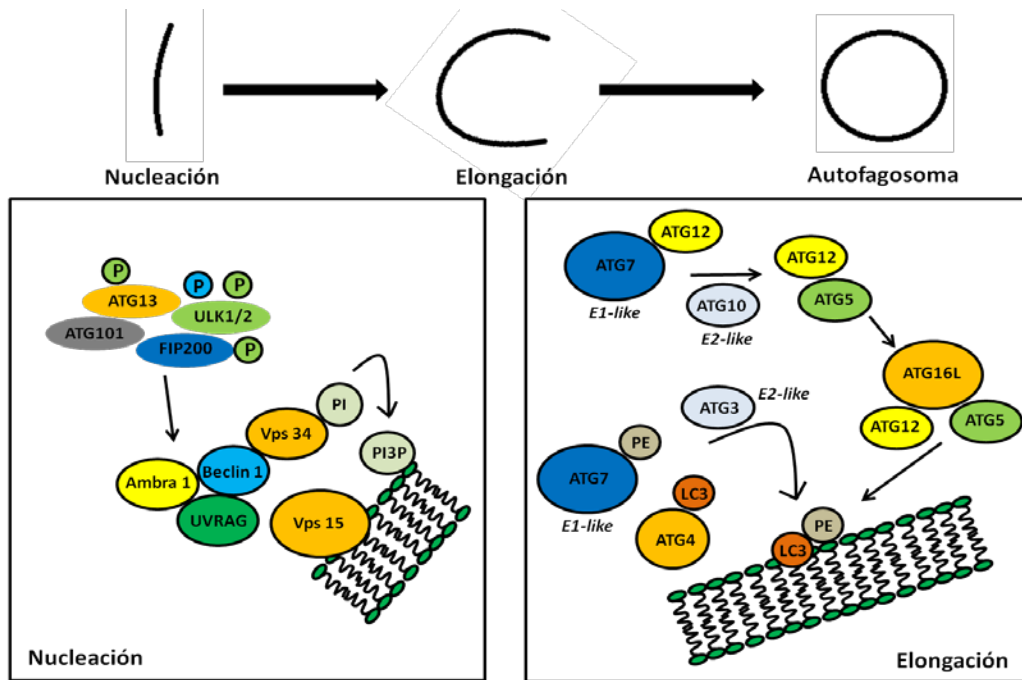


Figura INT.29. Fases de Nucleación o formación del fagóforo y de Elongación de la membrana lipídica del autofagosoma. Proteínas implicadas. Adaptado de (Cecconi and Levine 2008).

8. Fusión de Lisosomas y Autofagosomas

Para la fusión de ambas vesículas se necesita de la acción de microtúbulos, se lleva a cabo gracias a la acción de los motores de Dineina, que permiten que ambas estructuras se encuentren. El proceso puede desarrollarse según un modelo *Kiss and Run* según el cual la fusión completa de ambas membranas conlleva el reconocimiento de proteínas de superficie para la posterior fusión de las membranas. La membrana resultante es una mezcla de las membranas de lisosomas y vesículas autofágicas (Jahreiss, Menzies et al. 2008, Burman and Ktistakis 2010). Las principales proteínas de membrana que regulan la fusión son LAMP1 y LAMP2 en la superficie lisosomal y la GTPasa RAB7 (Gutierrez, Munafo et al. 2004).

9. Degradación y Reciclado

La etapa final consiste en una degradación del material citosólico secuestrado por la proteasas ácidas lisosomales, con ello se consiguen precursores moleculares esenciales para obtener energía o sintetizar biomoléculas. Finalizado el proceso de autofagia, la mayoría de proteínas ATGs deben ser recicladas de la superficie de los autolisosomas para reutilizarlas. En levaduras, el reciclado lo

realiza ATG9 y está regulado por ATG2, ATG18, ATG23 y ATG27 (Reggiori, Tucker et al. 2004, Legakis, Yen et al. 2007). En células humanas el proceso aún no está caracterizado aunque se ha descubierto un homólogo de ATG18, la proteína WIPI-1/2, la cual es capaz de regular tanto la etapa de Nucleación como la de Reciclado. Recientes estudios han demostrado como ciertas isoformas de LC3, que se localizarían en la membrana interna del autofagosoma van a ser degradadas junto con el material citosólico.

10. Autofagia y Cáncer

Existe mucha controversia acerca de cuál es la función exacta que puede desempeñar el proceso de autofagia en los procesos de tumorigénesis, metástasis y adaptación al nuevo *nicho* en el que se instalan las células metastásicas. Teniendo en cuenta que la autofagia representa tanto un mecanismo de adaptación y supervivencia como un proceso de muerte celular controlada, existen multitud de evidencias que apoyan la idea de una “doble cara” del proceso de autofagia en el desarrollo de un tumor, tanto como mecanismo de supresión de tumores como de potenciación del cáncer (Lum, DeBerardinis et al. 2005, Mathew, Karantza-Wadsworth et al. 2007).

10.1. La Autofagia inhibe la tumorigénesis: Tanto la Autofagia como el sistema de degradación por Proteasoma y Ubiquitinización, son esenciales en el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que se encargan de degradar excesos proteicos, orgánulos aberrantes, proteínas mal plegadas, etcétera. Así, está constatado que un defecto en el proceso de autofagia, vuelve propensa a la célula a volverse tumorogénica. Es conocido que ratones *knockout* para los genes *atg5* y *atg7*, son propensos a desarrollar importantes fallos motores y se vuelven propensos a sufrir distintos tipos de tumores (Hara, Nakamura et al. 2006, Komatsu, Waguri et al. 2006). La principal causa es que una deficiencia en la autofagia causa una acumulación de cuerpos de inclusión en el citoplasma, lo que hace que se acumulen agregados proteicos que podrían dar lugar a la aparición de proteínas aberrantes.

El principal hecho que confirmó a la autofagia como proceso supresor de tumores se describió en 1999 por Liang y colaboradores (Liang, Jackson et al. 1999), que descubrieron que la proteína Beclina-1 estaba muy poco expresada en

células de carcinoma epitelial de mama en comparación con tejidos sanos normales. Para confirmar el papel de beclina-1 y la autofagia como mecanismo supresor de tumores, Yue y colaboradores en el año 2003, describieron que ratones *Beclin-1*^{-/-} tenían una alta tasa de mortalidad durante la embriogénesis y que los animales heterocigóticos *Beclin-1*^{+/-} eran muy propensos a sufrir multitud de tumores (Yue, Jin et al. 2003) e incluso muy sensibles a sufrir lesiones premalignas derivadas de infecciones del virus de la Hepatitis B (Qu, Yu et al. 2003).

Actualmente el campo ha avanzado mucho más y por ejemplo se sabe que animales *atg4*^{-/-} tienen mucha susceptibilidad al desarrollo de fibrosarcomas (Marino, Salvador-Montoliu et al. 2007), la deficiencia en ATG5 aumenta el grado de malignización de las células NK (*natural killers*) (Iqbal, Kucuk et al. 2009), incluso se ha demostrado que el factor bif-1 (*Bax Interacting Factor 1*) que regula tanto la apoptosis (a nivel de Bax) como la autofagia (en la etapa de elongación del fagóforo a nivel de ATG4) se relaciona con los procesos que generan tumores malignos (Coppola, Khalil et al. 2008).

10.2. La Autofagia promueve la supervivencia tumoral: Durante los procesos de metástasis las células tumorales tienen que enfrentarse a nuevos nichos donde no siempre las condiciones son óptimas para el crecimiento. De esta manera, la carencia de oxígeno y la disponibilidad de nutrientes llevan a las células tumorales a desarrollar una serie de estrategias de adaptación y supervivencia. En este sentido, procesos como la vasculogénesis, adaptación a hipoxia y autofagia, son utilizados como mecanismos de resistencia celular. Así por ejemplo es conocido que las células tumorales ante diversos estreses tienden a mantener inhibidas las rutas apoptóticas y constitutivamente activadas las autofágicas (Degenhardt, Mathew et al. 2006). Está constatado que ante situaciones estresantes de nutrientes, oxígeno o daños derivados de quimioterapia, las células tumorales sufren Macro y Microautofagia, manifestándose fenómenos de Mitofagia o Reticulofagia selectivas (Jin and White 2007).

La autofagia es capaz de conferir tolerancia a tratamientos antitumorales, tanto quimioterapia, radioterapia, inhibidores de proteínas tirosín quinasa, anticuerpos específicos, etcétera. La autofagia que se induce facilita el incremento

de las reservas energéticas y promueva la supervivencia de la célula tumoral, lo que confiere una gran resistencia a la célula frente a la terapia antitumoral. También hay que tener en cuenta que los inhibidores químicos de la autofagia, están siendo utilizados, incluso en ensayos clínicos muy avanzados, como compuestos potenciadores del efecto antitumoral de ciertas drogas. Así por ejemplo la Hidroxi-Cloroquina (HCQ), la 3-Metil-Adenina (3-MA) o la Bafilomicina A (BA) facilitan la re-sensibilización de las células tumorales resistentes en ensayos *in vivo*. Esto ha llevado a que toda una nueva generación de compuestos inhibidores de la autofagia están siendo desarrollados en este sentido (Chen, Rehman et al. 2010)(Figura INT.30).

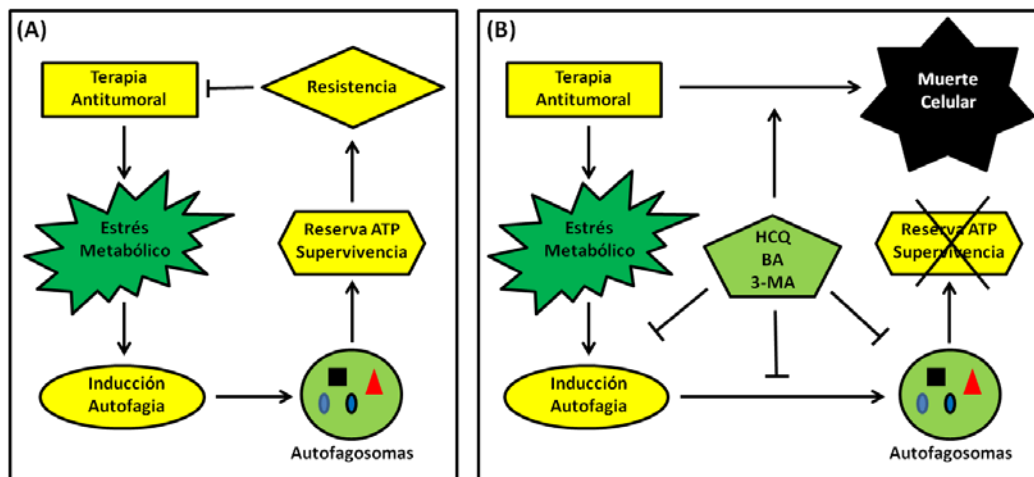


Figura INT.30. Doble Cara de la autofagia en cáncer. (A) Autofagia confiere resistencia a las terapias antitumorales. **(B)** Los inhibidores de la autofagia facilitan la re-sensibilización a la terapia antitumoral. Adaptado de (Chen and Zhang 2010).

INTRODUCCIÓN IV: Material Anexo

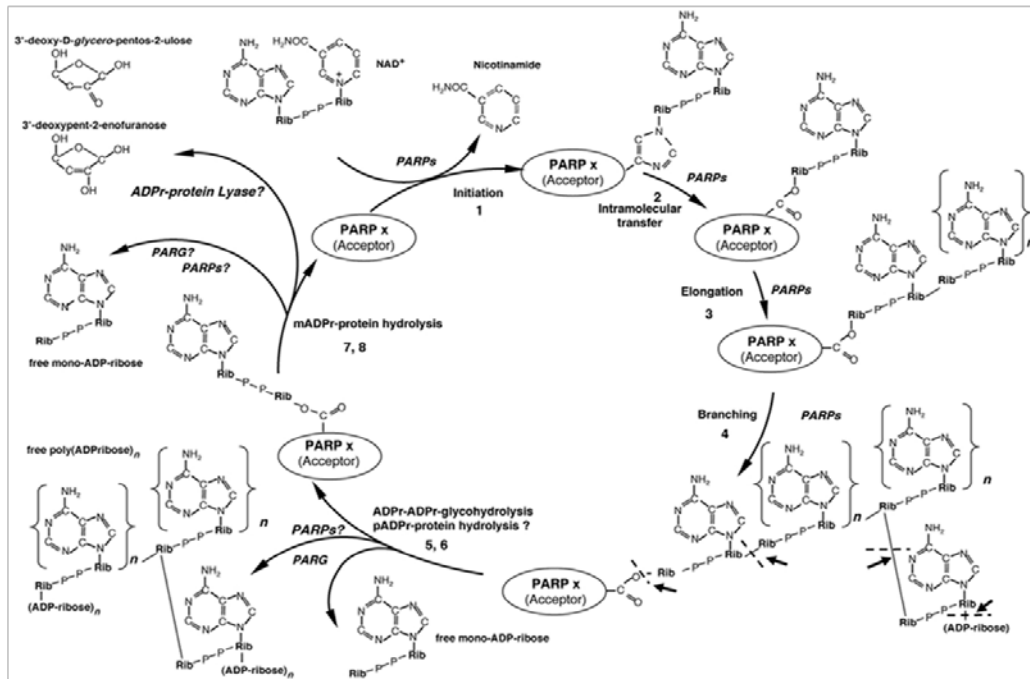


Figura Anexa 1: Ciclo completo de la Reacción de Poli (ADP-Ribosilación): Las fases 1 a 4 representan las reacciones anabólicas, mientras que las fases 4 a la 8 el catabolismo del polímero de ADP-Ribosa. La síntesis de Poli ADP-Ribosa requiere 3 actividades PARP distintas: (1) Iniciación o Mono ADP-Ribosilación de residuos específicos de Histidina (2) transferencia a un residuo de Glutámico o Aspártico en el enzima PARP correspondiente que actuaría como primer aceptor (3) elongación del polímero de ADP-Ribosa (4) ramificación del polímero PAR. La degradación requiere a su vez 4 actividades PARG o ARHs : (5) actividad exoglicohidrolasa y endoglicohidrolasa de PARG que propicia la ruptura de los enlaces que mantienen unidos a las unidades de ADP-Ribosa (6) distintas actividades Poli ADP-Ribosil Hidrolasas y (7) actividad Mono ADP-Ribosil Hidrolasa u (8) actividad Mono ADP-Ribosil Liasa (Hassa and Hottiger 2008).

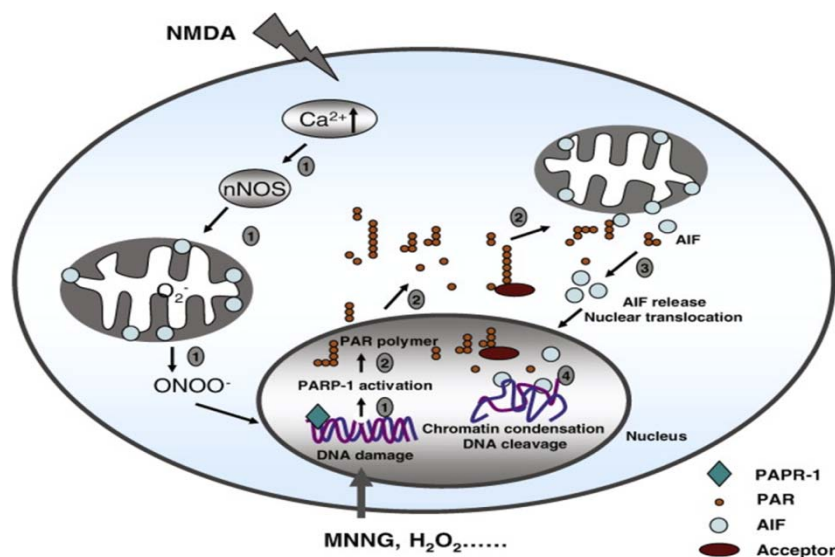


Figura Anexa 2: Modelo esquemático de la muerte mediada por polímero PAR o PARthanatos: (1) Durante el daño al ADN, por ejemplo por agentes genotóxicos tipo NMDA o MNNG, se produce activación de PARP-1. Además se sabe que la activación exotóxica de la ruta por NMDA induce a la formación de influjo de Calcio, activación de nNOS, producción de NO (óxido nítrico) y generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). La reacción entre NO y el anión superóxido generan peroxinitritos tremendamente oxidantes que generarán los daños al ADN. **(2)** La activación de PARP-1 genera formación de polímero PAR; pequeños fragmentos de PAR pueden migrar desde el núcleo al citosol, en dirección a la mitocondria. **(3)** PAR media en la liberación de AIF y su traslocación al núcleo. **(4)** AIF causa condensación de la cromatina y una amplia fragmentación del ADN a través de un mecanismo que aún no se conoce con exactitud (Wang, Dawson et al. 2009).

Familia PARP	Nombre Alternativo	Nombre Transferasa	Subclase	Aa	Localización Subcelular	Motivo Triada	Actividad Enzimática	Dominios y Motivos Funcionales
PARP1		ARTD1	ADN Dependiente	1.014	Nuclear	H-Y-E	P and B	WGR, zinc-fingers y BRCT
PARP2		ARTD2	ADN Dependiente	570	Nuclear	H-Y-E	P and B	WGR
PARP3		ARTD3	ADN Dependiente	540	Nuclear	H-Y-E	M (P supuesta)	WGR
PARP4		vPARP	ARTD4	1.724	Citosólica (vault particle)	H-Y-E	P (supuesta)	BRCT
PARP5A	Tanquirasa 1 y PARP5	ARTD5	Tanquirasa 1	1.327	Nuclear y citosólica	H-Y-E	P y O	Ankyrin repetido
PARP5B	Tanquirasa 2 y PARP6	ARTD6	Tanquirasa 2	1.166	Nuclear y citosólica	H-Y-E	P y O	Ankyrin repetido
PARP6	ARTD17				ND	H-Y-Y	M (supuesta)	
PARP7	TIPARP RM1	ARTD14	CCCH PARP	657	ND	H-Y-I	M (supuesta)	Zinc-fingers y WWE
PARP8	ARTD16			854	ND	H-Y-I	M (supuesta)	
PARP9	BAL1	ARTD9	macroPARP	854	ND	Q-Y-T	M (supuesta)	Macrodominio
PARP10		ARTD10		1.025	Nuclear y citosólica	H-Y-I	M	
PARP11		ARTD11		331	ND	H-Y-I	M (supuesta)	WWE
PARP12	ZC3HDC1	ARTD12	CCCH PARP	701	Citosólica (stress granules)	H-Y-I	M (supuesta)	Zinc-fingers y WWE
PARP13	ZC3HAV1 ZAP1	ARTD13	CCCH PARP	902	Citosólica (stress granules)	H-Y-V	M (supuesta)	Zinc-fingers y WWE
PARP14	BAL2 COAST6	ARTD8	macroPARP	1.801	Citosólica (stress granules)	H-Y-L	M	Macrodominio y WWE
PARP15	BAL3	ARTD7	macroPARP	444	Citosólica (stress granules)	H-Y-L	M (supuesta)	Macrodominio
PARP16		ARTD15		630	ND	H-Y-I	M (supuesta)	

Tabla Anexa 1: Organización y Actividad Enzimática los miembros de la Familia PARP:

En la siguiente tabla quedan recogidos los nombres clásicos para cada miembro como Poli (ADP-Ribosa) Polimerasas, además de los nombres alternativos, basados en la revisión de la familia realizada por Hottiger y colaboradores (Hottiger, Hassa et al. 2010). El tamaño de cada proteína, referido al contenido de Aminoácidos, en todos los casos es para la forma humana de cada miembro. La actividad enzimática conocida o que se le supone a cada miembro, se menciona como mono- (M), oligo- (O) y poli ADP-Ribosilación (P), además de la capacidad de formar ramificaciones en los polímeros de ADP-Ribosa o *Branching* (B). Todos los miembros de la familia contienen el dominio PARP o la "firma PARP" (Gibson and Kraus 2012).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La célula requiere una regulación muy eficaz de la respuesta a estrés nutricional para el mantenimiento de su homeostasis y viabilidad. Esta regulación pasa por el control estricto de las rutas que requieren energía. El enzima PARP-1 es necesaria para hacer frente al estrés genotóxico y su sobreactivación da lugar a una depleción energética que puede tener consecuencias fatales para la célula. Dada la importante función de PARP-1 en el mantenimiento de la carga energética celular durante situaciones de estrés, su modulación podría ser necesaria para responder a situaciones que llevan a la célula a iniciar el mecanismo de autofagia; además su capacidad para modificar covalentemente por Poli(ADP-ribosil)ación, podría jugar un papel en la señalización de distintas fases de la autofagia.

OBJETIVOS

Para analizar el papel de PARP-1 en el desarrollo de la autofagia, planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar las consecuencias de la inhibición de PARP o de su eliminación (utilizando células *parp-1*^{-/-} o silenciadas para PARP-1) sobre la capacidad de inducción de autofagia tras privación de nutrientes en fibroblastos murinos y en células tumorales de mama MCF7.
2. Estudio detallado de los mecanismos de activación de PARP-1 durante la inducción de autofagia, incluyendo generación de especies reactivas de oxígeno, y producción de daños en el ADN.
3. Análisis de las modificaciones en el eje principal de activación de autofagia en respuesta a retirada de nutrientes, AMPK/mTORC1, inducidas por la inhibición de PARP o silenciamiento de PARP-1.
4. Analizar las consecuencias de la perturbación en los niveles de Poli(ADP-Ribosa) (PAR) sobre la autofagia a través del silenciamiento del enzima Poli(ADP-Ribosa)Glicohidrolasa (PARG).
5. Estudio detallado de la interacción de PARP-1 con componentes de la ruta autofágica, especialmente AMPk y mTORC1.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos Celulares

Para la realización de esta tesis doctoral se han utilizado varias líneas celulares humanas y murinas. Concretamente se ha trabajado con tres líneas de Fibroblastos Murinos Embrionarios Inmortalizados (MEFs 3T3); dos de ellas obtenidas a partir de ratones de fondo genético C57BL/6 que expresan PARP-1 que pasamos a denominar *parp-1^{+/+}* MEFs o línea *WildType* para PARP-1, así como células deficientes en dicha proteína, generadas por recombinación homóloga del exón 4 en el laboratorio de Gilbert de Murcia (CNRS, Estrasburgo; Francia) (de Murcia, Niedergang et al. 1997) llamadas *parp-1^{-/-}* MEFs o *Knockout* para PARP-1. La tercera línea celular MEFs 3T3 presenta una doble deficiencia en proteínas apoptóticas Bax y Bak y fueron proporcionadas por el laboratorio de la doctora Cristina Muñoz Pinedo (IDIBELL, Barcelona; España) llamadas *Bax^{-/-}Bak^{-/-}* GFPLC3 MEFs. Estas células se encuentran transfectadas establemente con el plásmido GFPLC3, esencial para el estudio de los procesos de autofagia. Las tres líneas se cultivaron en medio de cultivo DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle's Medium* Gibco, Invitrogen) enriquecido en Glucosa 1g/L y en L-Glutamina y suplementado con Suero Bovino Fetal, previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos, o FBSi (Gibco, Invitrogen) en una proporción del 10% y teniendo como antibiótico la Gentamicina en concentración 50 µg/ml. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

Por otra parte el trabajo también se fundamenta en el uso de la línea tumoral epitelial de cáncer de mama MCF7 GFPLC3, proporcionada por el laboratorio de Marja Jaattela (*Danish Cancer Society, Copenhagen*; Dinamarca) que se encuentra establemente transfectada con el plásmido GFPLC3 necesario para todos los estudios de autofagia que a continuación se detalla. La línea MCF7 GFPLC3 se cultivó en medio RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco, Invitrogen) suplementado con FBSi en proporción del 6%.

Además se han usado líneas celulares humanas de distintos tipos de tumores sólidos para confirmar los resultados y la reproducibilidad de los mismos en distintos tipos de tumores:

Células de melanoma humano g361 y HT144 (estas últimas deficientes en la proteína ATM) cultivadas en DMEM enriquecido en Glucosa 1g/L y en L-Glutamina, con 10% FBSi y Gentamicina 50 µg/ml.

Células Epiteliales metastásicas de mama EVSA-t y de cáncer cérvico-uterino HeLa, cultivadas en DMEM enriquecido en Glucosa 1g/L y en L-Glutamina, con 10% FBSi y Gentamicina 50 µg/ml.

Células de hepatocarcinoma HepG2 y sus homólogas no transformadas WRL68, proporcionadas por el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC-UGR); todas ellas cultivadas en DMEM con baja concentración de Glucosa (*Low Glucose*) y en L-Glutamina, con 10% FBS activo y Gentamicina 50 µg/ml.

Células epiteliales de cáncer de pulmón humano A549, que se encuentran establemente silenciadas para la proteína PARG (Poli ADP-Ribosa Glicohidrolasa) mediante infección retroviral o líneas *shPARG* A549 y su línea control *shVector* A549; ambas proporcionadas por el laboratorio del doctor Lazlo Virag (*Medical and Health Science Center, Debrecen; Hungría*) cultivadas en DMEM enriquecido en Glucosa 1g/L y en L-Glutamina 2mM, con 10% FBSi y Gentamicina 50 µg/ml y que mantienen como antibiótico de selección la Puromicina 5µg/ml.

Todas las líneas humanas fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

2. Tratamientos, Reactivos y Tampones

La base de esta tesis es la privación nutricional o *starvation*, fundamentada en la eliminación de cualquier fuente externa de Aminoácidos en un medio totalmente controlado. Para ello todas las líneas celulares han sido privadas de Aminoácidos tratándolas con Solución Balanceada HANK (*HANK Buffer*) compuesto por NaCl 140 mM, KCl 5mM, MgCl₂-6H₂O 1.3 mM, CaCl₂-2H₂O 2 mM, HEPES 10 mM y D-Glucosa 5 mM pero totalmente carente en Aminoácidos. Para privar con Solución HANK previamente las células deben de encontrarse sembradas en monocapa en placas de cultivo determinadas y con una densidad y morfología idóneas para el experimento. Cumpliendo estas condiciones se pasa a

retirar por aspiración el medio de cultivo, lavar 1 vez con PBS1x autoclavado y poner un volumen, adecuado al diámetro del plato de cultivo, de Solución HANK manteniéndola distintos tiempos según el experimento en cuestión.

Para llevar a cabo la inhibición del proceso de Poli ADP-Ribosilación se han utilizado cuatro tipos de inhibidores químicos, todos ellos con una constante de inhibición en un rango adecuado (nM o en bajos valores μM). Además todos han sido utilizados en mayor o menor medida en distintos ensayos *in vivo* con ratones y en ensayos clínicos, algunos de los cuales se encuentran en fases avanzadas. Se ha utilizado PJ34 (*[N-(6-Oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide]*) con $\text{IC}_{50}=20$ nM, DPQ (*3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinone]*) con $\text{IC}_{50}=1$ μM , (Alexis Biochemicals, San Diego, CA), Olaparib (KU0059436, Selleckchem) con $\text{IC}_{50}=5$ nM y KUDOS (KU0058948) con $\text{IC}_{50}=3,2$ nM, proporcionado por el laboratorio de la doctora Françoise Dantzer (CNRS, Estrasburgo; Francia). Tanto DPQ como Olaparib fueron disueltos en DMSO (Dimetil-Sulfóxido) en concentraciones 50 mM y 10 mM respectivamente y mantenidos a -20°C , para posteriormente ser usados a concentraciones finales de 40 μM DPQ y 10 μM Olaparib. Por su parte PJ34 y KUDOS fueron resuspendidos en PBS1x autoclavado y mantenidos a -20°C en concentraciones de 50 mM PJ34 y 10 mM KUDOS, para ser utilizados a concentraciones finales de 10 y 20 μM PJ34 y 1 μM KUDOS. Para la inhibición de la actividad PARPs, las líneas fueron tratadas durante al menos 1.5 horas con todos los inhibidores, lo cual sería considerado a modo de pre-tratamiento, manteniéndolos durante todo el tiempo de privación con Solución HANK.

Para modular los niveles de autofagia que desarrollan las células durante privación, hemos utilizado un inhibidor químico de la autofagia y dos tipos de controles positivos de inducción de autofagia; permitiendo así comparar los resultados obtenidos por las distintas técnicas en cada línea celular tratada con Solución HANK, con su control pertinente. Los inhibidores químicos utilizados han sido la 3MA (*3-Methyl Adenine*, 3MA M9281, Sigma, St Louis, Mo) que es un inhibidor clásico de la ruta de las PI3k de clase III; 3MA fue disuelta en medio de cultivo estéril y mantenida a -20°C en concentración de 10 mM para ser utilizada a concentración final de 2 mM. Por otra parte los controles positivos de autofagia

usados fueron Rapamicina (*Rapa, Rapamycin* 553210 Calbiochem, Alemania) que es un potente inhibidor del complejo mTORC1 e inductor de autofagia y Concanamicina A (*Con A, Concanamycin A* C9705 Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) que potencia la formación de autofagosomas de forma independiente de mTORC1. Ambos compuestos fueron disueltos en DMSO a concentraciones 1 mM para la Rapamicina y 100 nM para la Concanamicina A, para ser usados en tratamiento a concentraciones finales de 100 nM durante 6 horas Rapamicina y 2 nM durante 4 horas Concanamicina A. El compuesto Cloroquina (*Chloroquine Salt* 99%, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) fue utilizado como inductor positivo de movilización lipídica durante el proceso de autofagia, utilizándose a 20 μ M durante 2 horas de tratamiento.

El tercer grupo de compuestos utilizados lo comprende la molécula AICAR (*5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside, Acadesine, N-(β -D-Ribofuranosyl)-5-aminoimidazole-4-carboxamide*, AICAR A9978, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) que es un mimético del AMP, utilizado como inductor de la actividad de la quinasa AMPk. Fue disuelto en H₂O en concentración 7 mg/ml y mantenido a 20°C, para ser utilizado en concentración final de 1, 2 y 3 mM durante 3 horas como tratamiento en monoterapia y 1.5 horas usándolo como pre-tratamiento previo a la privación, en este caso el AICAR es mantenido durante todo el tratamiento con Solución HANK.

El cuarto grupo de compuestos utilizados son aquéllos relacionados con la inducción de apoptosis, usados como controles positivos. Así se uso el tratamiento con Cicloheximida (*Cycloheximide* CHX C4859, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) a concentración 0.5 μ g/ml durante 8 horas como control positivo de la aparición de piknosis nuclear y Estaurosporina a concentración 2 μ M (*Staurosporine* 6942, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) durante 8 horas fue utilizado como control positivo de inducción de apoptosis por aparición de la fase Sub G1 del ciclo celular y activación de caspasas efectoras 3 y 7.

Los tampones o *Buffers* utilizados en esta tesis son los siguientes:

Solución de *starvation* o privación

- ❖ Solución Balanceada HANK (*HANK Buffer*): NaCl 140 mM, KCl 5mM, MgCl₂-6H₂O 1.3 mM, CaCl₂-2H₂O 2 mM, HEPES 10 mM, D-Glucosa 5 mM

Western Blot

- ❖ Tampón PBS10x pH 7.4: NaCl 140 mM, KCl, 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM
- ❖ *Running Buffer* 10x pH 8.8: TRIS-HCl 0.24 M, Glicina 2M, SDS 20%
- ❖ Tampón Transferencia Semiseca: TRIS-HCl 1M, Glicina 0.03 M, Metanol 20% 0.0035% SDS
- ❖ Tampón Transferencia Húmeda 10x: TRIS-HCl 0.2 M, Glicina 1.2 M
- ❖ Tampón Transferencia Húmeda 1x: 100 ml Tampón 10x, 200 ml Metanol, 700 ml H₂O MiliQ

Dilución de ARN total y plásmidos

- ❖ Tampón TBE 10x: TRIS-HCl 89.3 mM (pH 8.3), Ácido Bórico 89 mM; EDTA 2mM
- ❖ Tampón TE: TRIS-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1mM

Obtención de Extractos Proteicos Totales

- ❖ Tampón de Lisis 105: Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 0.1 mM, 0.5% Tritón X-100, 12.5 mM β-mercaptoetanol 12.5 mM
- ❖ Tampón de Lisis TR3: 10 mM Na₂HPO₄, 10% Glicerol, 20% SDS
- ❖ Tampón de Carga 6x para proteínas: TRIS-HCl 375 mM pH 6.8, SDS 12%, Glicerol 10%, β-mercaptoetanol 30%, Azul de Bromofenol 0.1%, H₂O MiliQ.

Inmunofluorescencia

- ❖ Solución de Fijación: 4% Paraformaldehido en PBS1x (4% mas/vol en PBS1x 2% Sacarosa)
- ❖ Solución de Permeabilización: Tritón X-100 0.5% en PBS1x
- ❖ Solución de Bloqueo: 2% de BSA en PBS1x

Co-Imunoprecipitación de proteínas endógenas

- ❖ Buffer EBC: TRIS-HCl 50 mM pH8, NaCl 120 mM, 0.5% NP-40, PMSF 1mM, *Protease Inhibitor Complete Mini Roche*
- ❖ Buffer NET-N: TRIS-HCl 20 mM pH8, NaCl 100 mM, 0.5% NP-40, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, *Protease Inhibitor Complete Mini Roche*

Subfraccionamiento Citosol-Núcleo

- ❖ Buffer de Lisis A: Hepes-KOH 0.5 M pH7.8, MgCl₂ 1 M, KCl 1 M, DTT 1M
- ❖ Buffer C: Hepes 0.5 M pH7.8, Glicerol 10%, NaCl 5 M, MgCl₂ 1 M, EDTA 0.25 M, DTT 1 M
- ❖ Buffer B: Hepes 0.5 M pH7.8, KCl 1 M, MgCl₂ 1 M

Microscopía Electrónica

- ❖ Solución de Fijación: *cacodilate buffer* 0.1 M pH 7.4, *osmium tetraoxyde*, 1.5 % *Glutaraldehyde*; 1% *Formaldehyde*
- ❖ Solución de Lavado: *cacodilate buffer* 100 mM (pH7.4)
- ❖ Solución de Tinción: 2% Acetato de Uranilo en H₂O MiliQ

3. Análisis por Western Blot

Para realizar el análisis de todas las rutas bioquímicas por *western blot*, las células humanas y murinas fueron sembradas en placas de 6 pocillos o 6 pocillos en una densidad de 3×10^5 células por pocillos en medio completos y mantenidos una noche (*overnight*) a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Al día siguiente fueron sometidas a los tratamientos oportunos con distintos reactivos y/o privadas con Solución HANK a distintos tiempos. Después de los tratamientos el medio de cultivo es aspirado, se lavan las células en monocapa dos veces con PBS1x autoclavado y se procede a la obtención de extractos proteicos totales. La lisis celular se realizó utilizando dos métodos distintos:

a) Buffer de Lisis TR3 (10 mM Na₂HPO₄, 10% Glicerol, 20% SDS): se añaden 200 µl de Buffer de Lisis por cada pocillo de la placa; una vez añadido el volumen de Buffer, se lisan las células utilizando un *scraper* que raspará la monocapa y que previamente ha sido esterilizado con Etanol al 70% y lavado con

PBS1x. El volumen de lisis de cada pocillo es recogido en *eppendorfs* para cada condición; cada muestra es sonicada durante 10 segundos en modo constante de sonicación y a un 50% de intensidad. Una vez sonicada se guardan 10 μ l de muestra para realizar una cuantificación proteica por el método de Lowry y al resto se le añade un 10% de su volumen de una solución de Azul de Bromofenol: β -mercaptoetanol en proporción 1:1 precalentada a 95°C durante 5 minutos. En este momento la muestra puede ser congelada y mantenida a -20°C.

b) Buffer de Lisis 105 (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 0.5% Tritón X-100, 12.5 mM β -mercaptoetanol): se añaden 70 μ l de Buffer de Lisis por pocillo. Se recogen las células con un *scraper* y en un *eppendorf* se mantienen en hielo durante 45 minutos. Precipitamos la muestra a 15.000 rpm durante 5 minutos y el *pellet* es eliminado, mientras el sobrenadante es mantenido a -20°C. Previamente se guardan 10 μ l de muestra para cuantificar proteínas totales por el método Lowry.

Una vez se han cuantificado las proteínas se calcula el volumen para cargar aproximadamente 40 μ g. Las distintas proteínas fueron resueltas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes o SDS-PAGE, en geles del 5, 10 o 15% de acrilamida en cubetas de electroforesis vertical Biorad; también se utilizaron geles en gradiente *AmershamTM ECLTM Gels 4-12% y 8-16%* (28-9898-06 GE Healthcare, Suecia) con cubetas en horizontal Amershan. El *Running Buffer 1x* utilizado está descrito en la tabla anexa 1. Resueltos los geles, fueron transferidos a membranas de PVDF (Biorad, Berkeley, CA) para lo cual se usaron dos sistemas de transferencia: Semiseca para proteínas dentro de un rango de Peso Molecular en un sistema Biorad y Húmeda para proteínas de alto Peso Molecular en un sistema Biorad en vertical; los *buffers* utilizados para cada sistema están recogidos en la tabla anexa 1. Las membranas fueron bloqueadas con una solución al 5% de Leche Desnatada en PBS1x-*tween20* (PBS1xt preparado al 1% de *tween20*) durante una hora y posteriormente fueron incubadas, durante una noche en agitación a 4°C, con los anticuerpos primarios frente a las proteínas objeto de estudio. Todos los anticuerpos primarios utilizados para esta tesis doctoral serán numerados a continuación, todos están disueltos en PBS1xt al 1% de leche desnatada y la gran mayoría en proporción 1:1000:

- ❖ **Metabolismo de PARP-1:** anti-PARP-1 (C2-10) (ALX-804-210, Alexis Biochemicals, LA), anti-Poli (ADP-Ribosa) (PAR) (20591E10, TREVIGEN, My).
- ❖ **Daños al ADN:** anti-phospho- γ H2Ax (Upstate, #05-636, *clone* JBW103).
- ❖ **Autofagia:** anti-LC3 (PD014, MBL, NY), anti-ATG7 (#2631, Cell signalling Beverly, MA), anti-Beclin1 (612112, BD Biosciences), anti-phospho-ULK1 (Ser317) (#6887, Cell signalling Beverly, MA), anti-ULK1 (#4776, Cell signalling Beverly, MA), p62 (#5114, Cell signalling Beverly, MA).
- ❖ **Apoptosis:** anti-caspasa 8 (BD, Pharmigen).
- ❖ **Señalización:** anti-phospho-AMP κ (Thr172) (#2535, Cell signalling Beverly, MA), anti-AMP κ (#2603, Cell Signaling, Beverly, MA), anti-phospho-ACC (Ser79) (#3661, Cell signalling Beverly, MA), anti-phospho-p70s6 kinase (Thr389) (#9205, Cell Signaling Technology Beverly, MA), anti-p70s6k total (sc-8418, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-phospho-Raptor (Ser792) (#2083, Cell signalling Beverly, MA), anti-Raptor (N-19) (sc-27744, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).
- ❖ **Sobreexpresión proteica:** anti-GFP (G1546 Sigma-Aldrich, St Louis, Mo), anti-GST (AB3282, BD Pharmigen).
- ❖ **Normalización:** α -tubulin (Sigma-Aldrich, St Louis Mo), β -Actin (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Posteriormente se retiran los anticuerpos primarios, se lavan las membranas tres veces con PBSt durante 10 minutos cada lavado. A continuación se colocan los anticuerpos secundarios unidos a Peroxidasa (POD) en proporción 1:5000 ó 1:10.000 en PBSt al 1% de leche desnatada. Se incubaron durante 90 minutos y se volvieron a lavar todas las membranas tres veces con PBSt. Las bandas fueron visualizadas utilizando reactivos de revelado de tipo ECL-PLUS y ECL-PRIME (*Amersham Biosciences*) y las bandas fueron obtenidas con el sistema de imagen digital *ChemiDoc XRS System* (Biorad) y con películas fotográficas médicas AGFA.

4. Inmunofluorescencia

Todas las líneas para inmunofluorescencia se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad de 3.5×10^4 células por pocillo y en placas 12 pocillos con una densidad de 2.5×10^3 células por pocillo; en todos los casos sobre

cubreobjetos previamente esterilizados, cultivándolas en medio completo y mantenidas una noche (*overnight*) a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Cuando las células adherentes adquirieron la morfología idónea, se hicieron los tratamientos pertinentes y se las sometió al proceso de inmunofluorescencia. Para ello primero se aspira el medio de cultivo y se procede a una primera fase de Fijación con una solución al 4% de Paraformaldehído en PBS1x (4%, mas/vol en PBS1x con 2% Sacarosa) autoclavado durante 10 minutos a temperatura ambiente, salvo en el caso de la fijación para analizar Poli ADP-Ribosilación que se hará a 4°C. A continuación se retira el medio de fijación y todas las muestras se lavan tres veces con PBS1x frío. El siguiente paso es una Permeabilización que se lleva a cabo con una solución de Tritón X-100 0.5% en PBS1x durante 5 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se retira la solución y se lavan las muestras tres veces con PBS1x frío. La tercera fase consiste en un proceso de Bloqueo que se hace con una solución al 2% de BSA en PBS1x durante 1 hora a 37°C. A continuación se añaden, sin necesidad de lavados previos, los Anticuerpos Primarios para las proteínas en cuestión: anti-PARP-1 (C2-10) (ALX-804-210, Alexis Biochemicals, LA), anti-Poli(ADP-Ribosa) (PAR) (20591E10, TREVIGEN, My); anti-AMPk α (#2603, Cell Signaling, Beverly, MA), anti-phospho- γ H2Ax (Upstate, #05-636, *clone* JBW103) en una solución PBS1x 2% BSA. Todos se incuban aproximadamente 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo, se recuperan los anticuerpos y se lavan los cubreobjetos tres veces con PBS1x frío. Posteriormente se añadirán los anticuerpos secundarios conjugados con distintos fluoróforos FITC (verde) o cy3 (rojo) en PBS1x 2% BSA y se dejarán incubando 30 minutos a 37°C. Volvemos a lavar tres veces con PBS1x y añadimos una solución 1:5000 con marcador nuclear DAPI durante 10 minutos. Retirado el DAPI y previo lavado de la muestra con PBS1x se procederá a la etapa final consistente en secar bien los cubreobjetos y colocarlos sobre portaobjetos libres de polvo y humedad con el Medio de Montaje Vectashield (H-1000, Vector, CA), para posteriormente sellar las muestras con laca de uñas comercial. Las muestras pueden ser almacenadas durante una noche a -20°C y fueron visualizadas bajo microscopía de fluorescencia en un Microscopio de Fluorescencia Zeiss o en un Microscopio Confocal Leica LCS SP5.

5. Silenciamiento de Proteínas mediante Tecnología ARN Interferente (*siRNA*)

El ensayo de silenciamiento de proteínas por ARN interferente o *siRNA* se realizó sobre células adheridas a cubreobjetos con densidad 6×10^4 para ensayos de microscopía de fluorescencia y 6×10^5 para ensayos bioquímicos por *western blot*. Todas las líneas se cultivaron en sus medios pertinentes, completos pero sin ningún tipo de antibiótico, ya que este impide el proceso de interferencia y causa muerte celular en el cultivo. Las células son cultivadas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. El silenciamiento específico se llevó a cabo utilizando el reactivo de transfección para ARNs Lipofectamina 2000™ (Invitrogen) siguiendo el protocolo proporcionado por el distribuidor. Las secuencias de ARNs de interferencias o *RNAi* se seleccionaron para las siguientes proteínas y para cada una de ellas se requirió una puesta a punto de la concentración de *RNAi* necesario. 50 nM (iBcl1 and iATG7), 60 nM (iPARP-1 and iULK1), 30 nM iPARG, fueron proporcionados por las siguientes empresas ATG7 no.1 y ULK1 desde Sigma; *Human* PARP-1 desde *Ambion Applied Biosystems*; Beclin1, PARG y *Murine* PARP-1 desde Santa Cruz Biotechnology. En todos los casos las células se dejaron en presencia de la solución de transfección con los *RNAi* durante 48 horas antes de realizar el estudio posterior, ya fuese extracción de proteínas o ARN total, transfección con el plásmido GFPLC3 para microscopía de fluorescencia o tratamiento con Solución HANK.

6. Ensayos de Autofagia

Células que expresan el plásmido GFPLC3 fueron utilizadas para el análisis morfológico de autofagia durante la privación de nutrientes. Por una parte trabajamos con la línea tumoral MCF7 y con una murina *Bax^{-/-}Bak^{-/-}* 3T3 MEFs, ambas transfectadas establemente con el plásmido GFPLC3 y por otra parte el resto de líneas humanas y murinas (g361, HT144, WRL68, HepG2, HeLa, EVSA-t, *shVector* A549, *shPARG* A549, *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3) fueron transfectadas con el mismo plásmido siguiendo dos protocolos distintos. El plásmido GFPLC3 para la transfección transitoria fue amablemente cedido por el laboratorio del doctor T. Yoshimori (*National Institute for Basic Biology, Okazaki; Japón*). Todas las líneas en cuestión fueron transfectadas siguiendo el protocolo para el reactivo

JetPEI™ (*Polyplus Transfection*, Illkrich; Francia), de acuerdo con las instrucciones, utilizando para ello un volumen determinado de reactivo de transfección ajustado a 100 µl de NaCl 150 mM por cada pocillo. Para ello todas las líneas se sembraron en placas 6 pocillos con una densidad de 4×10^4 células por pocillo en medio completo y siempre sobre cubreobjetos esterilizados, cultivándolas en medio completo una noche completa a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Después de transfectar las líneas se sometieron a las 48 horas a los tratamientos pertinentes con distintos reactivos y/o Solución HANK para el análisis morfológico del proceso de autofagia mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio tipo Zeiss. Después del tratamiento y antes del análisis microscópico, todas las muestras se procesaron de la siguiente forma: se aspiró el medio de cultivo y se lavaron al menos dos veces con PBS1x autoclavado y posteriormente fueron fijadas con una solución de Fijación que contiene Paraformaldehído (4%, mas/vol en PBS1x con 2% Sacarosa) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para determinar la localización de GFPLC3 sobre la superficie de los autofagosomas, se utilizaron una *settings* no saturantes con el filtro FITC (verde). Esta misma tecnología fue utilizada para células MCF7 que expresan de forma estable GFPLC3.

Por otra parte para analizar bioquímicamente el proceso de autofagia inducida por retirada de nutrientes, nos basamos en el procesamiento endógeno que sufre la proteína LC3 desde su forma citosólica difusa o LC3-I, a su forma proteolizada y lipidada que se localiza en la superficie de los autofagosomas o LC3-II. Para estudiar esta translocación endógena se utilizó para *western blot* el anticuerpo anti-LC3 (PD014, MBL, NY) descrito con anterioridad, capaz de medir tanto el fragmento LC3-I de 18 kDa y el procesado y localizado en las autofagosomas LC3-II de 16 kDa.

Como controles positivos de autofagia, tanto para microscopía como para ensayos bioquímicos, se utilizaron la Rapamicina y la Concanamicina, descritas en el apartado de reactivos. Ambos dieron idénticos resultados en todas las líneas celulares estudiadas.

7. Microscopía Electrónica

Todos los protocolos de experimentación animal utilizados para la realización de esta tesis han sido aprobados por el Comité de Ética Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Se trabajó con cepas de ratones C57BL/6 *wildtype* y *knockout* para la proteína PARP-1. Ratones neonatos fueron utilizados para determinar las diferencias en autofagia en función de la ausencia de PARP-1, durante privación en muestras hepáticas. Así las crías fueron separadas de las madres en las 4 primeras horas después de los nacimientos. Los hígados de ambas cepas de ratones fueron extraídos y lavados con PBS1x; prefijados durante 30 minutos en Solución de Fijación 1 (0.1 M *cacodilate buffer* pH 7.4, *osmium tetraoxyde*), lavados de nuevos y fijados con la misma solución durante 1 hora a 4 °C. Después del tratamiento las muestras fueron lavadas dos veces con H₂O MiliQ y teñidas con Acetato de Uranilo. Las secciones para el estudio fueron cortadas con cuchillas de diamante en un ultramicrotomo (*Reichert Ultracut S*). Posteriormente fueron analizadas en un microscopio electrónico modelo TEM Zeiss 902 con un voltaje de aceleración de 80 KV, localizado en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC-UGR).

8. Movilización de Vesículas Lipídicas (*Lipid Droplets*) por microscopía de fluorescencia

Células *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3 fueron sembradas sobre cubreobjetos en placas 6 pocillos con una densidad de 4 x 10⁴ células por pocillo. Mantenido a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ el tiempo necesario para que se adherieran, fueron sometidas a privación con Solución HANK a distintos tiempos. Tanto las células tratadas como las controles fueron fijadas con Paraformaldehído (4%, mas/vol en PBS1x con 2% Sacarosa) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las vesículas lipídicas movilizadas a consecuencia de la privación nutricional, fueron marcadas usando la sonda BODIPY® 493/503 (Invitrogen) durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad; se añadió una solución 1:5000 con marcador nuclear DAPI durante 10 minutos. Todas las muestras fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss usando el filtro FITC (verde). La incubación con Cloroquina (*Chloroquine Salt* 99%, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) a concentración 20 µM

durante 2 horas fue utilizado como control positivo de movilización y acumulación de vesículas lipídicas.

9. Ensayos de Muerte Celular

A lo largo de esta tesis se han realizado distintos ensayos encaminados a analizar cómo se ve afectada la viabilidad celular durante la privación de nutrientes y qué procesos de muerte celular específicos desencadenada la privación en un contexto en que eliminamos o inhibimos el proceso de Poli ADP-Ribosilación. Las líneas utilizadas han sido células *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3, *Bax^{-/-}Bak^{-/-}* GFPLC3 MEFs y la línea tumoral humana MCF7 GFPLC3.

9.a Ensayo de Viabilidad Celular o Ensayo MTT: *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3 y MCF7 GFPLC3 fueron sembradas en placas 24 pocillos con densidad 4×10^4 células por pocillo y sometidas a privación con Solución HANK a distintos tiempos. MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide*) fue medido según las instrucciones incluidas en el kit *Cell Proliferation Kit I* (MTT, 1-65-007 Roche; Alemania).

9.b Ensayo de Incorporación de Ioduro de Propidio: *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3 y *Bax^{-/-}Bak^{-/-}* GFPLC3 MEFs fueron sembrados en placas 6 pocillos con una densidad de 3×10^5 células por pocillo y tratadas con Solución HANK a distintos tiempos. Preincubadas con Ioduro de Propidio, el porcentaje de incorporación de dicho compuesto al ADN celular es directamente proporcional al porcentaje de muerte celular. Este ensayo de Tinción de Exclusión fue medido en un citómetro FACScalibur con el *software Cell Quest* (BD Bioscience).

9.c Tinción de Exclusión con Trypan Blue: *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3 se sembraron en placas 24 pocillos con densidad 3×10^4 células por pocillo y sometidas a privación con Solución HANK durante varias horas. Finalizados los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS1x, despegadas de los pocillos con Tripsina y recogidas en medio de cultivo (controles) y con Solución HANK (tratados). Se precipitaron por centrifugación 1.500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente; el *pellet* celular se resuspendió en 50 μ l de una solución 1:10 de *Trypan Blue* en PBS1x. A continuación la tinción de exclusión se midió por

recuento bajo microscopía óptica; excluyendo células birrefringentes como Vivas y marcadas con el azul típico del *Trypan* como Muertas.

9.d Ensayos de Apoptosis: para analizar la muerte celular por apoptosis, utilizamos tanto criterios bioquímicos como morfológicos. En todos los casos se utilizaron *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3 sometidos a privación de nutrientes y con sus controles positivos pertinentes.

9.d.1 Determinación de núcleos piknóticos: las células sembradas sobre cubreobjetos a densidad 3×10^4 fueron privadas de nutrientes a tiempos de 6 y 8 horas; posteriormente fueron fijadas con Paraformaldehído (4%, mas/vol en PBS1x with 2% Sacarosa) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron todas las muestras con PBS1x al menos tres veces y se las marcó con una solución 1:5000 con marcador nuclear DAPI durante 10 minutos. El marcaje con DAPI nos permitió analizar la morfología nuclear piknótica típica de los procesos de apoptosis bajo microscopía de fluorescencia. El tratamiento con Cicloheximida (*Cycloheximide* CHX C4859, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) a concentración $0.5 \mu\text{g/ml}$ durante 8 horas fue utilizado como control positivo de la aparición de piknosis nuclear.

9.d.2 AnexinaV/IP: las células sembradas con una densidad de 5×10^5 células por pocillo en placas 6 pocillos fueron privadas de nutrientes durante 6 horas. Posteriormente fueron lavadas varias veces con PBS1x autoclavado, tripsinizadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Todos los *pellets* celulares fueron resuspendidos en una solución de AnexinaV/IP (*Roche Applied*, Alemania) y mantenidos en oscuridad a 37°C durante 15 minutos. El porcentaje de células apoptóticas fue medido en un citómetro FACScalibur con el *software Cell Quest* (BD Bioscience). La Estaurosporina (*Staurosporine* 6942, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) durante 8 horas fue utilizada como control positivo de inducción de apoptosis por aparición de la fase Sub G1 del ciclo celular.

9.d.3 Actividad de Caspasas 3 y 7: se sembraron ambas líneas celulares en placas de 96 pocillos con densidad de 2×10^3 células por pocillo y se las sometió a privación durante 4.5, 6 y 8 horas. The *Caspase-Glo Reagent* fue

añadido directamente sobre las células en un volumen de 200 μ l por pocillo. Todas las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos en oscuridad y las medidas de luminiscencia se realizaron con un luminómetro *TECAN Infinite 2000 Luminometer*. Cada punto representó la media de tres pocillos o réplicas por cada condición en 3 experimentos independientes. Estaurosporina 2 μ M durante 3 horas fue utilizada como inductor de actividad caspasa, sin embargo estos datos no se muestran en los gráficos.

9.d.4 Procesamiento de Caspasa 8: ambas líneas celulares fueron sembradas en placas de 6 pocillos o 6 pocillos en una densidad de 3×10^5 células por pocillos en medio completos y mantenidos una noche a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Se sometieron a 6 horas de privación, se lavaron los pocillos y se extrajeron proteínas totales con el Buffer de Lisis TR3 anteriormente descrito. El procesamiento de la pro-caspasa 8 hacia fragmentos de 38 y 23 kDa fue resuelto en geles de poliacrilamida con un 12% de acrilamida y usando el anticuerpo anti-caspasa 8 (BD, Pharmigen). Extractos totales procedentes de células Jurkat irradiadas con 2 Gy, proporcionados por el laboratorio de la doctora María del Carmen Ruiz Ruiz (CIBM-UGR, Granada; España), fueron usados como controles de activación de caspasa 8.

10. Transfección Transitoria de ADN plasmídico

A lo largo de esta tesis se han transfectado varias líneas celulares humanas y murinas con distintos plásmidos para realizar ensayos variados, tanto de sobreexpresión como de análisis morfológico de autofagia. Concretamente células *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3 murinas y g361, HT144, HeLa, EVSA-t, *shVector* A549 y *shPARG* A549 humanas has sido transfectadas transitoriamente con el plásmido GFPLC3 de sobreexpresión para la proteínas LC3 localizada en la superficie de los autofagosomas. Del mismo modo se restauró la actividad PARP-1 en células *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3 usando la transfección transitoria de pEBC-PARP-1 que sobreexpresa una versión completa y activa de la proteína PARP-1 unida a GST; en tercer lugar se sobreexpresaron las proteínas PARP-1 y AMPk unidas a GFP y GST respectivamente en líneas MCF7 GFPLC3 para realizar ensayos de co-inmunoprecipitación. En todos los casos se utilizó el protocolo de transfección con el reactivo JetPei™ (*Polyplus Transfection*, Illkrich; Francia) de acuerdo con las

instrucciones proporcionadas por la casa comercial; para ello un volumen determinado de reactivo de transfección ajustado a 100 μl de NaCl 150 mM por cada pocillo y se mantuvieron en contacto con el reactivo junto al ADN 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ antes de realizar el ensayo en cuestión. A continuación detallo las concentraciones de ADN plasmídico después de realizar ensayos de *maxi-preps* y utilizados en las transfecciones:

GFPLC3: 2.234 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ GFP-PARP-1: 2.597 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

pEBC-PARP-1: 2.543 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pEBC-AMPk: 2.526 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

11. Niveles de expresión génica

11.a Extracción y Cuantificación de ARN total: Para ello en células tratadas y control se extrajo ARN total siguiendo las instrucciones del kit *RNeasy Kit* (Qiagen Inc., Valencia; California). La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó en el equipo *Nano DROP® ND-1000 Spectrophotometer* empleando 1 μl de cada muestra. Este sistema de cuantificación está basado en la absorbancia medida a 260 nm, tomando como Coeficiente de Extinción 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)-1cm⁻¹ para ADN de doble cadena y 40 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)-1cm⁻¹ para pequeño oligos y moléculas de ARN. El sistema *Nano DROP®* permite detectar contaminación en la muestra con proteínas, fenoles o moléculas que absorben en torno a 280 nm, calculando así la relación $A_{260}:A_{280}$, e incluso posible contaminación por moléculas glucídicas $A_{260}:A_{230}$. Se considerará puro un ADN con un índice $A_{260}:A_{280}$ en torno a 1.8 y un ARN con índice $A_{260}:A_{280}$ en torno a 2. Si la relación $A_{260}:A_{230}$ está entre 1.8 y 2.2, consideraremos que la muestra presenta contaminación.

11.b Reacción de Reverso Transcripción (RT-PCR): Para llevar a cabo el análisis de expresión génica de la proteína PARG tras producirse su silenciamiento génico, trabajamos con células MCF7 GFPLC3 previamente silenciadas según el protocolo antes descrito y se les aplicó el protocolo de extracción de ARN total. La cantidad de ARN total fue cuantificada y se calculó la misma cantidad para realizar el ensayo de Reverso-Transcripción o RT-PCR, para lo cual el ADN complementario o *cDNA* se obtuvo por el kit *Script cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories, Hercules; California) de acuerdo con las instrucciones del kit.

11.c PCR Cuantitativa (qPCR): La expresión de PARG tras el silenciamiento génico con siRNA fue medida por Análisis *Real-Time PCR* utilizando el sistema *iQ-SYBR Green Supermix* y un termociclador *iCycler Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Hercules; California) siguiendo las instrucciones pertinentes. Las secuencias específicas del *primer* u oligo para PARG humana se detallan a continuación:

Sense: AGC TGA GCG AGA TGT GGT TT

Antisense: TGG AAC AGT TTC TGC AT

Este kit contiene el agente intercalante *SYBR Green* específico de ADN recién sintetizado y el cual emite luz fluorescente tras su estimulación (absorción de 497 nm y emisión a 520 nm). La emisión se recoge por el sistema detector del equipo en cada ciclo de la PCR. La fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de ADN sintetizado, lo que nos permite conocer y registrar en todo momento la cantidad de ADN formado en cada ciclo de amplificación (Wittwer, Herrmann et al. 1997). El ciclo de PCR en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina Ciclo Umbral o *cycle threshold value* (C_t) y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN de la muestra, es decir, más cantidad de ADN inicial menor valor de C_t . Por lo tanto comparando los C_t de las distintas muestras a ensayar, se puede calcular el incremento de la expresión génica de una determinada muestra con respecto a una condición control. La composición de cada reacción de PCR fue la siguiente: 12.5 μ l de Reactivo Supermix 2x, 0.5 μ M de cada uno de los cebadores o *primers* tanto el sentido (*sense*) como el antisentido (*antisense*), 1 μ l de ADN complementario y la suficiente cantidad de agua MiliQ como para completar un volumen final de 25 μ l. Además se pusieron puntos de controles negativos o blancos, con 3 réplicas por cada uno de ellos, donde sería sustituido el ADN por agua MiliQ. Todas las muestras serían normalizadas con respecto a un gen de referencia que sería utilizado como control interno; el gen empleado fue 36B4.

El perfil térmico usado para la PCR fue el preestablecido por el sistema *iCycler Detection System*, con la excepción de que la temperatura empleada para cada etapa de hibridación del ADN de nueva síntesis, se corresponde con la

temperatura óptima de hibridación de los cebadores utilizados. La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó usando el método comparativo previamente descrito de las C_t (Wang, Liu et al. 2002, Zhu, Blackhall et al. 2004).

Así el N° de veces de Inducción = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{muestra problema}} - \Delta C_t_{\text{muestra control}}$ para un determinado gen de interés. En nuestro caso $\Delta C_t_{\text{muestra problema}}$ es el valor de C_t de la muestra o gen problema, normalizado según la expresión del gen 36B4 y $\Delta C_t_{\text{muestra control}}$ es el valor C_t de la muestra control sin tratar para ese mismo gen normalizado según la expresión del gen 36B4. Para la validación del cálculo $\Delta\Delta C_t$ es necesario la elaboración de curvas patrón, tanto del gen de referencia como del gen problema y que dichas curvas cumplan los requisitos de eficiencia de la PCR. Todas ellas deben cumplir unos valores determinados de coeficiente de correlación y deben calcularse con al menos 4 concentraciones diferentes. El producto resultante de PCR puede analizarse en geles de agarosa para confirmar el tamaño adecuado del fragmento que se ha amplificado y cuantificado, según lo establecido en la bibliografía.

12. Determinación de ATP

Los niveles intracelulares de ATP fueron medidos en líneas *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3 y MCF7 GFPLC3; para lo cual se sembraron sobre placas p60 con una densidad de 1×10^6 células por pocillo; cada una en su medio completo correspondiente y mantenidas toda la noche y a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Todos los ensayos se hicieron tras someterlas a tiempos cortos de privación con Solución HANK. El contenido de ATP se midió usando un ensayo tipo Luciferasa/Luciferina con el kit comercial *ATP Bioluminescent Assay* (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo), siguiendo las instrucciones proporcionadas. Se generó una curva patrón con concentraciones conocidas de ATP y fue utilizada para extrapolar valores de pmoles de ATP desde las unidades arbitrarias de luminiscencia obtenidas en un luminómetro *TECAN Infinite 2000 Luminometer*. Los valores obtenidos de pmoles de ATP fueron normalizados con valores de concentración de proteínas por muestra obtenidos por el Método *Bradford*. Finalmente se expresó la media de tres experimentos independientes con tres réplicas por cada condición y experimento, como porcentaje de ATP con respecto a los valores control, aplicando el estadístico adecuado.

13. Determinación de Especies Reactivos de Oxígeno (ROS)

Los niveles intracelulares de ROS fueron medidos en varias líneas *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs 3T3 tanto de nuestro laboratorio, como proporcionados por el laboratorio de la doctora Eva Siles (Dpto. Bioquímica, Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Jaén; España). En todas las líneas la densidad utilizadas fue de 3.5×10^5 células por pocillo en placas 6 pocillos; y manteniéndolas en sus medio adecuados a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Cuando las células tuvieron la morfología adecuada se las privó de nutrientes con Solución HANK y se utilizaron los controles positivos de formación de ROS con dosis bajas de H₂O₂. La producción de ROS se llevó a cabo, previa incubación con una sonda específica para ROS, llamada DCFDA (35845, FLUKA) prepara a una concentración de 8mg/ml en DMSO *in situ* y midiéndolos en un citómetro *Epics Elite ESP Cytometer*. Las células fueron incubadas con la sonda DCFDA aproximadamente 30 minutos antes de que finalizase el tiempo menor de privación con Solución HANK. Acabada la incubación, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células tres veces con PBS1x autoclavado y se tripsinizaron. El *pellet* celular obtenido a 1.500 rpm 4°C fue disuelto en 200 µl de PBS1x y analizadas en el citómetro. Los valores obtenidos fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia con respecto a los tiempos de privación y conseguidos de cuatro experimentos independientes con cuatro líneas *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs (dos distintas de cada línea) y manteniendo al menos tres réplicas significativas por cada condición y experimento.

14. Determinación de Daños al ADN

Para medir daños al ADN se utilizaron dos técnicas capaces de medir daños de simple cadena, normalmente inducidos por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Células *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* MEFs se utilizaron en los siguientes ensayos:

14.a Ensayo Cometa (Comet Assay): Ambas líneas celulares se sembraron en placas 6 pocillos a densidad 1×10^5 células por pocillo en medio completo, en las condiciones de cultivo idóneas. Una vez se las privón con Solución HANK y

usando los controles positivos pertinentes con Irradiación 2 Gy; se les aspiró el medio, se lavaron tres veces con PBS1x y se tripsinizaron. El *pellet* celular obtenido a 1.500 rpm 4°C fue procesado según el protocolo para el ensayo Cometa *Comet Assay Kit* (R&S System, Trevigen, MD; USA). El *pellet* fue mezclado con agarosa tipo *molten LM agarose* a 37°C en una proporción 1:10 (vol/vol) y pipeteado en sobre cubreobjetos especial tipo *COMET*. Estos cubreobjetos fueron mantenidos en oscuridad durante 10 minutos a 4°C e inmersos en una solución alcalina de lisis proporcionada por el kit. Posteriormente se sacan de la solución de lisis celular, se lavan con Solución TBE y se transfieren a una cámara de electroforesis horizontal donde se les aplica un voltaje de 1V/cm durante 20 minutos. Posteriormente se lavan los cubreobjetos con H₂O destilada y se dejan inmersos durante 5 minutos en etanol al 70% para después dejar secar al aire. En este momento serán marcados con SYBR Green y posteriormente analizados por microscopía de fluorescencia en un microscopio tipo Zeiss. Entre 70 y 90 núcleos fueron analizados por cada muestra en al menos tres experimentos independientes utilizando el programa informático *COMET Assay Software Project (CASP software)*. Los daños al ADN fueron cuantificados a partir de los datos de TM (*Tail Moment*) o Momento del Cometa que aparece como un “estela” marcada con SYBR Green indicativo de roturas en el ADN y salida del núcleo por la lisis alcalina que se les aplico a las muestras. El cálculo matemático de TM se obtuvo como porcentaje de ADN en la cola del Cometa por longitud total del mismo.

14.b Niveles de fosforilación de la Histona H2AX: La fosforilación de esta proteína indica daños al ADN y relajación de la cromatina, volviéndola accesible a la maquinaria de reparación de ADN. La fosforilación es, por tanto, directamente proporcional al daño y nos da una idea de cómo de eficiente es la reparación del material genético tras la privación de nutrientes. Para ello se usaron ambas líneas de 3T3 MEFs, tratadas con Solución HANK y con los controles positivos de daño usando Irradiación 2 Gy para los ensayos bioquímicos y Temozolomida para la cuantificación de *foci* o puntos de daños al ADN marcados ambos con anticuerpos específicos para los niveles de fosforilación de la histona anti-phospho- γ H2Ax (Upstate, #05-636, *clone* JBW103).

14.b.1. Inmunofluorescencia de *foci* phospho- γ H2Ax: para ello se utilizó el anticuerpo secundario conjugado a FITC y se preparó la muestra siguiendo el protocolo para inmunofluorescencia descrito anteriormente.

14.b.2. Western Blot de phospho- γ H2Ax: se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Peroxidasa POD según el protocolo para *western blot* y revelado descrito anteriormente.

15. Co-inmunoprecipitación de Proteínas Endógenas

Células MCF7 GFPLC3 fueron sembradas en placas p100 con una densidad 1×10^6 células por placa. Después de someterlas a privación, se les aspiró el medio y se lavaron dos veces con PBS1x autoclavado. Posteriormente se les añadió 200 μ l de Buffer EBC (50 mM Tris-HCl pH8, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM PMSF, *Protease Inhibitor Complete Mini Roche*) sobre hielo. Se recogió el extracto y en *eppendorfs* se mantuvieron en hielo 30 minutos, aplicándoles un *vortex* suave cada 10 minutos. Después se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se obtiene un primer extracto total o INPUT, el resto del sobrenadante fue incubado con 35 μ l de *Protein Sepharose A* (PAS) 30 minutos en agitación a 4 °C. Aplicando 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se obtuvo el extracto Pre-Inmune (PI) desde el sobrenadante, incubándolo con anti-Cyt C (sc-7159, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y el *pellet* con 50 μ l de Buffer EBC con PAS, dejándolo entre 1 y 4 horas en agitación a 4 °C. La co-inmunoprecipitación de AMPk y PARP-1 endógenas (Co-IP) se hizo usando los anticuerpos específicos anti-PARP-1 (C2-10) (ALX-804-210, Alexis Biochemicals, LA) y anti-AMPk α (#2603, Cell Signaling, Beverly, MA). Ambos fueron utilizados en proporción 1:100. La Co-IP fue incubada a 4°C en agitación. A continuación todas las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm 5 minutos 4°C. Todos los *pellets* fueron lavados cinco veces con 500 μ l de Buffer NET-N (20 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, *Protease Inhibitor Complete Mini Roche*) a 13.000 rpm 2 minutos 4°C. Finalmente todos los *pellets* fueron resuspendidos en buffer de carga 2x y mantenidos a -20°C hasta que se resolvieron en geles de poliacrilamida siguiendo el protocolo de *western blot* anteriormente descrito.

16. Colocalización de Proteínas Endógenas por Microscopía Confocal

Células MCF7 se sembraron en placas 6 pocillos sobre cubreobjetos autoclavados y con una densidad celular de 4.5×10^3 células por pocillo. Se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente se verificó la correcta morfología de células adherentes y se las privó de nutrientes con Solución HANK. Concluido el tratamiento se aspiró el medio, se lavó con PBS1x todos los pocillos y fijaron las células con una solución al 4% de Paraformaldehído en PBS1x (4%, mas/vol en PBS1x con 2% Sacarosa) autoclavado durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se retira el medio de fijación y todas las muestras se lavan tres veces con PBS1x frío. El siguiente paso es una Permeabilización que se lleva a cabo con una solución de Tritón X-100 0.5% en PBS1x durante 5 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se retira la solución y se lavan las muestras tres veces con PBS1x frío. La tercera fase consiste en un proceso de Bloqueo que se hace con una solución al 2% de BSA en PBS1x durante 1 hora a 37°C. La incubación con los anticuerpos primarios anti-PARP-1 (C2-10) (ALX-804-210, Alexis Biochemicals, LA) y anti-AMPk α (#2603, Cell Signaling, Beverly, MA) se realizó en una solución al 2% BSA en PBS1x durante 30 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se recuperan los anticuerpos y se lavan los cubreobjetos tres veces con PBS1x frío. Posteriormente se añadirán los anticuerpos secundarios conjugados con distintos fluoróforos FITC (verde) o cy3 (rojo) en PBS1x 2% BSA y se dejarán incubando 30 minutos a 37°C. Volvemos a lavar tres veces con PBS1x y añadimos una solución 1:10.000 con marcador nuclear DAPI durante 10 minutos. Retirado el DAPI y previo lavado de la muestra con PBS1x se procedió a la etapa final consistente en secar bien los cubreobjetos y colocarlos sobre portaobjetos libres de polvo y humedad con el Medio de Montaje Vectashield (H-1000, Vector, CA), para posteriormente sellar las muestras con laca de uñas comercial. Las muestras se guardaron durante una noche a -20°C para asegurar la calidad del marcaje. El análisis de colocalización se realizó en un microscopio confocal Leica LCS SP5 y el porcentaje de colocalización se obtuvo cuantificando la fluorescencia obtenida de los planos en Z de cada imagen (*z-stacks*). Las barras de error muestran el porcentaje de células en las cuales los *foci* de colocalización fueron observados tanto en una situación control como en las privadas con Solución HANK. * $P < 0.05$.

17. Subfraccionamiento Citosol-Núcleo

Para la separación de la fracción citosólica del núcleo celular se usaron células MCF7 GFPLC3, sembradas en placas p100 con una densidad 1×10^6 en medio completo y mantenidas un día completo a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 para que se adhieran correctamente. Pasado el tiempo de incubación, se las privó con Solución HANK a distintos tiempos y se aplicó el siguiente protocolo de Subfraccionamiento. Para obtener ambas fracciones purificadas, se aspiró el medio de cultivo y se lavó las células en hielo al menos 2 veces con PBS1x autoclavado; posteriormente fueron lisadas con 300 μl de Buffer de Lisis A (0.5 M HEPES-KOH pH7.8, 1 M MgCl_2 , 1 M KCl, 1M DTT). Se utilizaron *scrappers* para la lisis y se recogieron los extractos en tubos preenfriados en hielo. En este momento se resuspendió bien cada muestra con pipetas al menos 10 veces sin hacer espuma y se incubaron en hielo 10 minutos. A todas las muestras se les añadió una mezcla de Tritón X-100 al 10%, concretamente el 10% del volumen inicial y se les aplicó el *vortex* durante 30 segundos por muestra. Se centrifugaron todas las muestras a 11.000 rpm a 4°C durante un minuto. Se separó el sobrenadante que a partir de ahora consideraremos Fracción Citosólica o CE (que se mantendrá a 4°C) y el pellet(Fracción Nuclear o NE), se resuspendió en 100 μl de Buffer A para lavar restos de citosol contaminante en la muestra y se volvió a centrifugar a 11.000 rpm a 4°C durante un minuto; esta etapa de lavado se puede repetir una o dos veces más. A partir de ahora los extractos NE se resuspendieron en un 1/5 de su volumen inicial de Buffer C (0.5 M HEPES pH7.8, Glicerol, 5 M NaCl, 1 M MgCl_2 , 0.25 M EDTA, 1 M DTT) y los extractos CE con 1/10 de su volumen inicial de Buffer B (0.5 M HEPES pH7.8, 1 M KCl, 1 M MgCl_2). En este momento las muestras llevaron al agitación a 4°C al menos 30 minutos y posteriormente se precipitaron a 15.000 g 4°C 15 minutos. Todos los sobrenadantes fueron mezclados con Buffer de Carga y mantenidas a -20°C . Como control de ausencia de transferencia o contaminación núcleo-citosol y viceversa, se utilizaron PARP-1 (control de proteína nuclear) y α -tubulina (control de proteína citosólica). Tanto los controles PARP-1 y α -tubulina, como las proteínas problema AMPK total y *phospho*-AMPK fueron resueltas en geles de poliácridamida del 7.5% de acrilamida según el protocolo de *western blot* descrito anteriormente.

18. Análisis Estadístico

Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas aplicando un Test *t-Student* a datos de al menos 3 experimentos independientes con al menos 3 réplicas por condición en la mayoría de los casos. Valores $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos. Todos los datos fueron procesados usando el programa *GraphPad Prism Version 5* a partir del cual se obtuvieron valores de medias y el Error Estándar de la Media o SEM para cada condición y experimento. También se utilizaron hojas de cálculo Excell para normalizar datos y referirlos como % respecto al control. Cada experimento de esta tesis lleva a cabo una puesta a punto en número de células ensayadas, puesta a punto de concentraciones de reactivos o ADN, tiempos de tratamientos, etcétera; que fueron tenidos en cuenta en los procesos de normalización de cada ensayo.

19. Bibliografía

de Murcia, J. M., C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F. J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon and G. de Murcia (1997). "Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7303-7307.

Wang, K. K., N. Liu, N. Radulovich, D. A. Wigle, M. R. Johnston, F. A. Shepherd, M. D. Minden and M. S. Tsao (2002). "Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma." Oncogene **21**(49): 7598-7604.

Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, A. A. Moss and R. P. Rasmussen (1997). "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." Biotechniques **22**(1): 130-131, 134-138.

Zhu, C. Q., F. H. Blackhall, M. Pintilie, P. Iyengar, N. Liu, J. Ho, T. Chomiak, D. Lau, T. Winton, F. A. Shepherd and M. S. Tsao (2004). "Skp2 gene copy number aberrations are common in non-small cell lung carcinoma, and its overexpression in tumors with ras mutation is a poor prognostic marker." Clin Cancer Res **10**(6): 1984-1991.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

**La autofagia inducida por privación de
nutrientes conlleva daños al ADN y la
activación de PARP-1**

Resumen

En respuesta al estrés nutricional, las células ponen en marcha un programa de autofagia que puede conllevar adaptación o muerte celular. El mecanismo que va desde la privación de nutrientes hasta que comienza la autofagia no es del todo conocido. En este primer capítulo, demostramos como la ausencia o inhibición de la proteína PARP-1, retrasa considerablemente la autofagia inducida por privación de nutrientes. Hemos encontrado que los daños al ADN son un evento temprano durante la autofagia inducida por privación, tal y como hemos demostrado mediante ensayos de fosforilación de la histona γ H2Ax y por ensayos COMETA. En células carentes de PARP-1, *parp-1*^{-/-}, hemos demostrado que existe una importante reducción en ambos parámetros. Durante la privación de nutrientes, los daños al ADN que se producen activan a PARP-1, conduciendo a una importante caída o depleción en los niveles de ATP.

La ausencia de PARP-1 mantiene inactiva a AMPk, considerada como el sensor energético celular, además impide la pérdida completa de la actividad de mTORC1, sensor nutricional celular, lo que conlleva a una deficiencia en la inducción de autofagia. La eliminación genética de PARP-1 favorece que se produzcan fenómenos de apoptosis en células privadas de nutrientes, sugiriendo que tanto la autofagia como la activación de PARP-1, favorecen la supervivencia y adaptación de las células durante la privación de nutrientes y ausencia de fuentes de energía externa. Resultados *in vivo* demuestran que ratones neonatos *knockout* para PARP-1, sometidos a privación en el momento de su nacimiento, también presentan características de una autofagia deficiente en el hígado, lo que confirma el papel fisiológico de PARP-1 en la autofagia como mecanismo no solo de adaptación a la ausencia de nutrientes, sino también como mecanismo que favorece un correcto desarrollo de los tejidos. Por todo esto podemos concluir que la vía de señalización a través de PARP modulan las fases iniciales de la autofagia inducida por retirada de nutrientes.

Resultados

La ausencia o inhibición de PARP-1, retrasa la autofagia inducida por privación de nutrientes.

La retirada temporal de nutrientes es el estrés más fisiológico capaz de inducir autofagia en células eucariotas. Para estudiar el papel de PARP-1 en el proceso de autofagia inducida por privación de nutrientes, trabajamos con células MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* (Fibroblastos Murinos Embrionarios 3T3), transfectadas transitoriamente con el plásmido GFP-LC3, que codifica para la proteína LC3, esencial en la formación de los autofagosomas. Ambas líneas fueron privadas de nutrientes con Solución Salina Balanceada HANK, que induce autofagia por ausencia de aminoácidos, durante tiempos de 1, 2 y 4.5 horas (apartado de Material y Métodos). Morfológicamente el paso de un patrón verde difuso GFPLC3 en una célula transfectada y en condiciones óptimas de nutrientes, a un patrón verde punteado GFPLC3 durante la privación con Solución HANK, es considerado como un marcador de inducción de autofagia. El recuento de vesículas positivas para GFP bajo microscopía de fluorescencia, es directamente proporcional al número de vesículas autofágicas o autofagosomas, ya que cada vesícula ha incorporado GFP unido a LC3, marcador de la superficie autofagosomal. Como se ve en la figura 1, la retirada de nutrientes en células transfectadas con GFPLC3, muestra un patrón verde punteado característico, indicativo de la acumulación de autofagosomas. El porcentaje de células positivas para el patrón punteado GFPLC3 fue superior en MEFs *parp-1^{+/+}* con respecto a MEFs *parp-1^{-/-}* ambas tratadas con Solución HANK a los tiempos de 1, 2 y 4.5 horas (**Figura 1.A**). En el panel de la derecha se muestra una imagen característica de cada línea celular transfectada y privada con Solución HANK durante 2 horas; se puede observar la distinta incidencia de la autofagia entre MEFs *parp-1^{+/+}* y MEFs *parp-1^{-/-}*. La Rapamicina, un inhibidor del complejo mTORC1 o sensor nutricional de la célula, a concentración 100 nM durante 4 horas, fue utilizado como control positivo de inducción de formación de autofagosomas; MEFs *parp-1^{-/-}* muestran una sensibilidad menor a la acción de la Rapamicina. Del mismo modo el número de vesículas GFPLC3 (autofagosomas) por célula también fue superior en MEFs *parp-1^{+/+}* privadas, con

aproximadamente 20 vesículas por célula en MEFs *parp-1^{+/+}* y de 8 a 9 vesículas en MEFs *parp-1^{-/-}* tratadas ambas con Solución HANK durante 2 horas (**Figura S1**).

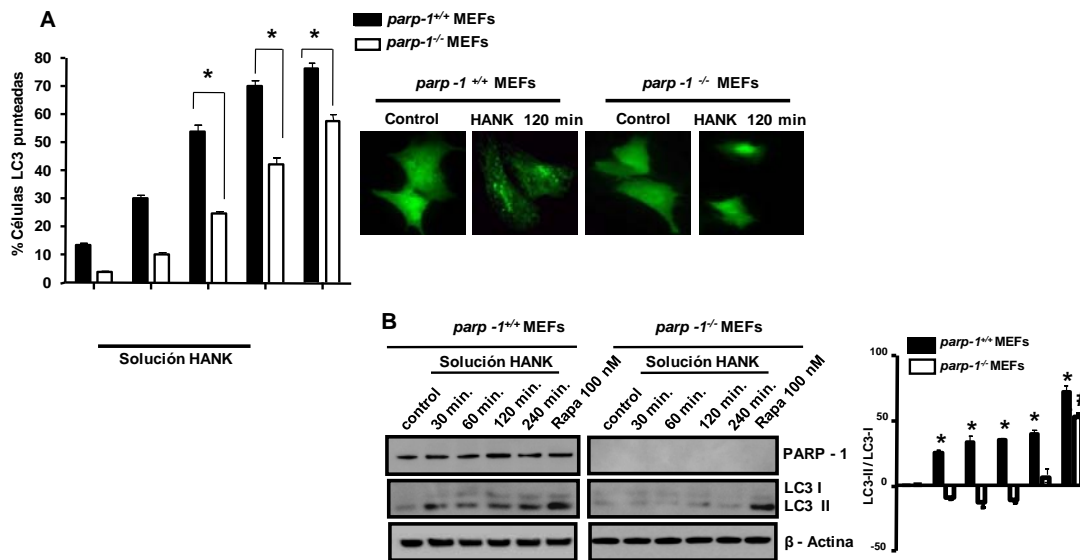


Figura 1: La autofagia inducida por privación de nutrientes está retrasada en células PARP-1 knockout (I). (A) MEFs 3T3 *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* fueron transfectadas con el plásmido GFPLC3. 24 horas después de la transfección se la privó de nutrientes con Solución HANK a distintos tiempos de 60, 120 y 240 minutos. En el gráfico se muestra el porcentaje de células positivas para el punteado LC3. Rapamicina 100 nM 4 horas fue utilizado como control positivo de formación de autofagosomas. A la derecha se muestran imágenes representativas del patrón de distribución de LC3 en ambas líneas, comparando situación control y privadas de nutrientes. * $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* privadas de nutrientes. (B) Análisis por *western blot* de la translocación de la forma endógena de LC3-II en células *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* control y privadas con Solución HANK. Rapamicina 100 nM 4 horas fue usada como control positivo de procesamiento de la proteína LC3. * $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* control y tratadas. ** $p < 0.01$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* control y tratadas con Rapamicina y # $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{-/-}* controles y tratadas con Rapamicina. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. En las figuras A al menos 250 células fueron contadas bajo microscopía de fluorescencia. β -actina fue usada como control de carga.

La conversión de la forma citosólica de LC3 o LC3-I a la forma localizada en la superficie del autofagosoma o LC3-II mediante proteólisis y lipidación, es el principal marcador bioquímico usado para estudiar la autofagia. El siguiente paso fue medir esta conversión endógena de LC3 en células MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}*, sometidas a los mismos tiempos de privación con Solución HANK que para los ensayos de morfología. El procesamiento de LC3-II, analizado por *western blot*, está inhibido en MEFs *parp-1^{-/-}* a los mismos tiempos de privación que en MEFs *parp-1^{+/+}* confirmando el dato obtenido por microscopía de fluorescencia (**Figura 1.B**). Ambos datos indican un importante retraso en la inducción de autofagia en ausencia de la proteína PARP-1. De nuevo la Rapamicina 100 nM fue utilizada como inductor positivo de autofagia. A la derecha se muestra una cuantificación de

la banda LC3-II con respecto a LC3-I, obtenida de 3 experimentos independientes y bajo las mismas condiciones de ensayo.

Para evaluar cómo de activa es la autofagia en nuestro modelo, utilizamos un inhibidor químico de la autofagia llamado 3-MA, 3-MetilAdenina (*3-MethylAdenine*) que es un inhibidor de la ruta de las PI3k de clase III (*Class III Phosphatidylinositol 3-kinase*) esenciales en la etapa de Nucleación de los autofagosomas (Blommaart, Krause et al. 1997) y un silenciamiento específico para la proteína ATG7, esencial en la fase de Elongación de la formación de los autofagosomas (Klionsky 2010, Yang and Klionsky 2010). Tanto el tratamiento con 3-MA como el silenciamiento de la proteína ATG7 (siATG7), provoca una considerable reducción en el número de células con patrón GFPLC3 en MEFs *parp-1^{+/+}* después de 2 horas de privación con Solución HANK (**Figura 1.C y 1.D**), mientras que en células MEFs *parp-1^{-/-}* impide completamente de la inducción de la autofagia (**Figura 1.C, 1.D y S2**).

Estos datos indican que la translocación GFPLC3 que se observa en MEFs *parp-1^{+/+}* es debida a la inducción de autofagia; además refleja un papel funcional de la autofagia durante la retirada de nutrientes. La ausencia de PARP-1 sinergiza totalmente con el efecto de la 3-MA o el silenciamiento de ATG7, para suprimir totalmente la autofagia durante privación. En la figura 1.D se muestra la eficiencia del silenciamiento de ATG7 en ambas líneas celulares y el análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. En todos los experimentos con siRNA, el control hace referencia a células transfectadas con un siRNA inespecífico (SIMA), que no muestra efecto sobre los niveles de autofagia ni sobre la expresión de ATG7 (**Figura 1.D**). La fusión de los lisosomas con los autofagosomas no se vio afectada en células MEFs *parp-1^{-/-}* privadas, ya que el tratamiento con Cloroquina, que inhibe dicho proceso, no afecta a la acumulación de vesículas LC3 en ambas líneas celulares, ni en la translocación endógena de LC3-I a LC3-II (**Figura S3.A**).

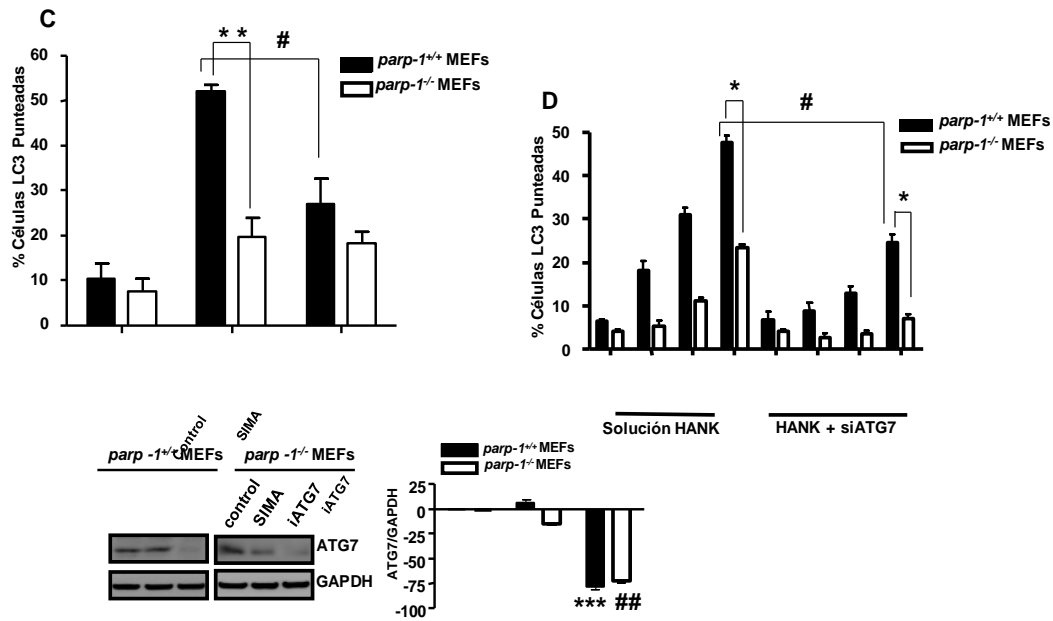


Figura 1: La autofagia inducida por privación de nutrientes está retrasada en células PARP-1 knockout (II). (C) Efecto de la 3-MA 2mM sobre la autofagia inducida por privación en MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}*. La 3-MA fue añadida como pretratamiento durante 1.5 horas y mantenida mientras se trataron con Solución HANK. ** $p < 0.01$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* privados de nutrientes y # $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* ambos controles. (D) Efecto del silenciamiento de ATG7 en MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}*. Ambas líneas fueron transfectadas con siRNA ATG7 60nM y 48 horas después, transfectadas con GFPLC3 y sometidas a Solución HANK. Como control negativo se usó un siRNA inespecífico o SIMA en ambas líneas. El panel de la derecha muestra la eficiencia del silenciamiento con respecto al control negativo, con su cuantificación correspondiente. * $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* SIMA privadas de nutrientes y para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* siATG7 privadas. # $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* SIMA y siATG7 privadas de nutrientes. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. En las figura D al menos 250 células fueron contadas bajo microscopía de fluorescencia. GAPDH fue usada como control de carga.

Para evaluar el papel de la proteína PARP-1 en la autofagia inducida por privación de nutrientes, analizamos el efecto del inhibidor de PARPs, DPQ (3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl) butoxy]-1(2H)-isoquinolinone] con una $IC_{50} = 1 \mu M$, así como del silenciamiento específico para la proteína PARP-1 en células MEFs *parp-1^{+/+}* privadas. Tras los tratamientos oportunos, las células fueron transfectadas con GFPLC3 y se las privo con Solución HANK a tiempos de 1 a 4.5 horas. La inhibición de PARP-1 con 40 μM de DPQ, reduce el número de células con el patrón GFPLC3 en MEFs *parp-1^{+/+}* sometidas a retirada de nutrientes, mientras que no tuvo efecto en células MEFs *parp-1^{-/-}* privadas a los mismos tiempos (Figura 2.A). Efectos similares se obtuvieron con el uso de otros inhibidores de PARPs, como son PJ34 y Olaparib (apartado de Material y métodos) utilizados a concentraciones de 10 μM (Figura S3.B). El silenciamiento de PARP-1 (siPARP-1), induce una importante

reducción en el número de células autofágicas en MEFs *parp-1^{+/+}* a 2 horas de privación con Solución HANK (**Figura 2.B**), obteniendo unos valores de autofagia muy similares a los de las células MEFs *parp-1^{-/-}* (**Figura 2.A y 1.A**) y presentan una reducción casi total de la conversión de la forma endógena de LC3-II, durante la privación de nutrientes (**Figura 2.C**). En este apartado se muestra la eficiencia del siRNA para PARP-1 por *western blot* y la correspondiente cuantificación de 3 ensayos independientes de translocación de LC3. El siRNA inespecífico o SIMA no afecta a los niveles de autofagia basales de las células, ni altera los niveles de formación de LC3-II con respecto a los resultados de la figura 1.B.

Estos datos indican que la presencia de la proteína PARP-1 juega un papel activo en la inducción de la autofagia por retirada de nutrientes. Para confirmar este resultado, reconstituimos la expresión de una forma activa de la proteína PARP-1 en células MEFs *parp-1^{-/-}*, utilizando el plásmido pBC-PARP-1 (**Figura 2.D y S4**) y tras confirmar que la actividad PARP-1 quedaba restaurada, co-transfectamos con GFPLC3 para analizar los niveles de autofagia. Células MEFs *parp-1^{-/-}* transfectadas con el vector vacío pBC, fueron utilizadas como controles negativos. La reconstitución de una forma activa de PARP-1 en MEFs *parp-1^{-/-}*, incrementó el número de células autofágicas sometidas a privación tras 30 y 60 minutos, en comparación con células control transfectadas con el plásmido vacío pBC (**Figura 2.D y S4**). Estos resultados sugieren que tanto la presencia como la correcta activación de PARP-1, son esenciales en la inducción de autofagia por privación de nutrientes. Así mismo la inhibición o el silenciamiento de PARP-1, conduce a un importante retraso en la respuesta autofágica, incluyendo la conversión de LC3 y la formación de autofagosomas. Es importante destacar que la ausencia de actividad PARP-1 no inhibe totalmente la autofagia, sino que la retrasa considerablemente, ya que a tiempos superiores a 4.5 horas encontramos que los niveles de inducción de autofagia, son similares entre MEFs *parp-1^{+/+}* y MEFs *parp-1^{-/-}* privados de nutrientes. Para ello se hizo un curso del tiempo de privación con Solución HANK durante tiempos superiores a 1 hora hasta 8 horas, y se realizó el recuento de aproximadamente 250 células con morfología punteada GFPLC3 bajo microscopía de fluorescencia (**Material Anexo Resultados Figura 1**).

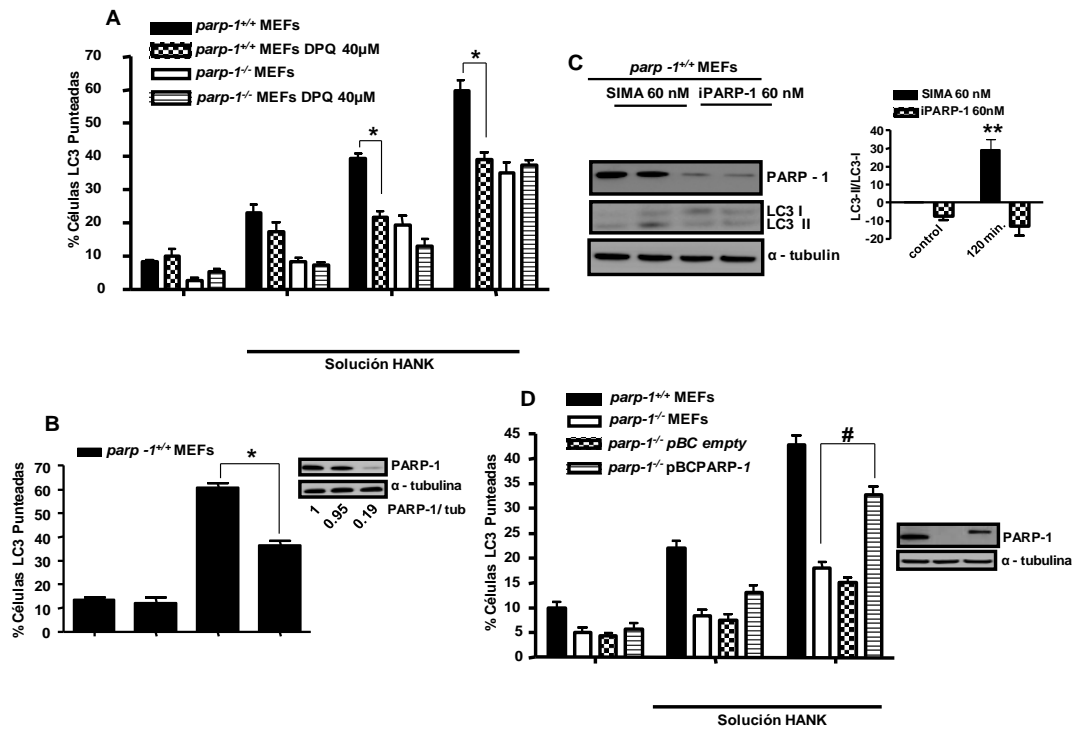


Figura 2: La inhibición o el silenciamiento de PARP-1, interfiere con la autofagia inducida por privación de nutrientes. (A) Efecto de la inhibición de PARPs con DPQ, sobre la autofagia inducida por privación. Células *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* fueron transfectadas con GFPLC3 y 24 horas después fueron pretratadas con DPQ 40 μ M 1.5 horas. DPQ se mantuvo como cotratamiento con la Solución HANK a los tiempos marcados. Se muestra el porcentaje de células positivas para el punteado GFPLC3. * $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* tratadas con DPQ y privadas, con MEFs *parp-1^{+/+}* privadas con Solución HANK. **(B)** Efecto del silenciamiento de PARP-1 sobre la autofagia. MEFs *parp-1^{+/+}* fueron transfectadas con el siRNA murino para PARP-1 (50nM) y 48 horas después se transfectaron con GFPLC3. Porcentaje de células con punteado LC3 en situación SIMA con respecto al siPARP-1, ambas a 120 minutos de privación. El panel de la derecha muestra la eficiencia del silenciamiento de PARP-1 en MEFs *parp-1^{+/+}*. * $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* SIMA y siPARP-1 privadas de nutrientes a 120 minutos. **(C)** Efecto del silenciamiento de PARP-1 sobre los niveles de translocación endógena de LC3-II en MEFs *parp-1^{+/+}*. ** $p < 0.01$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* SIMA y siPARP-1 privadas de nutrientes. **(D)** Reconstitución de la actividad PARP-1 en MEFs *parp-1^{-/-}*, efecto sobre la autofagia inducida por privación de nutrientes. MEFs *parp-1^{-/-}* fueron transfectadas con el plásmido pBC-PARP-1. 24 horas después fueron transfectadas con GFPLC3 y tratadas con Solución HANK a los tiempos marcados. El plásmido vacío pBC fue usado como control negativo. El panel derecho muestra el grado de reconstitución de PARP-1 en MEFs *parp-1^{-/-}* comparándolos con los niveles de expresión de PARP-1 en células *wildtype*. # $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{-/-}* transfectadas con pBC y con pBC-PARP-1, privadas de nutrientes. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. En las figuras A, B y D al menos 250 células fueron contadas bajo microscopía de fluorescencia. α -tubulina fue usada como control de carga.

La privación de nutrientes induce producción de ROS, daños al ADN y activación de PARP-1.

PARP-1 es un enzima nuclear que se activa ante la presencia de daños al ADN, generados por estrés genotóxico, irradiación o fallos en la replicación. Cuando se activa, sintetiza un polímero ramificado de ADP-Ribosa o PAR, que participa en el mantenimiento de la homeostasis nuclear (Burkle 2005, Hassa and

Hottiger 2008) . Muchos tipos de estreses celulares pueden inducir activación excesiva de PARP-1 y conducir a muerte celular dependiente de PARilación. Es conocido que durante la privación de nutrientes se generan Especies Reactivas del Oxígeno o ROS y esto pueden jugar un papel importante en la regulación del proceso de autofagia (Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007). En función de estos antecedentes, quisimos comprobar si la producción de ROS durante la privación de nutrientes, podría ser la fuente de activación de PARP-1.

Para ello primero se midió si PARP-1 era capaz de activarse durante el tratamiento con Solución HANK, por lo que se privaron de nutrientes células MEFs *parp-1^{+/+}* a distintos tiempos y se midió la actividad PARP, usando un anticuerpo específico que detecta el polímero de ADP-Ribosa o PAR. De hecho comprobamos que la privación de nutrientes inducía la síntesis de de PAR (**Figura 3.A**). El tratamiento con el inhibidor de PARP, PJ34 bloqueó la síntesis de PAR dependiente de privación nutricional, lo que confirma que la PARilación que medimos es debida a la carencia de nutrientes. H₂O₂ 10 mM durante 10 minutos es el tratamiento control de PARilación y confirma que el anticuerpo mide correctamente los niveles de producción de polímero PAR (**Figura 3.A**). Como material suplementario se incluye una inmunofluorescencia de PAR durante el tratamiento con H₂O₂ 10 mM y 1 hora de privación con Solución HANK; en ambos casos comprobamos la existencia de polímero PAR nuclear, debido a la activación de PARP-1 (**Figura S5**).

La producción de ROS durante estrés nutricional, la confirmamos usando una sonda específica para la producción de H₂O₂ y otros ROS, llamada 2'-7'-Diclorofluoresceína Diacetato (*2'-7'-Dichlorofluorescein diacetate DCFDA*), en células MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* privadas con Solución HANK a distintos tiempos, mediante citometría de flujo (LeBel, Ischiropoulos et al. 1992). El ensayo mostró una importante disminución en la producción de ROS en células MEFs *parp-1^{-/-}* a tiempos cortos, inmediatamente después de privar de nutrientes (**Figura 3.B**). Este resultado es consistente con estudios previos que muestran una caída en la producción de ROS en linfocitos sometidos a estrés oxidativo y tratados con inhibidores de PARPs (Virag, Salzman et al. 1998). La síntesis de ROS y su traslocación al núcleo para inducir daños al ADN es muy rápida por lo que se eligió como referencia el tiempo de 30 minutos de privación de nutrientes para medir

daños al ADN, ya que a ese tiempo exacto hay una gran producción de ROS y activación de PARP-1 (**Figura 3.A y 3.B**). Los ROS suelen inducir daños de cadena simple en el ADN. Este tipo de lesiones pueden medirse por varias técnicas como son Ensayos COMETA (*COMET Assay*) y niveles de fosforilación de la histona γ H2AX. El ensayo COMETA muestra que los daños al ADN a 30 minutos de privación, son más pronunciados en MEFs *parp-1^{+/+}* (**Figura 3.C**). El parámetro que se analiza es la intensidad y longitud del “momento de la cola” o *Tail Moment* (TM) de los COMETAs, que es directamente proporcional a la intensidad de daño producido; su valor numérico se obtiene de una cuantificación de los COMETAs obtenidos mediante el *software COMET Assay Software Project (CASP software)*, tal y como se explica en el apartado de material y métodos. En 3 ensayos independientes con un recuento de al menos 50 núcleos por condición, se obtuvo que el parámetro TM es siempre mayor en células *parp-1^{+/+}* cuando se tratan con Solución HANK (**Figura 3.C**). Pasada una hora los TM fueron cada vez menores; este dato nos indica que el daño al ADN está siendo señalado por PARP-1 y que la maquinaria de reparación está activa. Por el contrario en células *parp-1^{-/-}* privadas a los mismos tiempos, encontramos que los daños al ADN son considerablemente menores aunque la carencia de PARP-1 hace que la maquinaria de reparación no sea tan eficiente como en células *wildtype*, dando lugar a un importante daño residual al ADN a tiempos de 60 minutos de privación (**Figura 3.C**). Por tanto, las células carentes de PARP-1, a pesar de sufrir menos daños tienen un mayor daño residual. A los mismos tiempos de privación (30 minutos), las células *parp-1^{+/+}* presentan niveles elevados de fosforilación de la histona γ H2AX, dato que sugiere un elevado número de lesiones en el ADN provocadas por los ROS sintetizados durante la privación nutricional (**Figura 3.D**). El máximo de señal obtenida para γ -H2AX, la encontramos a una hora de privación en células *parp-1^{+/+}*, desapareciendo a partir de este momento, mientras que en células deficientes en PARP-1 la señal aparece más tarde pero es mantenida en el tiempo. La cuantificación de 3 experimentos independientes se muestra como análisis densitométrico de la histona fosforilada con respecto al control de carga. Estos datos son consistentes con los obtenidos mediante ensayo COMETA y demuestran el distinto grado de eficiencia en la maquinaria de reparación de ADN entre ambas líneas. Más aún, el análisis por inmunofluorescencia de *focis* de γ H2AX, reveló que el número de

células con marcaje positivo para γ -H2AX durante el tratamiento con Solución HANK, fue siempre superior en MEFs *parp-1*^{+/+} con respecto a MEFs *parp-1*^{-/-} (Figura S6).

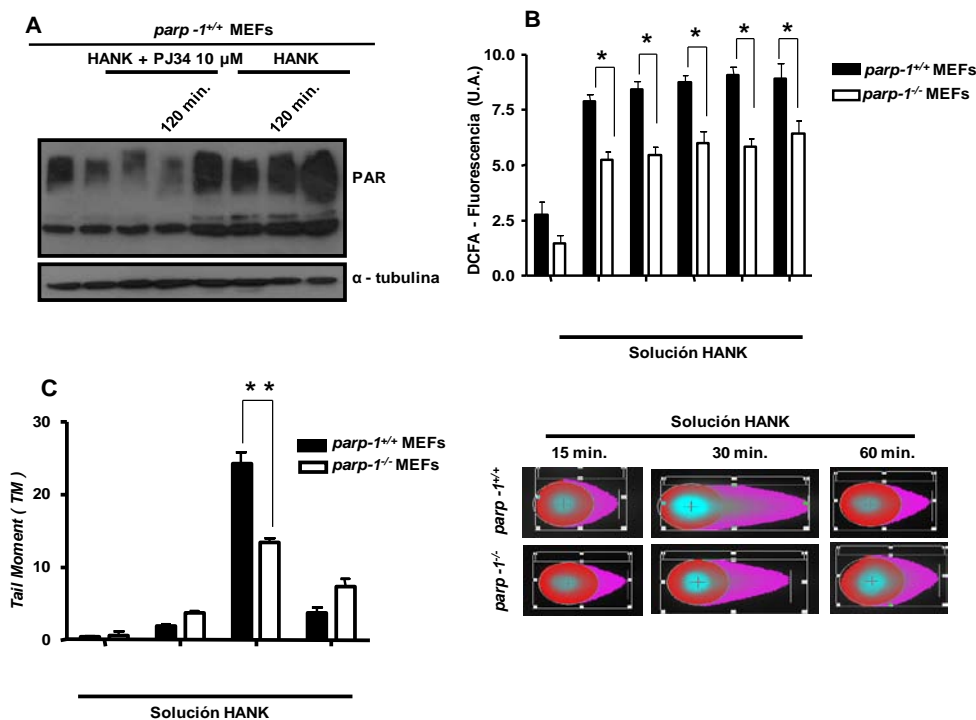


Figura 3: Poli (ADP-Ribosilación) y daños al ADN durante autofagia inducida por privación de nutrientes (I). (A) Análisis por *western blot* de la formación de polímero PAR durante privación de nutrientes. MEFs *parp-1*^{+/+} fueron privados de nutrientes a 30, 60 y 120 minutos con Solución HANK, mostrándose el resultado de PARilación con un anticuerpo específico de ADP-Ribosa. El inhibidor de PARPs, PJ34, se usó para confirmar la existencia de PARilación durante privación y H₂O₂ 10 mM como control positivo de PARilación y especificidad del anticuerpo. (B) Producción de ROS en MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} durante privación. Ambas líneas fueron sometidas a tiempos cortos de privación, en presencia de la sonda DCFDA 8mg/ml. Se muestra grado de fluorescencia como unidades arbitrarias por triplicados en 3 experimentos independientes. (C) Ensayo *COMETs* durante privación de nutrientes. MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} fueron privados de nutrientes a 15, 30 y 60 minutos y procesados según las instrucciones del ensayo. El parámetro *Tail Moment* fue analizado para al menos 90 núcleos en 3 experimentos independientes y en ambas líneas; se empleó el *software CASP*. En el panel de la derecha se muestran *COMETs* característicos de cada línea celular tiempos de 15, 30 y 60 minutos de privación. ** $p < 0.01$ para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} privadas. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. α -tubulina fue usada como control de carga.

Para confirmar la implicación de los ROS en las etapas iniciales de la autofagia, usamos el compuesto antioxidante N-Acetil-Cisteína (NAC, *N-Acetyl-Cysteine*). Las células expuestas a este compuesto, muestran una considerable reducción en los niveles de fosforilación γ -H2AX y en los niveles de procesamiento de la proteína LC3-II. Estos datos indican que la producción de ROS es un evento crucial no solo en la activación de PARP-1 por daños al ADN, sino

también en la señalización de las primeras etapas del proceso de autofagia (**Figura 3.E**). Junto al análisis bioquímico se acompaña una densitometría de los niveles de traslocación de la proteína LC3-II endógena y del grado de fosforilación de la histona γ H2AX.

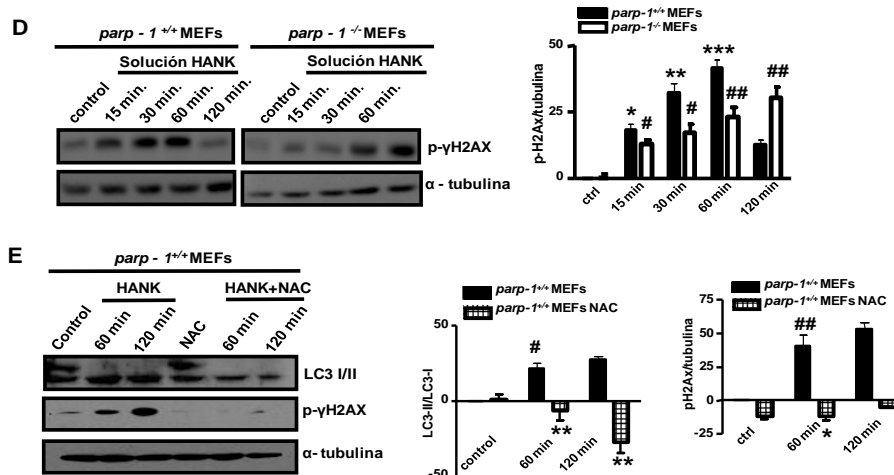


Figura 3: Poli (ADP-Ribosilación) y daños al ADN durante autofagia inducida por privación de nutrientes (II). (D) Fosforilación de la histona γ H2AX durante privación de nutrientes en extractos totales de MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} privados de nutrientes. * $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} control y tratadas. # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ para comparar MEFs *parp-1*^{-/-} controles y tratadas con Solución HANK. (E) Tratamiento con NAC reduce los niveles de translocación endógena de LC3-II. MEFs *parp-1*^{+/+} cotratados con Solución HANK no muestran activación de la histona γ H2AX y reducen los niveles de autofagia. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} NAC privados y solo privados con Solución HANK. α -tubulina fue usada como control de carga.

En resumen, todos los datos obtenidos muestran que durante la privación de nutrientes hay una importante producción de ROS en células MEFs *parp-1*^{+/+} privadas de nutrientes, que estos ROS inducen daños al ADN y activación de PARP-1. La consecuencia es la producción de polímero PAR y el desarrollo de autofagia asociada a dicha privación. En células MEFs *parp-1*^{-/-} a pesar de que también se generan ROS, no se produce un daño masivo al ADN ni la activación de PARP-1, en consecuencia en estas células hay un importante retraso y deficiencia en el proceso de autofagia cuando se las priva de nutrientes.

La pérdida de PARP-1 reduce la depleción de ATP, activación de AMPk y la inhibición de mTORC1, que se producen durante el proceso de autofagia inducida por privación de nutrientes.

La depleción energética, medida como el balance entre AMP y ATP intracelulares, es la señal que detecta la quinasa AMPk para iniciar el proceso de

autofagia. Para investigar si PARP-1 está implicada en la autofagia dependiente de AMPk, medimos los niveles de ATP en MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* a diferentes tiempos de privación nutricional con Solución HANK. Los niveles de ATP en MEFs *parp-1^{+/+}* disminuyeron por debajo del 50% de los niveles basales tras el tratamiento con Solución HANK durante 60 minutos, mientras que en MEFs *parp-1^{-/-}* disminuyeron mucho más lentamente (**Figura 4.A**). El tratamiento con 3-MA, bloqueó la caída en los niveles de ATP en MEFs *parp-1^{+/+}* privadas, indicando que esta caída está relacionada con la inducción de autofagia mediada por la activación de PARP-1 (**Figura 4.A**). El tratamiento con la 3-MA también tuvo efecto sobre MEFs *parp-1^{-/-}* donde la autofagia está bloqueada.

Consistente con una caída en los niveles de ATP, observamos una importante activación del sensor energético AMPk, por fosforilación directa de la quinasa LKB1 que determina el balance AMP:ATP, en MEFs *parp-1^{+/+}* privadas con solución HANK, mientras que esta activación estaba marcadamente inhibida en MEFs *parp-1^{-/-}* a los mismo tiempos de privación (**Figura 4.B**). La cuantificación densitométrica refleja la deficiencia de activación en MEFs *parp-1^{-/-}*. En apartados posteriores de esta tesis doctoral abordaremos con más profundidad las causas de este bloqueo de la ruta de AMPk en MEFs *parp-1^{-/-}* y analizaremos las consecuencias en la señalización de la ruta autofágica.

Del mismo modo que AMPk es considerada el sensor energético celular, mTORC1 es el sensor nutricional de la célula. La interconexión entre AMPk y mTORC1 va a controlar los procesos más importantes del anabolismo celular como la síntesis proteica y la biogénesis lipídica, y procesos catabólicos y de crecimiento celular, como es el caso de la autofagia (Hay and Sonenberg 2004). mTORC1 es considerado como un regulador negativo de la autofagia y AMPk como el principal inductor de autofagia durante estrés energético, capaz de inhibir la actividad de mTORC1 (Shaw, Bardeesy et al. 2004, Hoyer-Hansen and Jaattela 2007). Hemos evaluado los niveles de actividad de mTORC1 en MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* tratadas con Solución HANK en tiempos crecientes, midiendo los niveles de fosforilación de la quinasa p70^{S6k} que es sustrato directo de mTORC1 y que controla la síntesis de proteínas. Tiempos de privación comprendidos entre 15 y 30 minutos, fueron suficientes para inducir una completa inactivación de mTORC1 en MEFs *parp-1^{+/+}*,

mientras que en MEFs *parp-1*^{-/-} encontramos una inhibición parcial de su actividad a los mismos tiempos, prolongándose la fosforilación de p70^{S6k} incluso a tiempos de 60 minutos. Es más, a tiempos de casi 4 horas de privación, encontramos una recuperación importante de la actividad mTORC1 en MEFs *parp-1*^{-/-} (**Figura 4.C**) lo que nos podrá ayudar a comprender por qué la autofagia está enlentecida en esta línea celular.

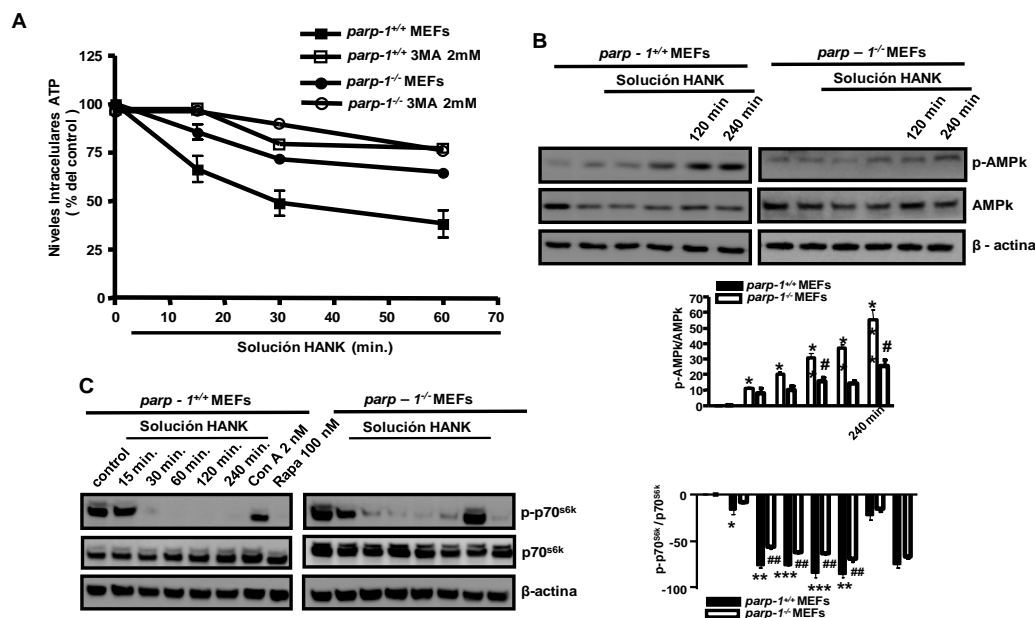


Figura 4: PARP-1 modula la activación de AMPk y la inhibición de mTORC1, durante autofagia inducida por privación de nutrientes (I). (A) Efecto de la privación de nutrientes sobre los niveles de ATP. MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} fueron privados de nutrientes a tiempos de 15, 30 y 60 minutos. Los niveles de ATP fueron normalizados con la concentración de proteínas de cada muestra y referidos como % del control. 3-MA como inhibidor de autofagia fue usada durante 1,5 horas de pretratamiento y mantenida durante la privación con Solución HANK. Las barras de error representan el Error Estándar de la Media o SEM de 5 experimentos independientes. (B) Activación de AMPk en MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} durante privación de nutrientes. Se usó un anticuerpo específico para la forma fosforilada de AMPk y los niveles de AMPk como control de uniformidad de expresión. (C) Análisis por *western blot* de la actividad de mTORC1 durante privación de nutrientes. MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} fueron privados de nutrientes y los niveles de inactivación de mTORC1 se midieron con grado de fosforilación de p70^{S6k}. Concanamicina 4nM fue usada como inductor de autofagia independiente de mTOR y Rapamicina como inductor dependiente de la inactivación de mTORC1. Total p70^{S6k} fue usada para normalizar la proteína fosforilada. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. β-actina fue usada como control de carga.

Es importante destacar que los tiempos donde encontramos inactivación total de mTORC1, coinciden con el momento donde los daños al ADN han provocado activación de PARP-1, depleción energética y activación de AMPk (aproximadamente 30 minutos de privación) (**Figuras 3.A, 4.A y 4.B**). El tratamiento con el antioxidante NAC, retardó la inactivación de mTORC1 inducida

por privación en MEFs *parp-1^{+/+}*, se empleó tiempos de 60 minutos donde la inactivación de mTORC1 es total (**Figura 4.D**). Se acompañan cuantificaciones para los ensayos de señalización de mTORC1 de las figuras 4.C y 4.D. Estos datos sugieren que PARP-1 podría controlar la actividad de mTORC1, posiblemente a través de la activación de AMPk, actuando como un inductor en la ruta de autofagia durante carencia nutricional y energética.

Para profundizar más en este hecho, analizamos el papel de PARP-1 en la regulación de mTORC1 en un modelo tumoral, concretamente en células MCF7 GFPLC3. En las células tumorales el balance energético es crucial para que la célula se adapte al microambiente tumoral, el cual suele caracterizarse por la carencia de nutrientes y las bajas concentraciones de oxígeno (Gogvadze, Orrenius et al. 2008, Tomitsuka, Kita et al. 2010). Durante la privación con Solución HANK, esta línea presenta la típica morfología punteada GFPLC3 bajo microscopía de fluorescencia (**Figura 4.E**).

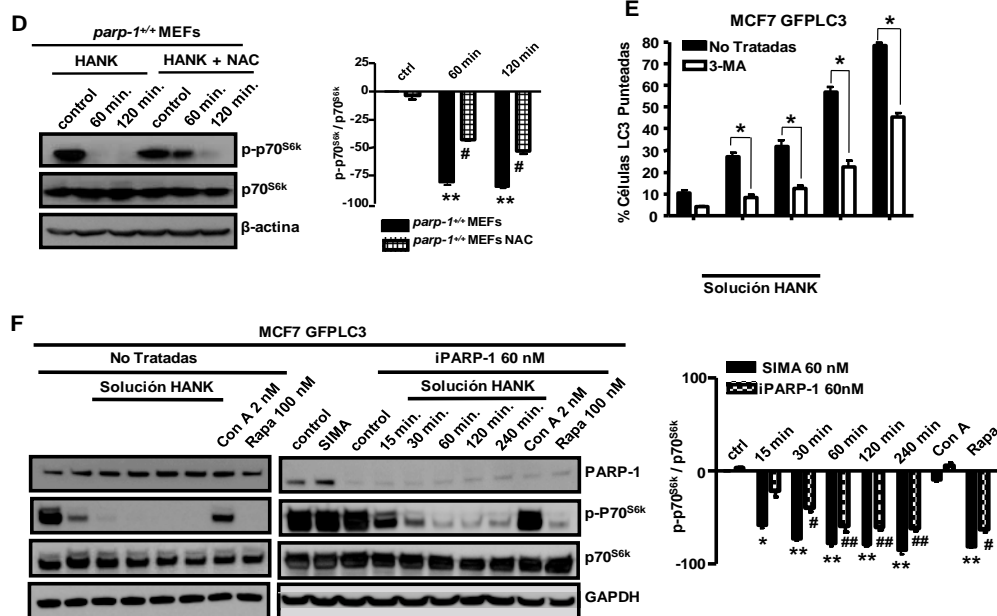


Figura 4: PARP-1 modula la activación de AMPk y la inhibición de mTORC1, durante autofagia inducida por privación de nutrientes (II). (D) Tratamiento con NAC redujo considerablemente la pérdida de actividad de mTORC1 durante privación de nutrientes, medida como grado de fosforilación de p70^{S6k}. **(E)** Inducción de autofagia en células MCF7 GFPLC3 durante privación de nutrientes con Solución HANK. Rapamicina 100 nM 4 horas fue usada como control positivo de autofagia. 3-MA bloqueó la inducción de autofagia durante privación.*p <0.01 para comparar MCF7 GFPLC3 controles y privadas de nutrientes. **(F)** Silenciamiento de PARP-1 previene de la total inhibición de mTORC1 durante privación de nutrientes. **Panel de la Izquierda:** muestra los niveles de activación de mTORC1, durante privación, por fosforilación de p70^{S6k}. **Panel de la Derecha:** Células MCF7 GFPLC3 fueron transfectadas con el siRNA humano para PARP-1 (60 nM) y sus controles con el siRNA no específico o SIMA. Concanamicina A y Rapamicina fueron usados como los controles positivos y p70^{S6k} para normalizar la forma fosforilada. Datos de la cuantificación densitométrica: * p<0.05, ** p<0.01 para comparar células MCF7 GFPLC3 controles y privadas de nutrientes. #p<0.05 y ## p<0.01 para comparar MCF7 GFPLC3 siPARP-1 con células SIMA privadas de nutrientes. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. β -actina fue usada como control de carga.

Las células MCF7 GFPLC3 fueron usadas para determinar los niveles de activación de mTORC1 durante privación de nutrientes, en presencia y ausencia de la proteína PARP-1 (**Figura 4.F**). En estas células, mTORC1 es rápidamente inhibido al tratar con Solución HANK, prácticamente a los 15 minutos de tratamiento, se pierde toda la señal de fosforilación de p70^{S6k} y las células entran en autofagia. El tratamiento con 3-MA retrasó la entrada en autofagia, confirmando la especificidad de la autofagia por privación con Solución HANK y además mantuvo inactivo a AMPk y activo a mTORC1 (**Figura S7.A y S7.B**). Cuando se silenció PARP-1 en esta línea, se obtuvo un importante retraso en la inhibición de mTORC1 durante privación, tal y como pudimos comprobar por los niveles de fosforilación de p70^{S6k} (**Figura 4.F**). Este retraso tanto en células *parp-1*^{-/-} como en silenciadas para PARP-1, indica que PARP-1 es capaz de regular la actividad del sensor nutricional celular mTORC1.

Para confirmar el grado de implicación de una eficiente maquinaria de reparación del ADN en las etapas iniciales de inducción de autofagia, trabajamos con las células de melanoma HT144, la cuales presentan la característica genética de ser deficientes en ATM y por tanto mantienen un sistema reparación del ADN poco eficaz. Al mismo tiempo se compararon con otra línea de melanoma humano sin esta deficiencia, g361 y se realizaron los ensayos y controles oportunos. En una primera aproximación, confirmamos que ambas se comportan de forma distinta en cuanto a reparación del material genético, cuando se les infringen daños directos por irradiación. Así vimos como las células HT144 son incapaces de reparar

correctamente los daños por irradiación a diferencia de las células g361. Para ello se determinaron los niveles de fosforilación de la histona γ H2AX (**Material Anexo Resultados Figura 2**). Es más, las células HT144 mantienen de forma basal gran cantidad de daños al ADN, tal y como indican los niveles de γ H2AX en células no irradiadas (**Material Anexo Resultados Figura 2, Figura S8.A**). Las células g361 (*ATM wild type*) acumularon daños al ADN durante privación e inhibición total de mTORC1 a partir de los 15 minutos con HANK. La actividad de mTORC1 también decreció muy rápidamente en HT144 con ATM mutada, pero una activación residual de la quinasa se mantuvo incluso después de los 30 minutos de privación (**Figura S8.A**). El marcador autofágico LC3-II, al igual que el recuento de células positivas para el punteado GFPLC3, fue muy inferior en células HT144 en comparación con g361, sometidas a los mismos tiempos de privación (**Figura S8.B y S8.C**). Si comparamos estos resultados con los obtenidos en MEFs *parp-1^{-/-}*, (también deficientes en reparación del ADN), podemos concluir que bajo un estímulo pro-autofágico como la retirada de nutrientes, hay una relación directa entre la eficiencia para reparar daños al ADN y la capacidad de la célula para desarrollar un programa adecuado de autofagia.

La deficiencia en la autofagia por inactivación de PARP-1, conduce a un incremento en la muerte celular apoptótica

La autofagia es considerada como un mecanismo de adaptación y supervivencia ante condiciones adversas, sin embargo, si estas condiciones se mantienen en el tiempo y los niveles de autofagia se vuelven excesivos, se desarrollará un proceso de muerte celular programada o Muerte Celular Autofágica (*Autophagic Cell Death ACD*) (Kroemer and Levine 2008). Las características morfológicas del proceso de muerte por autofagia están recogidas en la Introducción de esta tesis doctoral, pero básicamente podríamos definirla como un proceso que se desarrolla en ausencia de alteración de la cromatina y que se caracteriza por el acúmulo excesivo de autofagosomas en el citoplasma (Levine and Yuan 2005). Aquellas células que mantienen un programa adecuado de autofagia, podrán recuperar sus condiciones basales cuando el estímulo pro-autofágico haya cesado, por el contrario si se sobrepasara el Punto de No Retorno, aunque las condiciones ambientales fueran de nuevo óptimas, las células serían

incapaces de recuperar su estado de homeostasis y morirán por ACD. Para determinar qué proceso de muerte celular es el predominante durante la autofagia inducida por privación de nutrientes, en un contexto de inhibición o eliminación de PARP-1, se evaluó la presencia de caracteres tanto de la muerte celular por autofagia como por apoptosis, a tiempos elevados de privación.

Los análisis de muerte celular general durante cursos de tiempo de privación, mediante incorporación de Ioduro de Propidio, indicaron que la ausencia de PARP-1 acelera los niveles de muerte, es decir, la ausencia de PARP-1 vuelve más sensibles a las células tratadas con Solución HANK y hace que el Punto de no Retorno esté más próximo en el tiempo que en células *wildtype* (**Figura 5.A**). Tanto la inhibición de PARPs con PJ34 como el silenciamiento específico con siRNA, tuvo el mismo efecto sobre los niveles de muerte durante privación de nutrientes en MEFs *parp-1^{+/+}* que en MEFs *parp-1^{-/-}* (**Figura 5.A**); por lo tanto la ausencia de actividad PARP-1 acelera la aparición de muerte celular asociada a la privación nutricional. Todos estos resultados se confirmaron utilizando otros métodos de medición generales de muerte celular como son Tinción de Exclusión con Trypan Blue y ensayos de Viabilidad MTT, utilizando además otros inhibidores de PARPs, como el DPQ (**Material Anexo Figura 3**).

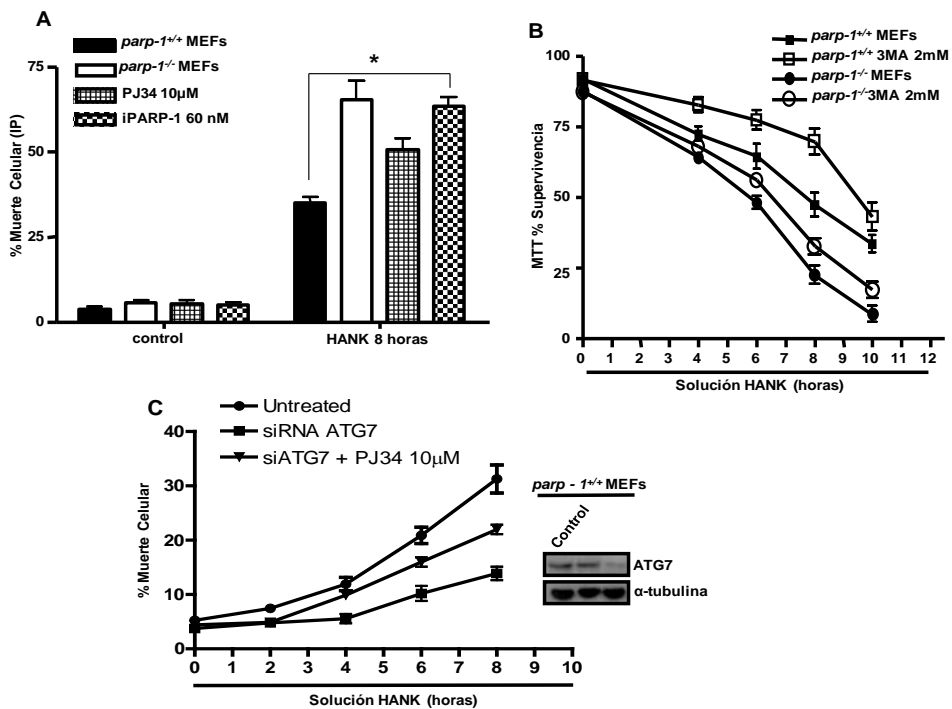


Figura 5: La eliminación de PARP-1 durante la retirada de nutrientes favorece la aparición de apoptosis (I). (A) Efecto de la inhibición de PARPs y el silenciamiento de PARP-1 sobre la viabilidad celular durante autofagia inducida por retirada de nutrientes. MEFs *parp-1^{+/-}* fueron sometidos al inhibidor de PARPs, PJ34 10 μ M, y al silenciamiento de PARP-1 (60nM). Células *parp-1^{+/-}* y *parp-1^{-/-}* fueron privadas con Solución HANK durante 8 horas y los niveles de muerte se midieron como grado de incorporación de IP por citometría de flujo en 3 experimentos independientes con 4 réplicas por condición. (B) Efecto de la 3-MA sobre los niveles de supervivencia en MEFs *parp-1^{+/-}* y *parp-1^{-/-}* durante la retirada de nutrientes. 3-MA fue usada como pretratamiento 1.5 horas y mantenida durante los tiempos de privación. Los niveles de viabilidad celular se determinaron por ensayo MTT. Se obtuvo resultado de 3 experimentos independientes con 5 réplicas por condición. (C) Efecto del silenciamiento de ATG7, combinado con PJ34 sobre la viabilidad celular durante privación de nutrientes. MEFs *parp-1^{+/-}* fueron silenciados para ATG (siRNA 70 nM) y tratados con PJ34 en combinación con Solución HANK. Los niveles de muerte celular se midieron por ensayo MTT. Se obtuvo resultado de 3 experimentos con 3 réplicas por condición.

De forma general la autofagia inducida por retirada de nutrientes, suele favorecer la adaptación y supervivencia celulares. El incremento de muerte celular durante privación en una situación en que eliminamos PARP-1, puede ser debido al retraso en la inducción de autofagia. Para determinar si la autofagia tiene un papel citoprotector en células PARP-1 *wildtype*, se inhibió la autofagia con 3-MA y se midió viabilidad celular con ensayos MTT, eligiendo el tiempo de 8 horas como aquél en que las diferencias en niveles de muerte son más acusadas (**Figura 5.B**). El bloqueo de la autofagia con 3-MA protege a MEFs *parp-1^{+/-}* frente a la muerte celular, mientras que no tiene efecto sobre células deficientes en PARP-1. Estos datos sugieren que las células con PARP-1 activa, principalmente mueren como consecuencia de una autofagia prolongada después de privarlas de nutrientes, mientras en las células con PARP inactivada se produce un proceso de muerte celular no autofágica (**Figura 5.B**). El silenciamiento específico de ATG7, redujo considerablemente los niveles de muerte celular en células MCF7 GFPLC3 sujetas a periodos más largos de privación (hasta 8 horas), mientras que el tratamiento con inhibidor de PARP PJ34 aumentó los niveles de muerte en células silenciadas para ATG7 y privadas de nutrientes. La conclusión es que la muerte celular derivada de autofagia no está involucrada en la gran mortalidad causada por la inhibición de PARP-1 (**Figura 5.C**).

Para analizar el tipo de muerte específico que tiene lugar en ausencia o inhibición de PARP-1 durante el tratamiento con Solución HANK, se utilizó una línea 3T3, carentes de las proteínas Bax y Bak (MEFs 3T3 *Bax^{-/-}/Bak^{-/-}*). Tanto Bax como Bak son proteínas esenciales en el proceso apoptótico, de modo que estas

células no desarrollan correctamente el proceso de apoptosis, concretamente no sufren caída de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (Caro-Maldonado, Tait et al. 2010). Este modelo de MEFs *Bax*^{-/-}/*Bak*^{-/-} nos permitiría establecer si los procesos de muerte asociados a la eliminación de PARP-1, son dependientes de la activación de apoptosis. Primero se determinó los niveles de autofagia en 3T3 *Bax*^{-/-}/*Bak*^{-/-} a distintos tiempos de privación, para comprobar que se comportaban de forma similar a las líneas 3T3 de que disponíamos. Las células 3T3 *Bax*^{-/-}/*Bak*^{-/-} presentan idénticos niveles de inducción de autofagia a MEFs *parp-1*^{+/+} tanto en morfología GFPLC3 como en el grado de procesamiento de la forma LC3-II endógena (**Figura 5.D**). Más aún, el co-tratamiento con 3-MA o con el inhibidor de PARPs DPQ, redujo considerablemente el porcentaje de células autofágicas a niveles cercanos a nuestra línea MEFs *parp-1*^{-/-}, tal y como ya se había constatado en MEFs *parp-1*^{+/+} (**Figura 5.E y 2.A**). Para determinar la importancia del componente apoptótico en la muerte celular inducida por ausencia de PARP-1, silenciemos PARP-1 en MEFs 3T3 *Bax*^{-/-}/*Bak*^{-/-}. La eliminación de PARP-1 en un contexto de ablación genética de Bax y Bak, reduce de forma significativa los niveles de muerte celular durante el tratamiento con Solución HANK (**Figura 5.E y 5.F**), indicando que la ganancia en muerte celular tras la eliminación de PARP-1 (en un contexto de MEFs 3T3 *Bax*^{-/-}/*Bak*^{-/-} con PARP-1, (Figura 5.A y 5.C) es debida a un componente apoptótico. Para confirmar este resultado medimos la actividad de distintas caspasas, concretamente la activación de caspasa 3/7 mediante ensayos fluorimétricos y caspasa 8 mediante *western blot*, con un anticuerpo específico que determina el procesamiento de su pro-caspasa. Un curso del tiempo de privación indicó la gran activación de las caspasas 3/7 en MEFs *parp-1*^{-/-}, con respecto a MEFs *parp-1*^{+/+} (**Figura 5.G**). Del mismo modo el procesamiento de la pro-caspasa 8 no tuvo lugar en MEFs *parp-1*^{+/+} privados de nutrientes (**Figura 5.H**). Otros criterios de apoptosis fueron analizados; así por ejemplo comprobamos por citometría de flujo que en MEFs *parp-1*^{-/-} el número de células apoptóticas dobles positivas para Anexina V y Ioduro de Propidio, fue muy superior al de MEFs *parp-1*^{+/+}; incluso la cuantificación de núcleos picnóticos fue muy superior en ausencia de PARP-1 (**Material Anexo Figura 4**). Todos estos datos indican que en células MEFs *parp-1*^{-/-} donde la deficiencia en autofagia es tan marcada, hay una importante tendencia a

morir por apoptosis cuando se sobrepasa un determinado tiempo de privación, tiempo que coincidirá con el Punto de no Retorno para MEFs *parp-1*^{-/-}. Células PARP-1 *wildtype*, a los mismos tiempos de privación, van a morir por un proceso de muerte celular dependiente de autofagia, sin embargo en estas células el Punto de no Retorno tarda más tiempo en ocurrir, por lo que la autofagia dependiente de PARP-1 otorga una capacidad de supervivencia y adaptación frente al estrés nutricional, con respecto a la situación de ablación de PARP-1.

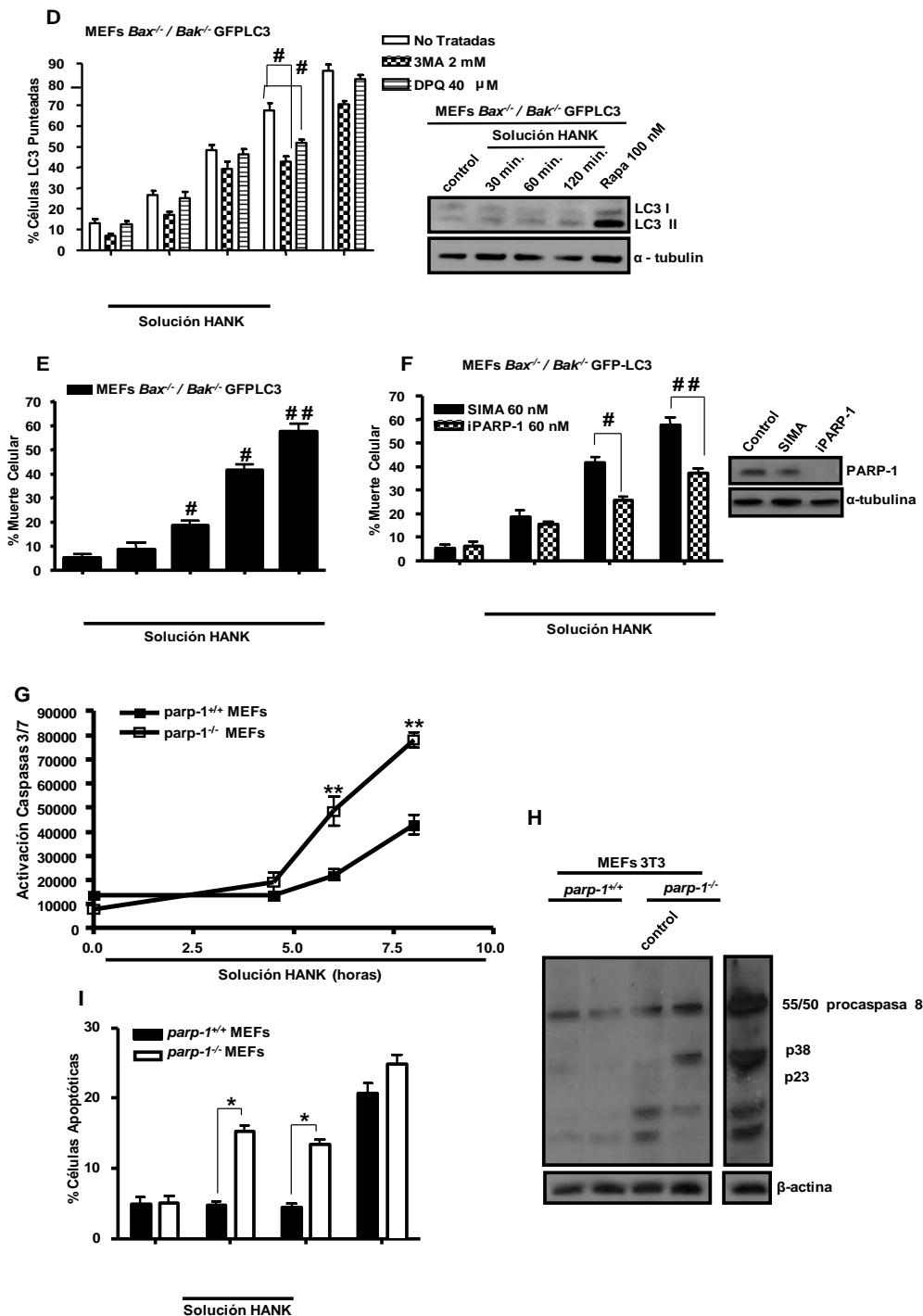


Figura 5: La eliminación de PARP-1 durante la retirada de nutrientes favorece la aparición de apoptosis (II). **(D)** Niveles de inducción de autofagia en MEFs 3T3 *Bax*^{-/-} / *Bak*^{-/-} GFPLC3. Translocación endógena de LC3-II y número de células autofágicas durante el tratamiento con Solución HANK. Rapamicina se usó como control positivo de autofagia. 3-MA y DPQ se añadieron como pretratamiento durante 1.5 horas y se mantuvieron durante la privación. #p<0.05 para comparar MEFs 3T3 *Bax*^{-/-} / *Bak*^{-/-} GFPLC3 no tratadas y privadas con tratadas con 3-MA o DPQ privadas. **(E)** Muerte celular por incorporación de IP en MEFs 3T3 *Bax*^{-/-} / *Bak*^{-/-} GFPLC3 durante retirada de nutrientes. 3 experimentos independientes con 3 réplicas por condición. **(F)** Efecto del siPARP-1 (60nM) sobre los niveles de muerte celular inducida por la privación de nutrientes. MEFs 3T3 *Bax*^{-/-} / *Bak*^{-/-} GFPLC3 fueron transfectadas con siRNA y son SIMA, privadas de nutrientes. Incorporación de IP por citometría de flujo. 3 experimentos independientes con 4 réplicas por condición. #p<0.05, ##p<0.01 para comparar MEFs 3T3 *Bax*^{-/-} / *Bak*^{-/-} GFPLC3 SIMA y MEFs 3T3 *Bax*^{-/-} / *Bak*^{-/-} GFPLC3 siPARP-1 privadas.

Figura 5: Continuación: **(G)** Actividad de Caspasa 3/7 en MEFs 3T3. MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} fueron privados de nutrientes a tiempos suficientes para inducir apoptosis. Las unidades de luminiscencia correspondientes a la actividad de las caspasas se midió en un aparato *TECAN infinite 200 Luminometer* según las instrucciones del kit *Caspase Glo 3/7*. Cada punto representa la media de 3 réplicas o mediciones por condición de 3 experimentos independientes. **p<0.01 para comparar MEFs *parp-1*^{-/-} privadas con MEFs *parp-1*^{+/+} privadas. **(H)** Activación de caspasa 8 en MEFs *parp-1*^{-/-} tratados con Solución HANK a 6 horas. Extractos de células Jurkat irradiadas fueron usados como control positivo de activación de caspasa 8. β -actina fue usada como control de carga en 3 experimentos independientes. **(I)** Porcentaje de células apoptóticas durante privación MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} fueron privadas de nutrientes 6 y 8 horas y se determinó el porcentaje de células doble positivas para IP y Anexina V por citometría de flujo. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes con 3 réplicas por condición. STS 4 μ M fue usado como control positivo de inducción de apoptosis. * p<0.05 para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} privadas de nutrientes.

Ratones deficientes en PARP-1, presentan una alteración en la autofagia durante carencia nutricional

Para confirmar las consecuencias *in vivo* de la eliminación de PARP-1 sobre el proceso de autofagia, sometimos a ayuno a un grupo ratones neonatos *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} retirados de la madre en el momento de nacer y mantenidas en privación durante 4 horas, siguiendo estrictamente la reglamentación de Bioética. Posteriormente se sacrificaron y se procesaron los hígados de ambos modelos para la obtención de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM), según está recogido en el apartado de material y métodos.

El análisis TEM mostró que los hígados procedentes de ratones *parp-1*^{+/+} presentaban características típicas de órganos en crecimiento y mantenimiento continuo, en cuanto a número y morfología mitocondrial y en la presencia de vesículas lipídicas o *Lipid Droplets* tan característicos en hepatocitos. Bajo condiciones de privación, en los hígados observamos cambios estructurales debidos a un proceso activo de autofagia como es la presencia de estructuras con

doble membrana concéntrica que incluían material citosólico (autofagosomas), dilatación del Retículo Endoplasmático, dilatación del Aparato de Golgi y una importante acumulación de gotas lipídicas (*Lipid Droplets*), lo que indicaba movilización lipídica (**Figura 6.A Panel Superior**). Todas estas características morfológicas no se presentaban en hígados de ratones no sometidos a privación. Las estructuras membranosas concéntricas reflejan degradación de componentes celulares membranosos, presumiblemente orgánulos, que se reordenan en verticilos membranosos llamados Figuras de Mielina. Las imágenes de TEM de hígados de ratones *parp-1*^{-/-} muestran importantes diferencias en la morfología ultraestructural tanto en el grupo de controles alimentados como en animales privados. Así en hígados *parp-1*^{-/-} privados encontramos un Retículo Endoplasmático bien organizado, no hay dilatación del Golgi, tampoco aparecían estructuras membranosas concéntricas y prácticamente no existía movilización lipídica (**Figura 6.A Panel Abajo**). Para refutar esta información, se extrajeron proteínas totales de hígados de ambos grupos de animales (alimentados y privados) y se midió la translocación endógena de LC3-I. No se pudo analizar la proteólisis y lipidación hacia la forma LC3-II en estas muestras. La reducción de la forma LC3-I fue mucho más pronunciada en ratones ayunados *parp-1*^{+/+} que en ratones *parp-1*^{-/-} y con respecto a sus controles respectivos (**Figura 6.B**).

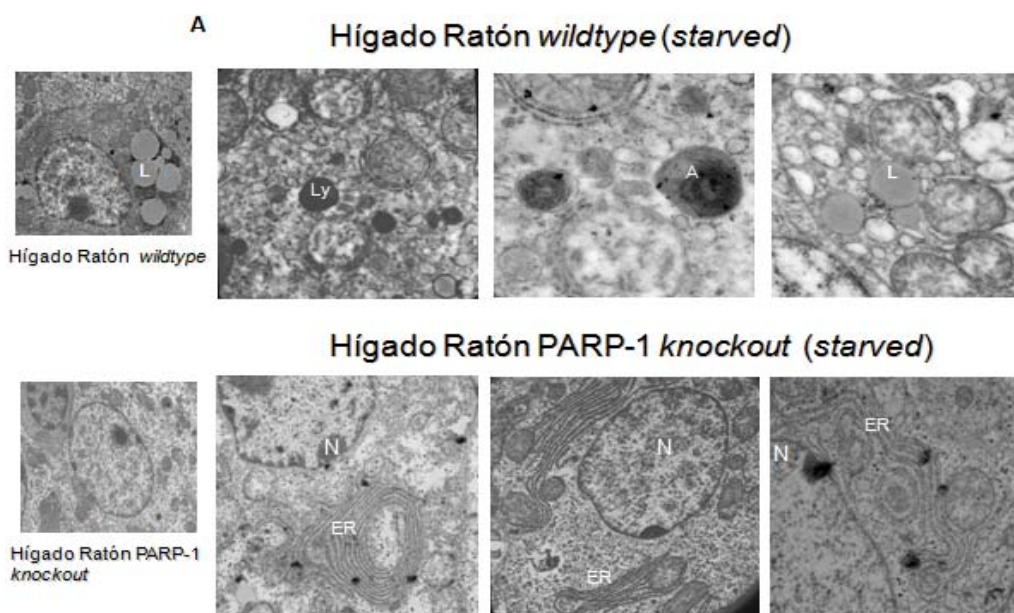


Figura 6: Autofagia deficiente en hígados de ratones PARP-1 *knockout* (I). (A) Dos horas después de su nacimiento, crías de ratones *wildtype* y *knockout* para PARP-1 fueron separadas de sus madres y sometidas a privación nutricional, siguiendo las normas aprobadas por el comité de bioética animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Las crías fueron sacrificadas y se extrajeron los hígados que se dividieron en grupos para preparación de muestras de microscopía electrónica de transmisión (TEM) o para el análisis bioquímico del marcador autofágico LC3. A: autofagosomas que muestran estructuras membranosas concéntricas, ER: Retículo Endoplasmático, L: *Lipid Droplets*, Ly: Lisosomas, N: Núcleo Celular.

El almacenamiento y uso de los lípidos intracelulares es crítico para el mantenimiento de la homeostasis energética celular. Los lípidos celulares son mantenidos en forma de Triglicéridos (como vesículas lipídicas), en hígados que se encuentran en una situación normal en cuanto a disponibilidad de nutrientes y energía. Para obtener energía desde estas fuentes lipídicas se necesita hidrolizar los triglicéridos hacia ácidos grasos. Una segunda respuesta celular a la carencia de nutrientes, esencialmente aminoácidos, e independiente del consumo de proteínas intracelulares, es movilizar estos acúmulos lipídicos en ausencia de fuentes externas de proteínas. Para confirmar que hígados de ratones *parp-1^{-/-}* no acumulan ni movilizan lípidos durante privación de aminoácidos (**Figuras 6.A y 6.B**) usamos la sonda para marcaje fluorescente lipídica BODIPY. El marcaje con BODIPY reveló que la cantidad de vesículas lipídicas en células *parp-1^{-/-}* era considerablemente inferior al que presentaban células con PARP-1 (**Figura 6.C**). Por lo tanto la conclusión que se obtiene es que hígados de ratones *parp-1^{-/-}* presentan una respuesta autofágica muy inferior a la de ratones normales ante privación de nutrientes.

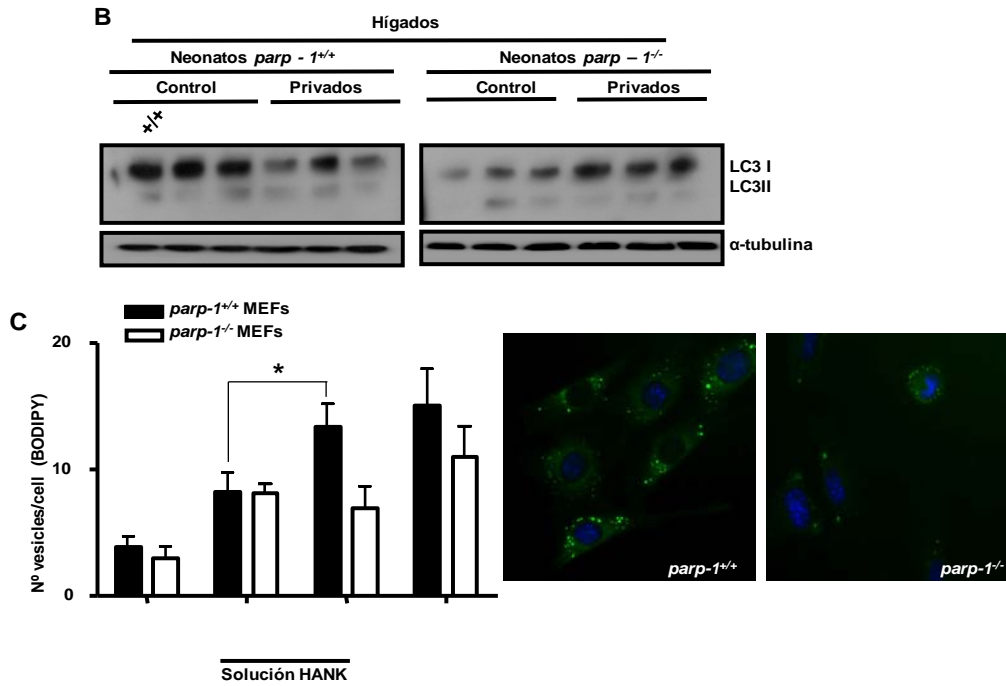


Figura 6: Autofagia deficiente en hígados de ratones PARP-1 *knockout* (II). (B) Análisis *western blot* de los niveles de proteínas LC3-I en muestras de hígados de ratones PARP-1 *wildtype* y *knockout*. α -tubulina fue usada como control de carga. Al menos 6 ratones de cada genotipo fueron usados, divididos en 2 grupos, control y privados de nutrientes. (C) Vesículas lipídicas en MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-}. Ambas líneas fueron privadas con Solución HANK e incubadas con la sonda lipídica BODIPY. 3 muestras por condición de 3 experimentos independientes fueron recontadas bajo microscopía de fluorescencia. Cloroquina 20 μ M 2 horas fue usada como control de movilización de vesículas lipídicas. * $p < 0.01$ para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} privadas de nutrientes.

Discusión

Los factores genéticos y ambientales modulan la respuesta de los organismos multicelulares al estrés. El mantenimiento de la homeostasis tisular y los patrones de respuesta se encuentran tremendamente regulados e integrados de forma crítica en las células. El fin último de estos patrones es conseguir la adaptación y supervivencia celular y el mantenimiento del organismo completo; sin embargo los mecanismos y la forma en que se coordinan e integran aún no está del todo dilucidada. En este trabajo demostramos que una ruta tan esencial en el mantenimiento de células y tejidos, como es la autofagia, necesita de una adecuada activación de la proteína nuclear PARP-1 para su correcto desarrollo en respuesta a un estrés por carencia de nutrientes. Nuestros resultados también muestran claramente que la pérdida de la actividad PARP-1 está acompañada de una inhibición del sensor energético celular AMPk. Este resultado está en consonancia

con el hecho de que PARP-1 está relacionada con el metabolismo del AMP, a través de la hidrólisis de moléculas de ADP-Ribosa (Formentini, Macchiarulo et al. 2009).

En ausencia de PARP-1 o después de su inhibición/silenciamiento, los niveles de ATP no caen tanto como ocurre en células con PARP-1 funcional (**Figura 4.A**); en consecuencia AMPk se mantiene inactiva y no señala hacia la inactivación del complejo mTORC1 lo que conlleva a que la autofagia se encuentre detenida o retrasada. Aún no se conoce cómo PARP-1 y AMPk están interactuando en el modelo de autofagia. Una posibilidad es que los daños al ADN inducidos por los ROS generados por una disfunción mitocondrial y liberación de Ca^{+2} durante privación, produzcan una sobreactivación de PARP-1 y ello favorezca que se active AMPk (Hoyer-Hansen and Jaattela 2007). Otra posibilidad que podría explicar cómo PARP-1 conecta con la señalización AMPk/mTORC1 (eje encargado del mantenimiento de la homeostasis energética) es que la inactivación de PARP-1 conduzca a una ineficiente respuesta de ATM ante daños al ADN, lo cual se ha demostrado que está relacionado con la activación de AMPk (Aguilar-Quesada, Munoz-Gamez et al. 2007, Haince, Kozlov et al. 2007).

Nuestros datos sugieren que la proteína PARP-1 es un importante regulador *in vivo* de la autofagia y proponen un nuevo nexo entre la función de PARP-1 con la respuesta general celular a la escasez de nutrientes. Los resultados demuestran que la privación de nutrientes, producción de ROS y daños al ADN, conducen a la activación de PARP-1, lo cual es necesario para que la célula ponga en marcha la maquinaria autofágica.

También hemos demostrado que el papel de PARP-1 en la autofagia inducida por privación de nutrientes, está relacionado con la capacidad de la proteína para localizar y señalar daños al ADN y provocar una depleción energética tras su sobreactivación, sin embargo no hemos sido capaces de excluir la posibilidad de una perturbación en el flujo intracelular de Ca^{+2} tras la ablación de PARP-1, evento anterior a la deficiencia en la síntesis de ATP mitocondrial y la activación de AMPk (Cardenas, Miller et al. 2010).

Además hemos analizado las consecuencias *in vivo* de la eliminación de PARP-1 durante privación de nutrientes. La carencia nutricional induce autofagia

hepática e incrementa la liberación de ácidos grasos hacia el hígado, por lipólisis del tejido adiposo. Ensayos de microscopía electrónica revelaron que la autofagia incrementa la presencia de vesículas lipídicas o *Lipid Droplets*, además de un incremento de estructuras membranosas asimétricas, generalmente autofagosomas, en las muestras analizadas. El papel crucial de la autofagia neonatal ha sido claramente demostrada a través de la inactivación específica de genes pro-autofágicos como ATG5 o ATG7 (Kuma, Hatano et al. 2004, Komatsu, Waguri et al. 2005). Ratones deficientes en ambos genes, aparentemente no presentaban rasgos diferenciales en el momento de su nacimiento, salvo por una ligera pérdida de peso con respecto a animales *wildtype* (aproximadamente un 10% en ratones *atg5^{-/-}* y un 18% en ratones *atg7^{-/-}*), pero murieron un día después de su nacimiento. Uno de los fenotipos de ratones *parp-1^{-/-}* presenta un tamaño menor a los animales *wildtype* (aproximadamente un 40%) (de Murcia, Niedergang et al. 1997). Por lo tanto sería muy interesante intentar dilucidar si esa reducción en el tamaño corporal que acompaña a la ausencia de PARP-1, está relacionada con una deficiencia genética en autofagia.

Se ha demostrado que los ROS son importantes moléculas señalizadoras de la ruta de autofagia en multitud de líneas celulares y en respuesta a diversos estímulos, incluyendo la privación de nutrientes (Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007). Teniendo en cuenta el papel de supervivencia y adaptación celular que tiene la autofagia, nuestros resultados apoyan la idea de que PARP-1 es necesaria para que la célula mantenga activa la autofagia en respuesta a privación nutricional que se prolonga en el tiempo (**Figura 5.B**). En este sentido hemos demostrado que la ausencia o la inactivación de PARP-1, en un contexto de privación prolongada de nutrientes, provoca un incremento en la muerte celular. Además hemos definido el mecanismo por el cual la supresión de la actividad PARP-1 acelera la muerte celular, usando líneas celulares deficientes en apoptosis, concretamente deficientes en las proteínas Bak y Bax. Hemos demostrado que la privación de nutrientes en células *bax^{-/-}/bak^{-/-}*, conduce primero a autofagia y a continuación a muerte celular, la eliminación de PARP-1 en células *bax^{-/-}/bak^{-/-}* privadas de nutrientes redujo sustancialmente los niveles de muerte celular, en contraposición a lo observado en líneas con la apoptosis activa.

Otra observación importante es que hemos demostrado que un estrés tan fisiológico como es la privación de nutrientes, es capaz de inducir daños al ADN, a través de la generación de ROS. Se sabe que el estrés genético reprime a mTOR en respuesta a estrés oxidativo, generalmente causado por ROS a través de la señalización citosólica de la ruta LKB1/AMPk/TSC2 (Nakada, Saunders et al. 2010). Los ensayos COMETs y la acumulación de *foci* de la histona γ H2Ax confirman la existencia de daños al ADN y demuestran que los niveles iniciales de daño se corresponden con la capacidad de la célula para iniciar los procesos de autofagia. El tratamiento con el antioxidante NAC impide los daños al ADN y la inactivación de mTORC1, con lo cual retrasa la entrada en autofagia.

¿Por qué las células deficientes en PARP-1 mueren por apoptosis cuando se las priva de nutrientes? Una posibilidad interesante la sugieren los resultados de las **figuras 3.C y 3.D**: células carentes en PARP-1 presentan una deficiencia en la reparación de ADN durante privación de nutrientes; debido a esto la célula “elige” morir por apoptosis evitando así acumular daños en su material genético. En un contexto tumoral, donde el oxígeno y los nutrientes son limitados, esta deficiencia en autofagia (sumada a la tendencia a morir por apoptosis en ausencia de PARP-1) aportaría beneficios, evitando que ocurran fenómenos de necrosis, generación de ROS y procesos inflamatorios, lo que podrían retrasar o bloquear el crecimiento tumoral.

La razón última por la cual la ausencia o inhibición de PARP-1, conduce a una inhibición en la producción de ROS, no está totalmente dilucidada. Estudios recientes muestran que las alteraciones en la función mitocondrial durante fenómenos de citotoxicidad inducidos por estrés oxidativo, están más relacionados con la activación de PARP-1 que con el efecto oxidante sobre la mitocondria (Virag, Salzman et al. 1998). Las rutas de señalización del Ca^{+2} mitocondrial son mediadores esenciales en la regulación bioenergética celular y en los procesos de muerte celular. La señalización constitutiva InsP(3)R Ca^{+2} es necesaria para suprimir la autofagia en la mayoría de las células, cuando se encuentran ante disponibilidad de nutrientes. Se ha demostrado que tras la privación de nutrientes, las células mantienen disminuido los niveles de Ca^{+2} mitocondrial para evitar este fenómeno (Cardenas, Miller et al. 2010). Recientemente se ha demostrado que

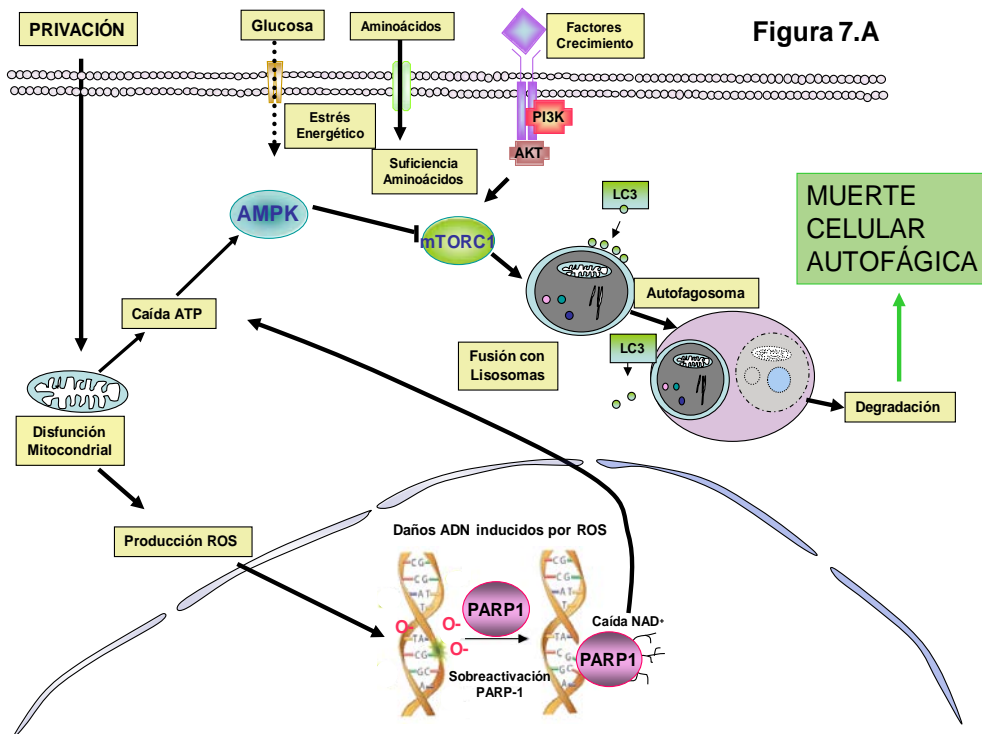
tanto PARP-1 como la proteína Poli ADP-Ribosa Glicohidrolasa o PARG son capaces de regular el flujo de Ca^{+2} a través de la proteína TRPM2 (Blenn, Wyrsh et al. 2011). En el trabajo de Blenn y colaboradores (Blenn, Wyrsh et al. 2011), han demostrado que el incremento en el flujo de Ca^{+2} que acompaña al tratamiento con H_2O_2 , conduce a una activación de las caspasas y a un procesamiento de la proteína proapoptótica mitocondrial AIF. AIF se trasladaría al núcleo donde favorece la fragmentación del ADN, condensación de la cromatina y muerte celular apoptótica. Claramente los niveles de ROS derivados de citotoxicidad y la activación de PARP-1, difieren en varios niveles. Mientras los tratamientos con H_2O_2 producen una “explosión” en la producción de mediadores oxidativos, la privación de nutrientes conlleva una generación de ROS insuficiente como para inducir muerte celular, promoviendo supervivencia a través de la inducción de autofagia, por lo tanto la activación mediada por ROS iría encaminada a evitar la muerte por apoptosis en un contexto de estrés oxidativo. Apoyando esta teoría Scherz-Shouval y colaboradores, han demostrado que los ROS en la autofagia inducida por privación de nutrientes, favorecen que la célula se adapte y sobreviva al estrés (Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007). Este grupo muestra que las condiciones oxidativas son esenciales para la autofagia y que el incremento en ROS es localizado y con carácter reversible durante la privación, lo cual favorece fenómenos de oxidación de dianas moleculares específicas. Por el contrario, la generación masiva de ROS durante un estrés oxidativo, conducirá a una muerte celular inducida por ROS y mediada por autofagia (Yu, Alva et al. 2004). Nosotros hemos demostrado que en un contexto de eliminación de PARP-1, un estrés oxidativo derivado de privación de nutrientes, genera fenómenos de apoptosis. La conclusión es que PARP-1 es necesaria para que las células disparen fenómenos de supervivencia a través de la autofagia.

El modelo que proponemos aparece en la **Figura 7** y puede ser resumido de la siguiente forma: Tras la privación de nutrientes, se ve afectado rápidamente el metabolismo mitocondrial, conduciendo a la generación de ROS y a una caída importante en los niveles de ATP. El desbalance entre los niveles de AMP y ATP en favor del AMP, activa a la quinasa AMPk que actuaría como sensor energético celular. La activación de AMPk conduce a la inactivación del sensor nutricional mTORC1, permitiendo que la autofagia tenga lugar. En paralelo, los ROS son

rápidamente traslocados al núcleo celular donde generan daños al ADN, que a su vez activan a PARP-1, iniciándose la reparación del ADN dañado. La sobreactivación de PARP-1 que se genera durante privación, hace que se produzca una caída importante en los niveles de ATP y NAD⁺ por la propia actividad PARP; en consecuencia estaremos ante un sistema de *feedback* que retroalimenta la activación de AMPk. En este escenario, el eje ROS/AMPk/mTORC1 y ROS/Daños al ADN/PARP-1 sinergizan para optimizar la respuesta celular a la carencia de nutrientes, mediante la inducción de autofagia. En este caso la autofagia tiene un papel de mecanismo de adaptación y supervivencia celular ante condiciones adversas **(Figura 7.A)**.

En ausencia de actividad PARP-1, la producción de ROS, depleción energética y activación de AMPk se encuentran disminuidas; del mismo modo el ciclo de retroalimentación sobre el eje ATP/AMPk que ejercía la sobreactivación de PARP-1, no se va a producir. La conclusión es una inactivación parcial de mTORC1 y un importante retraso en la inducción de autofagia. Alternativamente al mecanismo de autofagia, durante la ausencia o inhibición de PARP1, se desarrollará la apoptosis como mecanismo de muerte celular en respuesta a la privación de nutrientes **(Figura 7.B)**.

PARP-1 ES UN MODULADOR POSITIVO DE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR PRIVACION



PARP-1 ES UN MODULADOR POSITIVO DE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR PRIVACION

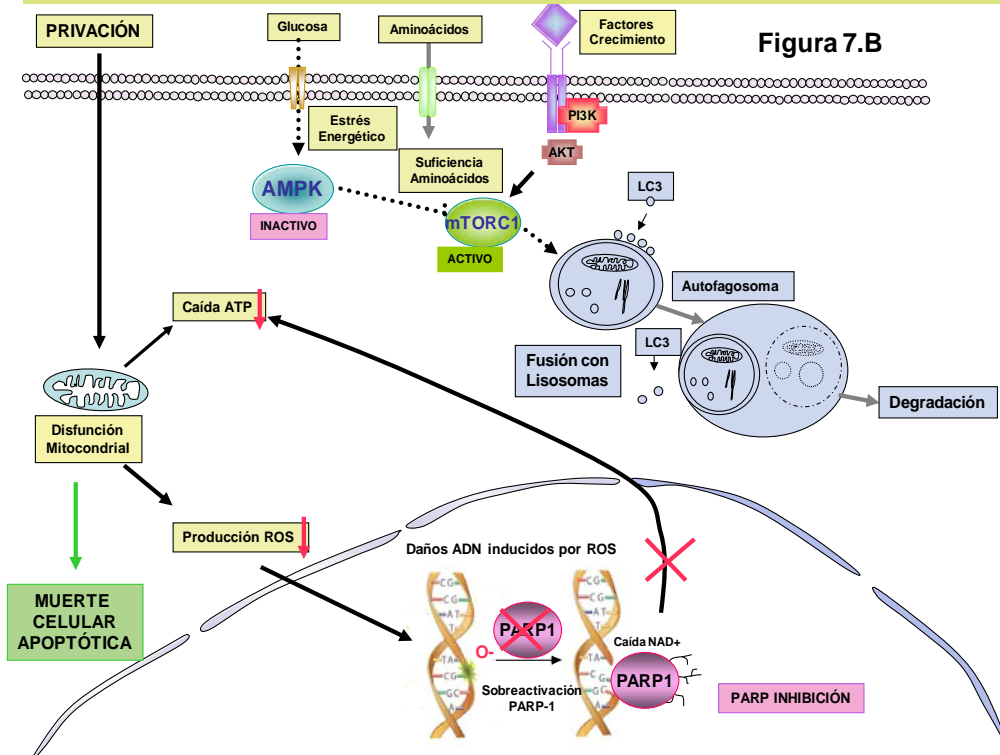


Figura 7: (A) PARP-1 es un modulador positivo de la autofagia inducida por privación de nutrientes. Durante la privación de nutrientes, las células entran en autofagia a partir de la activación de AMPk y la inhibición de mTORC1. Eventos anteriores a esta regulación son la depleción energética, producción de ROS y generación de daños al ADN. Bajo estas condiciones, la sobreactivación de PARP-1 provoca una mayor depleción en ATP que actúa como retroalimentador para reactivar la autofagia. Si el estrés se mantiene en el tiempo se desarrollan fenómenos de muerte celular con características autofágicas. **(B) Inactivación de PARP-1, retrasa la autofagia y favorece la apoptosis.** En ausencia de PARP-1 o cuando se inactiva, los niveles de ROS caen y la depleción en ATP es menor. Como consecuencia el *feedback* que ocurre sobre la autofagia por la activación de PARP-1, no tiene lugar. Si la privación se mantiene en el tiempo, estas células mueren por apoptosis.

La autofagia se considera como un potente mecanismo supresor de tumores, presumiblemente porque contribuye al mantenimiento de la estabilidad genómica (Karantza-Wadsworth, Patel et al. 2007), porque evita la formación de ROS (Mathew, Karp et al. 2009) y por su relación con los fenómenos de senescencia celular (Young, Narita et al. 2009). Por todo ello representa una barrera importante contra la carcinogénesis. De acuerdo con lo expuesto, existen muchos genes encargados de regular la inducción y ejecución de la autofagia, que son considerados como potentes supresores tumorales. En este grupo podemos incluir a PTEN, TSC1-TSC2, LKB1, ATG4, Beclin-1, UVRAG o las proteínas BH3-*only* pertenecientes a la familia Bcl-2 (Ma and Cline 2010). En este trabajo, analizamos el papel de PARP-1 como proteína que va a ser capaz de regular la inducción de autofagia desde una situación fisiológica, hasta la presencia de un estrés nutricional. Teniendo en cuenta que los inhibidores de PARPs están siendo utilizados como potentes drogas antitumorales en distintos ensayos clínicos, podemos considerar a la proteína PARP-1 y su actividad como una importante diana farmacológica. Considerando la disponibilidad de nutrientes como una barrera continua al crecimiento tumoral y teniendo en cuenta la capacidad de los inhibidores de PARP-1 para inducir apoptosis durante la carencia nutricional, tenemos a nuestra disposición una herramienta que podría tener gran proyección frente al avance tumoral. El mecanismo molecular por el cual PARP-1 y su actividad va a regular las fases iniciales de la formación del autofagosoma, será motivo de estudio en el siguiente capítulo de esta tesis doctoral.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

CAPÍTULO I

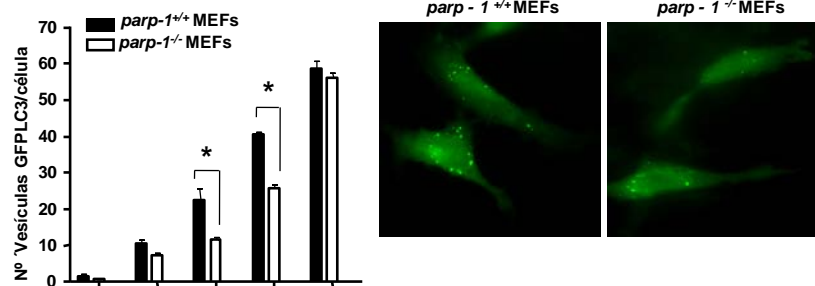


Figura S1: Recuento de vesículas positivas para el marcaje GFP-PLC3 en MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-}. Ambas líneas se privaron de nutrientes y se hizo un recuento de aproximadamente de las vesículas de 250 células de 3 experimentos independientes con 3 réplicas por condición. Rapamicina fue usada como control positivo de autofagia. El panel de la izquierda muestra imágenes representativas de microscopía de fluorescencia para GFP-PLC3. * $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} privadas de nutrientes.

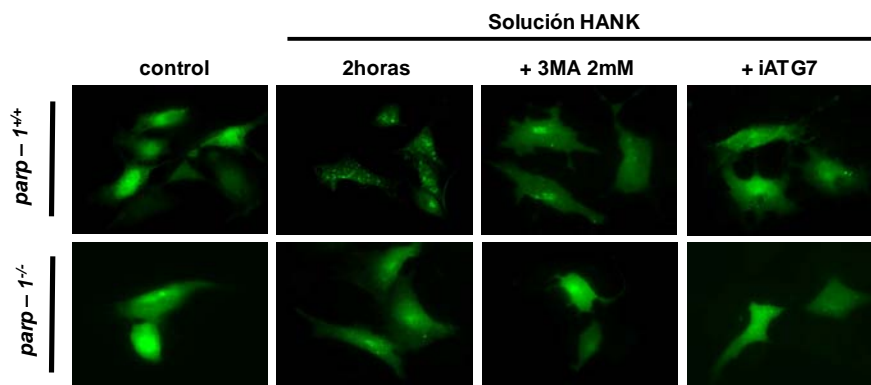


Figura S2: Efecto de la inhibición con 3-MA o el silenciamiento de ATG7 40 nM sobre los niveles de autofagia inducida por privación de nutrientes en MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-}. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes con 3 réplicas por condición, obtenidas bajo microscopía de fluorescencia en ambas líneas celulares.

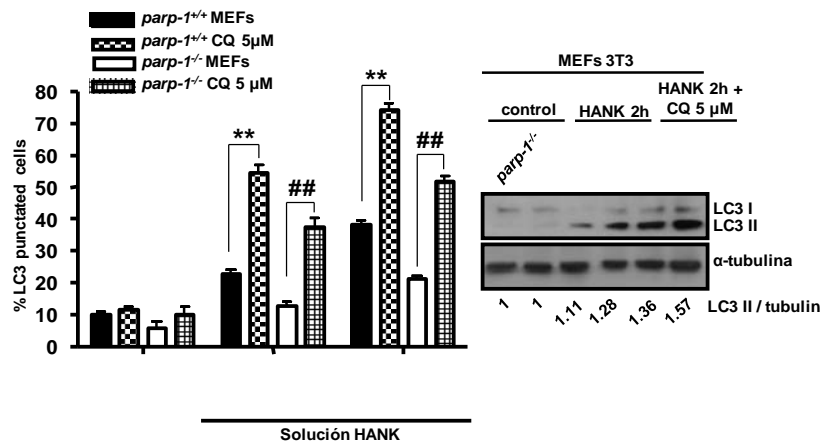


Figura S3: (A) La fusión del autofosoma con los lisosomas no está afectada en MEFs *parp-1*^{-/-}. El tratamiento con Cloroquina para inhibir la fusión con los lisosomas, resultó en un incremento similar en el número de células punteadas para GFPLC3 durante privación en MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-}, además de no presentarse diferencias en el grado de translocación de LC3-II. ** p<0.01 para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} privados y tratados con cloroquina; ## p<0.01 para comparar MEFs *parp-1*^{-/-} privados y tratados con cloroquina.

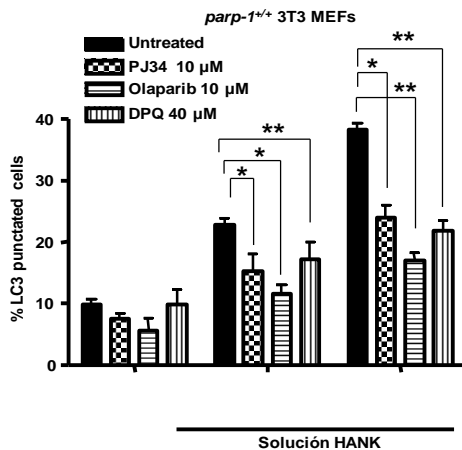


Figura S3: (B) Retraso en la autofagia inducida por privación en MEFs *parp-1*^{+/+} cuando se cotratán con dos inhibidores de PARPs, PJ34 y Olaparib. *p<0.05 para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} privadas y tratadas con PJ34, *p<0.05 y ** p<0.01 para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} privadas y tratadas con Olaparib. Resultado similar obtenido de 3 experimentos independientes, recuento de al menos 200 células bajo microscopía de fluorescencia

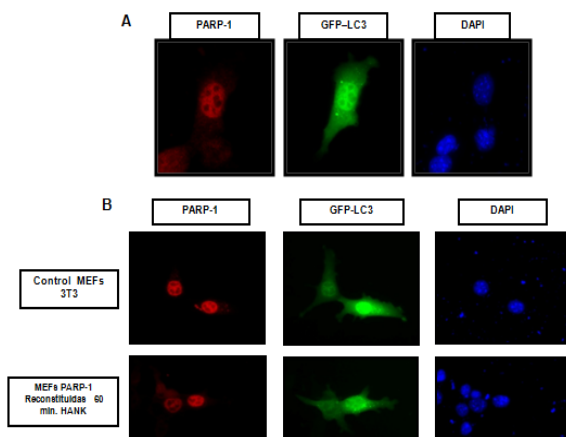


Figura S4: La reconstitución de PARP-1 en MEFs *parp-1*^{-/-} restaura los niveles de autofagia. (A) MEFs *parp-1*^{-/-} reconstituidos con pBC-PARP-1 muestran la señal de PARP-1 en el núcleo y transfectados con GFPLC3 mostrando el patrón verde GFPLC3 difuso entre citosol y núcleo. (B) MEFs *parp-1*^{-/-} con PARP-1 restaurada, recuperan la respuesta ante retirada de nutrientes y muestran un patrón de vesículas GFPLC3 similar a la línea *wildtype*.

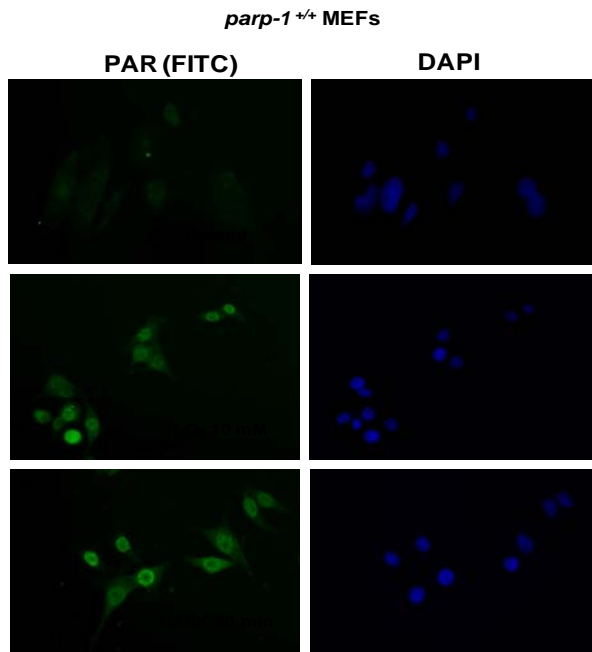


Figura S5: La producción de Polímero PAR confirma la sobreactivación de PARP-1 durante la privación de nutrientes. Inmunofluorescencia de PAR en MEFs *parp-1^{+/+}* tratados con Solución HANK y usando como control positivo de PARilación H₂O₂ 10 mM. El resultado se confirmó en 4 inmunofluorescencias independientes.

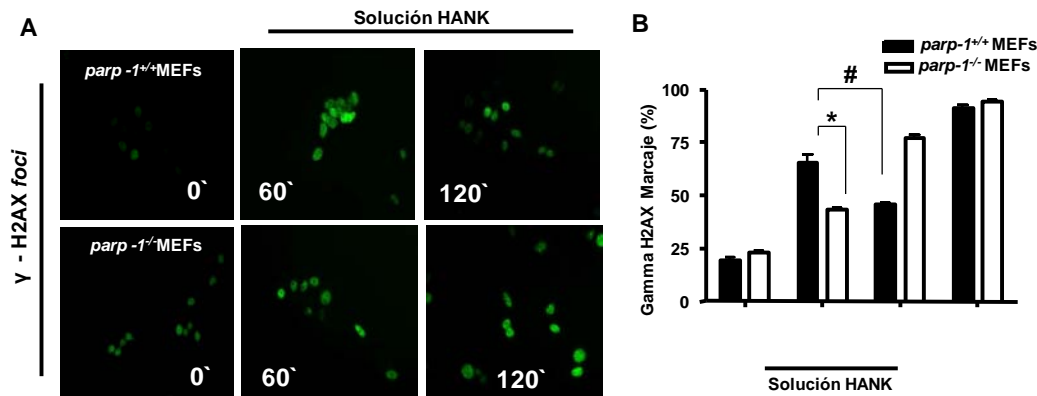


Figura S6: Marcaje de la histona γ H2AX (foci al ADN) durante privación en MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}*. (A) La intensidad de los foci de γ H2AX que aparecen en MEFs *parp-1^{-/-}* es muy superior a 120 minutos que en células PARP-1 *wildtype*. (B) Número de MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* marcados para la histona durante privación de nutrientes. El número de células positivas para el marcaje a 120 minutos es muy superior en MEFs *parp-1^{-/-}*, confirmando el resultado obtenido por inmunofluorescencia. Temozolomida 2 mM 2 horas fue utilizado como control positivo de inducción de foci de γ H2AX. Se recontaron 200 células en 3 experimentos independientes con 2 réplicas por condición. * $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* privados; # $p < 0.05$ para comparar MEFs *parp-1^{+/+}* privadas a distintos tiempos.

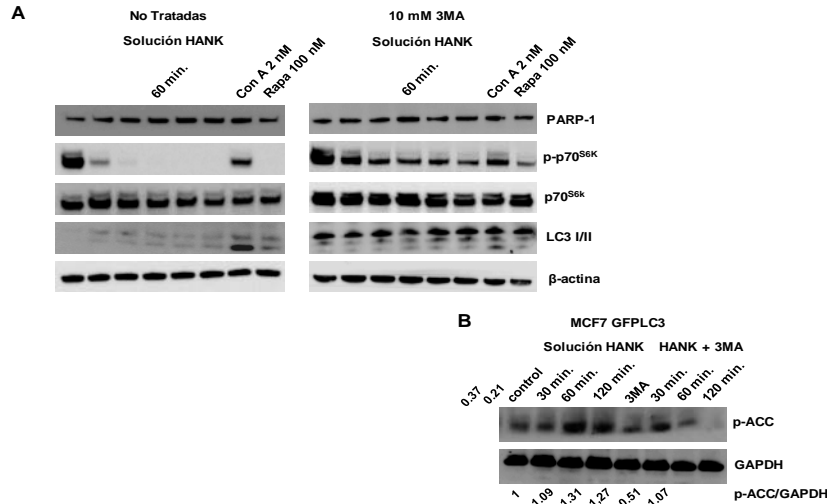


Figura S7: Acción de la 3-MA en la ruta de señalización de la autofagia. (A) La inhibición con 3-MA evita la pérdida de actividad mTORC1, mientras que evitó la translocación de LC3-II en MCF7 GFPLC3. **(B)** El mantenimiento de mTORC1 va acompañado de un gran retraso en la activación de AMPk, medida como fosforilación de sustrato ACC, en MCF7 GFPLC3 privadas y cotratadas con 3-MA. Se muestra la cuantificación de los niveles de p-ACC con respecto a GAPDH.

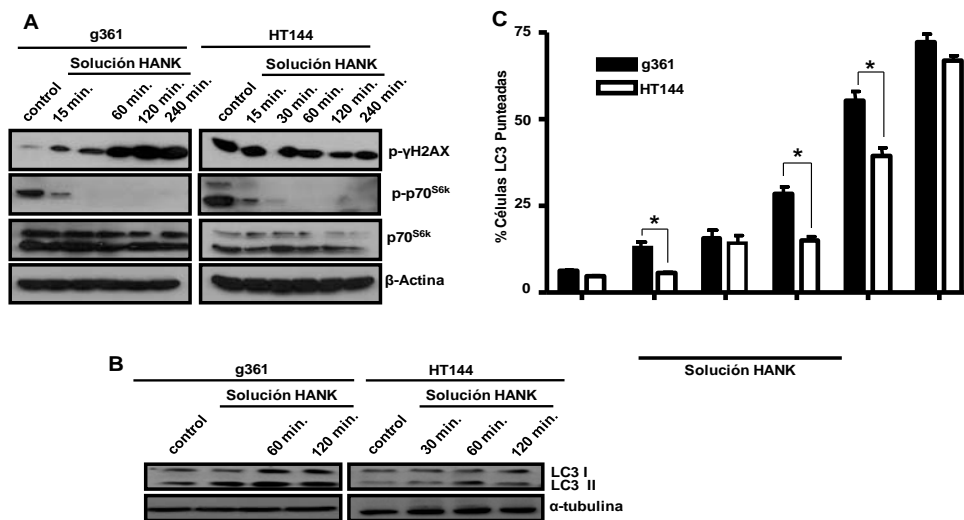


Figura S8: Retraso de la autofagia inducida por privación, en un modelo deficiente en reparación del ADN. (A) Efecto de los daños al ADN sobre la ruta de mTORC1: células g361 y HT144 (deficientes en ATM) son privadas de nutrientes y se mide el grado de inactivación de mTORC1 como fosforilación de su sustrato p70^{S6k}. La deficiencia en la señalización de daños, marcada por γ H2AX, se corresponde con un retraso en la señalización de mTORC1 durante el tratamiento con Solución HANK. β -actina fue usada como control de carga. Resultados similares se obtuvieron de 3 experimentos independientes. **(B)** Análisis *western blot* de la translocación endógena de LC3-II en células g361 y HT144 durante privación de nutrientes. α -tubulina fue usada como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en 2 experimentos independientes. **(C)** Transfección con GFPLC3 sobre células g361 y HT144. Recuento del número de células positivas para el patrón punteado GFPLC3 después del tratamiento con Solución HANK. Rapamicina 100 nM 4horas fue usada como inductor positivo de formación de autofagosomas. Al menos 250 células fueron recontadas de cada línea celular, en 3 experimentos independientes, bajo microscopía de fluorescencia.

FIGURAS ANEXAS

CAPÍTULO I

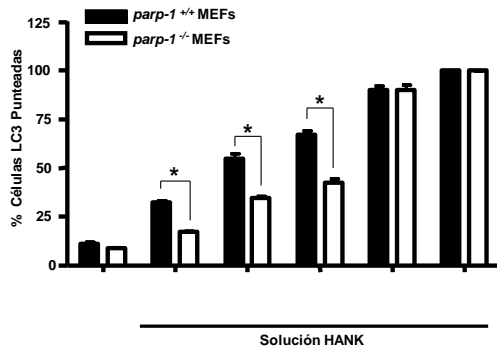


Figura Anexa 1: Niveles de autofagia a tiempos largos de privación de nutrientes. Células MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} transfectadas con GFPLC3 fueron sometidas a privación de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 1, 2, 4, 6 y 8 horas. En el gráfico se muestra el porcentaje de células positivas para el punteado LC3, obtenido bajo microscopía de fluorescencia. **p*<0.05 para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} privadas de nutrientes.

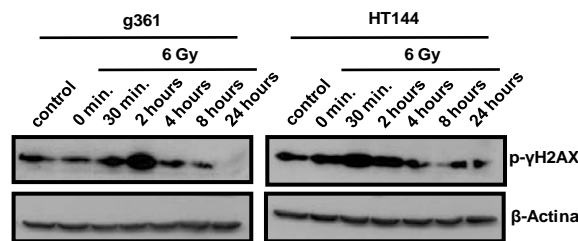


Figura Anexa 2: Fosforilación de la histona γH2AX tras irradiación. Células g361 y HT144 fueron irradiadas a 6 Gy durante 10 minutos. Posteriormente se mantuvieron en cultivos durante distintos tiempos en los cuales se analizaron los daños al ADN como grado de fosforilación de γH2AX. Células con deficiencias en ATM (HT144) muestran daños duraderos y alteraciones en la reparación del ADN irradiado.

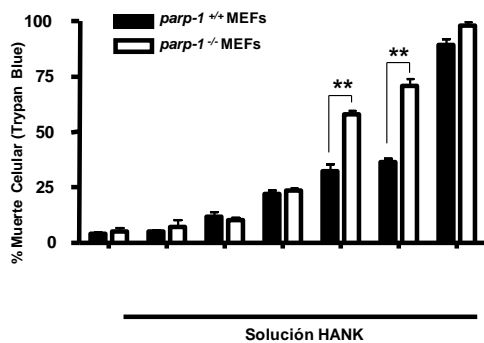


Figura Anexa 3: Niveles de muerte celular por Tinción de Exclusión Trypan Blue. MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} fueron privadas de nutrientes con Solución HANK y se aplicó el protocolo de tinción con Solución Trypan Blue que específicamente se interna en células con alteraciones o poros en la membrana plasmática, indicativo de muerte celular. Apartado de Material y Métodos. ** *p*<0.01 para comparar MEFs *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} privadas de nutrientes.

CAPÍTULO II

PARP-1 y la Poli ADP-Ribosilación participan en la activación de AMPk, su salida desde el núcleo al citosol y la correcta inducción de autofagia

Resumen

En este nuevo capítulo profundizaremos en los mecanismos por los cuales se induce autofagia y el papel regulador que juega PARP-1 en el eje regulador primario de la autofagia, AMPk/mTORC1. Para ello trabajaremos con un modelo tumoral de células epiteliales de mama, MCF7, establemente transfectadas con el plásmido GFPLC3.

Hemos demostrado que el grado de activación de PARP-1, va a influir sobre la velocidad con que la célula entra en autofagia en respuesta a la retirada de nutrientes. Al igual que múltiples procesos celulares dependientes de Poli ADP-Ribosilación, la autofagia inducida por carencia nutricional está estrechamente regulada por los niveles de Poli ADP-Ribosa (PAR) que se encuentren en la célula. La inhibición de la actividad PARP-1, principal Poli ADP-Ribosa Polimerasa, y la caída en los niveles de PAR en la célula, enlentecen el flujo autofágico, mientras que la acumulación no tóxica de polímero la acelera. El mayor flujo autofágico durante privación de nutrientes (en respuesta al acúmulo de ADP-ribosa), no viene marcado por un intento de detoxificación celular, ya que no se afecta la viabilidad celular. Hemos demostrado que el bloqueo conjunto de la Poli ADP-Ribosilación y de la autofagia tiene efectos similares en el flujo autofágico, por lo que la Poli ADP-Ribosilación marca la velocidad en el proceso de formación de los autofagosomas.

La actividad PARP-1 va a ser capaz de regular tanto la supervivencia celular y síntesis de proteínas, cuyo principal modulador es mTORC1, como el inicio en la formación del autofagosoma, modulado por ULK1. PARP-1 intervendrá a ambos niveles gracias a que las dos rutas se modulan por el sensor energético AMPk, para el que hemos demostrado que se encuentra en interacción estructural y funcional con PARP-1. La carencia de nutrientes activa a PARP-1 que modificará a AMPk con Poli ADP-Ribosa permitiendo su exporte desde el núcleo hacia el citoplasma, donde favorece la inducción de autofagia. AMPk PARilada es translocada a través de la membrana nuclear y una vez en el citoplasma, AMPk inhibe a mTORC1 y activa ULK1. PARP-1 es por tanto, un nuevo modulador de AMPk por su capacidad de formar un complejo inhibitor y de modificarla pos-transduccionalmente, conduciendo a su exporte citosólico y a su activación.

La Poli (ADP-Ribosilación) regula la inducción de autofagia durante la privación de nutrientes en células tumorales

En esta apartado hemos profundizado en el papel que juega PARP-1 y la reacción bioquímica de PARilación en las etapas iniciales de la ruta de autofagia. Vamos a trabajar con las células tumorales MCF7 GFPLC3 y al igual que el apartado anterior, se inducirá autofagia tratándolas a distintos tiempos con Solución HANK. El primer paso fue validar a la línea MCF7 GFPLC3 como un modelo idóneo para estudiar la ruta autofágica. La carencia de nutrientes a tiempos a 30, 60, 120 y 240 minutos provoca un incremento en el número de células que presentan morfología punteada GFPLC3, indicativa de la formación de autofagosomas (**Figura 1.A**). Demostramos que tanto el número de células autofágicas como el número de vesículas GFPLC3 por célula, aumentan de forma proporcional al tiempo del tratamiento (**Figura 1.A y S1.A**). El procesamiento de la forma endógena de la proteína LC3-I hasta la forma lipidada LC3-II aumentó con el tiempo de privación de nutrientes (**Figura 1.A**), para confirmar que la autofagia es una ruta activa y dependiente de carencia nutricional en células MCF7 GFPLC3, se utilizó por una parte Concanamicina A 4nM como control positivo de traslocación de LC3-II (**Figura 1.A**) y el silenciamiento específico de dos genes claves en las primeras etapas de formación de los autofagosomas, ATG7 y Beclina-1 (**Figura S1.B**). Finalmente para considerar las células MCF7 GFPLC3 como un modelo ideal para el estudio de autofagia, medimos los niveles de actividad del sensor energético mTORC1 durante privación de nutrientes. El tratamiento con Solución HANK inhibe la actividad de mTORC1 tal y como se comprobó al analizar los niveles de fosforilación del sustrato p70^{S6k} (**Figura 1.B**). El hecho de que a los 15 minutos de privación desapareciera la señal de fosforilación de p70^{S6k} y que la Rapamicina actúe tan específicamente como control positivo de inhibición de mTORC1, apoya la idea de la adecuación de este modelo de células tumorales para analizar la ruta autofágica. De la misma manera que la Rapamicina es un control positivo de autofagia dependiente de la inhibición de mTORC1, Concanamicina A la usaremos como control positivo de acumulación de autofagosomas y traslocación de LC3-II de forma independiente a la inhibición de mTORC1. Ambos controles son válidos para sacar conclusiones acerca del flujo autofágico en este modelo (**Figura 1.B**). Como material anexo se incluyen datos sobre otros modelos de tumores sólidos, en

los cuales tras inducir privación de nutrientes se presentan características autofágicas como es la acumulación de vesículas GFPLC3 (**Material Anexo Figura 1.A**).

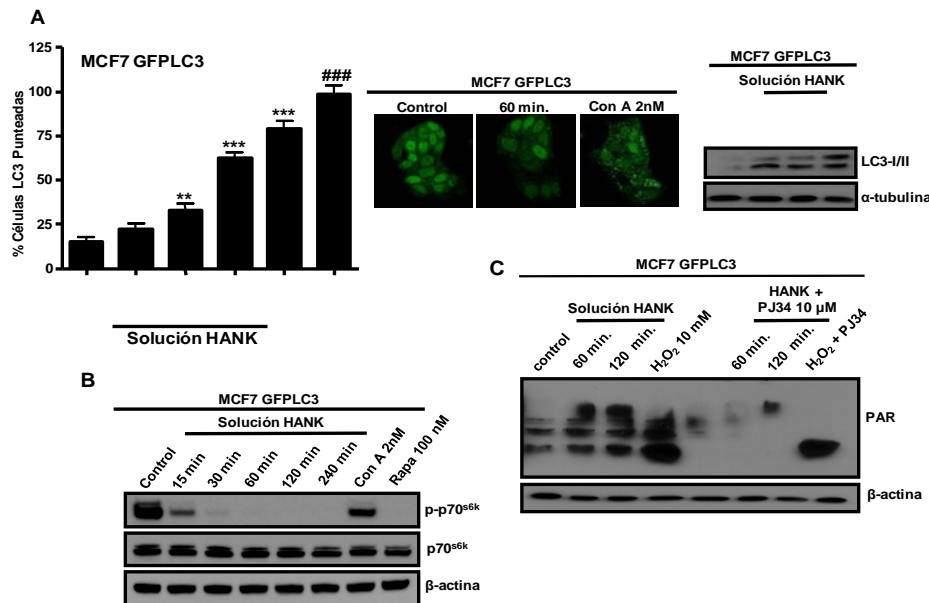
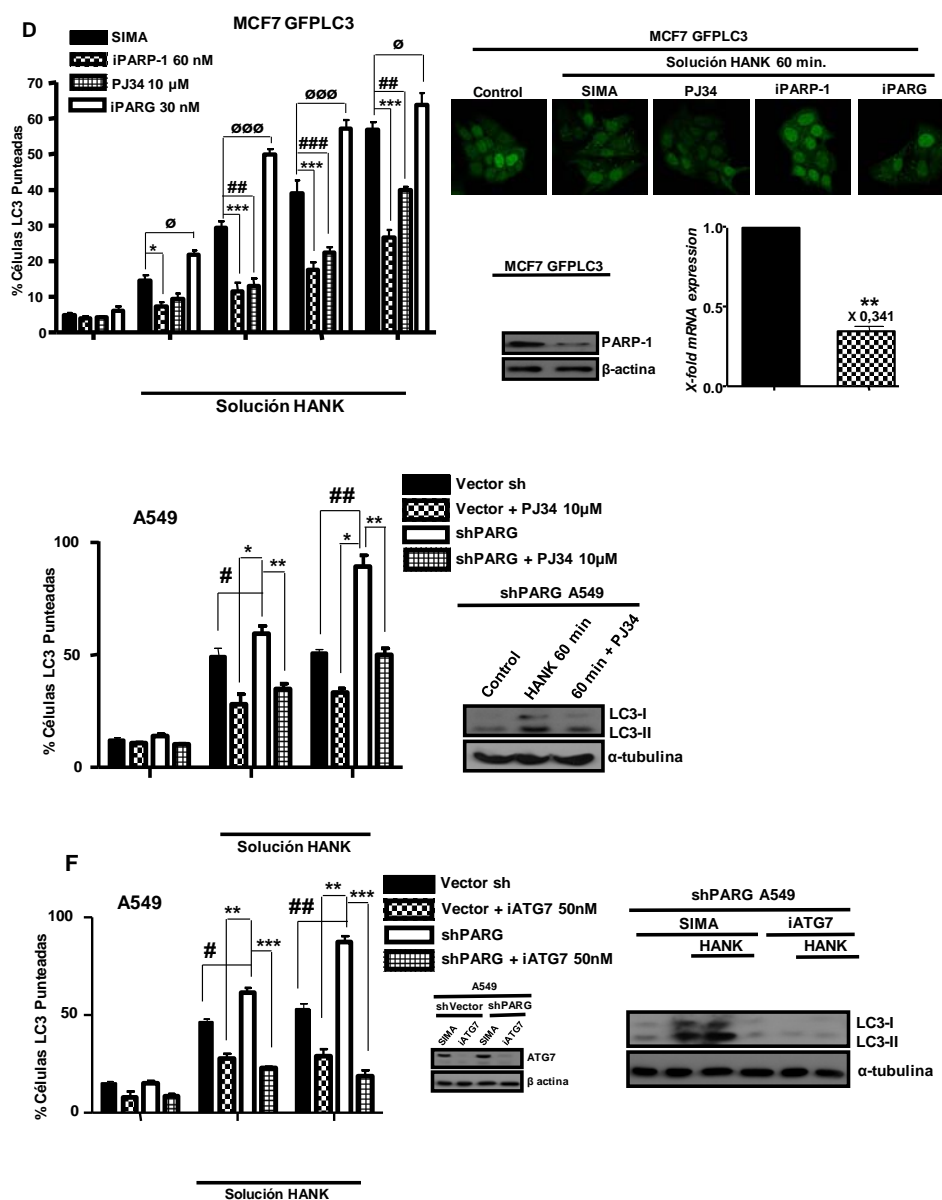


Figura 1: Los niveles de PARilación regulan la autofagia inducida por privación de nutrientes (I). **(A)** Autofagia inducida por privación. Células MCF7 GFPLC3 fueron privadas de nutrientes con Solución HANK a los tiempos 30, 60, 120 y 240 minutos. Porcentaje de células positivas para el punteado LC3. Concanamicina A 4nM 4 horas fue utilizado como control positivo de formación de autofagosomas. A la derecha se muestran imágenes representativas del patrón de distribución de LC3 en condiciones de privación y tratamiento con Concanamicina A. *Western blot* de la translocación de la forma endógena de LC3-II. **p<0.01, ***p<0.001 para comparar células MCF7 GFPLC3 controles y privadas de nutrientes. ###p<0.001 para comparar células MCF7 GFPLC3 controles y tratadas con Concanamicina A. **(B)** Análisis por *western blot* de la actividad de mTORC1 en células MCF7 GFPLC3 control y privadas con Solución HANK. Los niveles de inactivación de mTORC1 se midieron con grado de fosforilación de p70^{S6k}. Concanamicina 4nM fue usada como inductor de autofagia independiente de mTOR y Rapamicina como inductor dependiente de la inactivación de mTORC1. Total p70^{S6k} fue usada para normalizar la proteína fosforilada. **(C)** Análisis por *western blot* de la formación de polímero PAR durante privación de nutrientes. MCF7 GFPLC3 fueron privados de nutrientes a 60 y 120 minutos con Solución HANK, mostrándose el resultado de PARilación con un anticuerpo específico de ADP-Ribosa. El inhibidor de PARPs, PJ34 10 μM, se usó para confirmar la existencia de PARilación durante privación y H₂O₂ 10 mM como control positivo de PARilación y especificidad del anticuerpo. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. Al menos 250 células fueron contadas bajo microscopía de fluorescencia. β-actina y α-tubulina fueron usadas como controles de carga.

Una vez optimizado el modelo autofágico, necesitamos conocer cómo de activa es PARP-1 en células MCF7 GFPLC3 y así estudiar la relevancia de la actividad PARP en el desarrollo de la autofagia. PARP-1 es una proteína que se relaciona con la respuesta a diversos tipos de estreses celulares, de naturaleza genotóxica, oxidativa o incluso con una base más fisiológica (Kalisch, Ame et al. 2012, Rodriguez-Vargas, Ruiz-Magana et al. 2012). Para confirmar la actividad de

PARP-1, medimos producción de polímero de ADP-Ribosa (PAR) inducida por carencia nutricional en células MCF7 GFPLC3. Los ensayos por *western blot* indican que PARP-1 se activa durante el tratamiento con Solución HANK, además esta activación es proporcional al tiempo de privación (**Figura 1.C y Figura 3.A del Capítulo I**). El tratamiento con el inhibidor de PARPs, PJ34, inactiva la PARilación asociada a la privación, confirmando la dependencia entre la carencia total de nutrientes y la activación de PARP-1. H₂O₂ (10 mM durante 10 minutos) se utilizó como control positivo de la activación de PARP (**Figura 1.C**).



Para evaluar el papel que juega PAR en la autofagia inducida por privación de nutrientes, la primera estrategia fue analizar la modulación de autofagia

perturbando los niveles de PAR, regulados por la actividad de la proteína que lo sintetiza (PARP-1) y la proteína que pone en marcha su degradación y reciclado (Poli ADP-Ribosa Glicohidrolasa o PARG) (Le May, Iltis et al. 2012). Dado que ya conocemos el efecto que presentan tanto la inhibición química de PARPs como el silenciamiento específico de PARP-1 sobre los niveles de autofagia (**Capítulo I Resultados y Figura Anexa 1.B**), se llevó a cabo el silenciamiento específico de PARG, para impedir la degradación de PAR.

Figura 1: Los niveles de PARilación regulan la autofagia inducida por privación de nutrientes (II).

(D) Efecto del silenciamiento específico de PARP-1 y PARG y de la inhibición química de la PARilación sobre los niveles de autofagia inducida por privación de nutrientes. MCF7 GFPLC3 fueron transfectadas con el siRNA PARP-1 (60nM), siRNA PARG (30nM) y con su control negativo SIMA. 48 horas después se privaron con Solución HANK a tiempos de 30, 60, 120 y 240 minutos. Una condición fue pretratada con PJ34 10 μ M durante 1,5 horas, el inhibidor se mantuvo durante el tiempo de privación. El silenciamiento de PARP-1 se confirmó por *western blot* para PARP-1, mientras que en el caso de PARG se aplicó un protocolo de q-PCR, usando *primers* específicos. Células con el típico patrón GFPLC3 tras la retirada de nutrientes fueron recontadas bajo microscopía de fluorescencia. El panel de la derecha muestra imágenes características de cada situación ensayada. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ para comparar Células MCF7 GFPLC3 privadas con las pretratadas con PJ34 y privadas de nutrientes. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ para comparar Células privadas SIMA MCF7 GFPLC3 con células privadas iPARP-1. \emptyset $p < 0.05$, $\emptyset\emptyset\emptyset$ $p < 0.001$ para comparar células privadas SIMA MCF7 GFPLC3 con células privadas iPARG. **(E)** La inhibición de PARP reduce el efecto acelerador de la PARilación sobre la autofagia inducida por privación de nutrientes. Células A549 *shVector* y *shPARG* fueron transfectadas con el plásmido GFPLC3 y sometidas a privación con Solución HANK durante 60 y 120 minutos. PJ34 10 μ M durante 1,5 horas se mantuvo como pretratamiento y posteriormente se mantuvo durante el tiempo de privación. Células con el típico patrón GFPLC3 tras la retirada de nutrientes fueron recontadas bajo microscopía de fluorescencia. El panel de la derecha muestra la translocación de la forma LC3-II endógena durante privación. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ para comparar entre A549 *shVector* y A549 *shPARG* ambas privadas de nutrientes * $p < 0.05$ para comparar entre células A549 *shVector* tratadas con PJ34 y privadas, con células A549 *shPARG* privadas. ** $p < 0.01$ para comparar entre Células A549 *shPARG* privadas con Células A549 *shPARG* tratadas con PJ34 y privadas de nutrientes. **(F)** El silenciamiento de ATG7 bloquea el incremento en los niveles de autofagia, inducidas por PARilación. Células A549 *shVector* y *shPARG* fueron transfectadas con siRNA ATG7 (50nM) y con el interferente inespecífico o SIMA (50nM). 48 horas después, fueron transfectadas con GFPLC3 y privadas de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 60 y 120 minutos. Células con el típico patrón GFPLC3 tras la retirada de nutrientes fueron recontadas bajo microscopía de fluorescencia. El panel de la derecha muestra el efecto de bloquear la autofagia sobre la translocación de la forma LC3-II endógena durante privación de nutrientes. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ para comparar entre células A549 *shVector* SIMA privadas con células A549 *shPARG* SIMA privadas. ** $p < 0.01$ para comparar células A549 *shVector* iATG7 privadas con células A549 *shPARG* SIMA privadas. *** $p < 0.001$ para comparar entre células A549 *shPARG* SIMA privadas con células A549 *shPARG* iATG7 privadas. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. En las figuras D, E y F al menos 250 células fueron contadas bajo microscopía de fluorescencia. β -actina y α -tubulina fueron usadas como controles de carga.

Se confirmó el silenciamiento de la proteína PARP-1, en MCF7 GFPLC3, por *western blot* para los niveles de proteína y el de PARG por PCR cuantitativa (**Figura 1.D**) y se corroboraron por inmunofluorescencia indirecta de PAR nuclear usando un anticuerpo específico y controles positivos con H₂O₂ 10 mM (**Figura S2.A**). Tanto el silenciamiento específico de PARP-1 como el uso del inhibidor químico

PJ34, provocó una caída o retraso importante en los niveles de inducción de autofagia, tras el tratamiento con Solución HANK a distintos tiempos (**Figura 1.D**). Se obtuvo idéntico resultado utilizando otros inhibidores de PARPs, como son DPQ y Olaparib. Con ello podemos confirmar que los inhibidores de la PARilación inhiben la autofagia inducida por privación en células tumorales y no es algo específico del PJ34 (**Figura S2.B**). La acumulación de PAR en la célula puede volverse tóxica y podría causar fenómenos de muerte celular por acumulación de vesículas de detoxificación o por el mecanismo de Muerte por PARtanatos (Virag, Robaszkiewicz et al. 2013). Por lo tanto antes de analizar el efecto de la acumulación de PAR sobre la ruta de autofagia, necesitábamos conocer sus efectos sobre la viabilidad celular. El silenciamiento de PARG y la consecuente acumulación de PAR, no acarrea pérdida de viabilidad celular mayor que la inducida por privación (**Figura S2.C**). La acumulación no tóxica de PAR, en un contexto de silenciamiento de PARG, acelera la autofagia inducida por privación de nutrientes (**Figura 1.D**). Por tanto, incremento en los niveles de autofagia, o lo que es lo mismo el incremento en el número de autofagosomas, sugiere que exista un mecanismo de regulación de la PARilación sobre las primeras etapas de la formación de autofagosomas. En el panel de la derecha se detallan imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran una mayor acumulación de autofagosomas cuando se silencia PARG y como la inhibición de la PARilación retrasa la inducción de autofagia, durante carencia de nutrientes (**Figura 1.D**).

Para confirmar el papel de la PARilación en la formación de los autofagosomas, analizamos el tráfico de membranas asociado a la autofagia en dos líneas de cáncer de pulmón A549. Ambas líneas se transfectaron con vectores retrovirales para conseguir un silenciamiento estable de la proteína PARG, A549 *shPARG*, y compararlas con sus controles transfectadas con la secuencia no específica de ARNi o A549 *shVector*. Los dos modelos A549 son capaces de sintetizar PAR durante la privación de nutrientes, pero las células A549 *shPARG* van a ser incapaces de degradar este polímero. Del mismo modo las células A549 *shPARG* acumulan más forma LC3-II durante el tratamiento con Solución HANK, es decir, tienen más acelerado el proceso de autofagia (**Figura S3**). Tanto las células silenciadas como sus controles fueron transfectadas con el plásmido GFPLC3 para el análisis morfológico de la autofagia, tras la retirada de nutrientes durante 60 y

120 minutos. El porcentaje de células con el patrón punteado GFPLC3, recontado bajo microscopía de fluorescencia, fue superior en células A549 *shPARG* (**Figura 1.E**), confirmando los resultados obtenidos en el modelo MCF7 GFPLC3 *iPARG* (**Figura 1.D**). La inhibición de la PARilación con PJ34 suprime la formación de autofagosomas asociada a la acumulación no tóxica de polímero PAR durante privación, en células A549 *shPARG*. Los resultados morfológicos fueron confirmados bioquímicamente, analizando la traslocación de la forma endógena de LC3-II sobre la superficie de los autofagosomas (**Figura 1.E**). A pesar de que en células control A549 *shVector* también hay efecto del inhibidor de PARPs, si tenemos en cuenta la ganancia en autofagia por acumular polímero entre ambas líneas, concluimos que tanto la PARilación como la presencia (supuestamente citosólica) del polímero PAR acelera la formación de los autofagosomas. Finalmente para demostrar la importancia de la PARilación en la formación de los autofagosomas, usamos la combinación del silenciamiento estable de PARG con el transitorio para la proteína autofágica ATG7, tanto en células A549 *shPARG* como en sus controles A549 *shVector*. Una vez silenciadas, ambas líneas celulares fueron transfectadas con el plásmido GFPLC3 y sometidas a privación de nutrientes durante 60 y 120 minutos. En ambos casos encontramos que el silenciamiento de ATG7 durante la privación reduce los niveles de autofagia, pero la pérdida en la población autofágica es mayor en células A549 *shPARG* donde la acumulación de polímero aceleró la formación de autofagosomas (**Figura 1.F**). A modo de conclusión podemos decir que la acumulación de PAR en la célula acelera la formación de autofagosomas y este hecho no está propiciado por un intento de detoxificación, sino por un mecanismo de regulación en las primeras etapas tras la inducción de autofagia. El resultado fue confirmado midiendo la importante pérdida en los niveles de traslocación de LC3-II que ocurre en A549 *shPARG* cuando se les silencia ATG7 y se las priva de nutrientes (**Figura 1.F**). Obtuvimos idéntico resultado silenciando otra proteína esencial en el inicio de la formación del autofagosoma, como es ATG1 (**Material Anexo Figura 2**). Todos estos resultados indican que el proceso de PARilación es crucial no solo para la inducción de autofagia durante la privación de nutrientes, sino también para la formación de los autofagosomas.

La inhibición de la PARilación evita la activación de AMPk y la inducción de autofagia

El estatus metabólico celular está “vigilado” por dos proteínas quinasas, AMPk o sensor energético y mTORC1 o sensor nutricional. Ambas proteínas están a su vez reguladas muy estrechamente por diferentes quinasas y mantienen una fuerte relación bioquímica orquestada tanto por los niveles energéticos intracelulares como por la disponibilidad de nutrientes en el microambiente intracelular (Mihaylova and Shaw 2011, Clohessy, Reschke et al. 2012, Laplante and Sabatini 2012). Dependiendo de los niveles de energía, marcados por la ratio AMP:ATP y la disponibilidad de biomoléculas energéticas como lípidos o proteínas, mTORC1 es capaz de actuar como un regulador negativo de la autofagia, permitiendo la proliferación y crecimiento celular. Por el contrario, AMPk que se encuentra regulado por la quinasa LKB1 sensible a los niveles de ATP, es activada en situaciones de depleción energética induciendo la inhibición de mTORC1 y por lo tanto, actuando como un regulador positivo de la autofagia (Shaw 2009).

Para evaluar los niveles de activación de AMPk durante privación en células MCF7 GFPLC3, primero medimos los niveles de ATP a diferentes tiempos de privación de nutrientes. Los niveles de ATP decrecen progresivamente durante la privación con Solución HANK (**Figura 2.A**) y esta depleción se correlaciona con una importante y rápida activación de la quinasa AMPk. Para ello verificamos tanto los niveles de fosforilación de la propia quinasa por LKB1, como la fosforilación de un sustrato de AMPk específico en condiciones de estrés nutricional, como es ACC (Acetil CoA Carboxilasa) (**Figura 2.B**). PARP-1 está totalmente activa durante privación (**Figura 1.C**), por lo cual para investigar si los niveles de activación de PARP-1 regulan la actividad de AMPk, debemos bloquear tanto la síntesis como la degradación de PAR asociada a la carencia nutricional. Tanto el silenciamiento específico de PARP-1 como el inhibidor de PARPs PJ34, bloquearon específicamente la depleción del ATP (**Figura 2.C.1**), por lo que la activación de PARP-1 durante la privación es la principal causa de la caída en los niveles de ATP. Recuperados los niveles de ATP, LKB1 no puede advertir el fallo energético y por lo tanto la inhibición de la PARilación conlleva a la total inactivación de AMPk (**Figura 2.C.2**) y a la inhibición del proceso de autofagia (**Figura 1.D**). Además, la

acumulación no tóxica de polímero PAR por el efecto del silenciamiento de PARG en MCF7 GFPLC3, no tuvo efecto alguno sobre los niveles de ATP (**Figura 2.D.1**), sin embargo esta acumulación tiene el suficiente efecto sobre la activación de AMPk como para que se vea incrementada su fosforilación y se acelere la ruta de autofagia (**Figura 2.D.2 y 1.D**). Es bastante probable que el sistema esté saturado en situación de acumulación de PAR, de forma que aunque el ATP no se vea afectado, la activación de AMPk sea máxima debido a la gran concentración de PAR en la célula. Por lo tanto los niveles del PAR juegan un papel importante en la activación de AMPk durante privación de nutrientes y la inhibición de la actividad PARPs acarrea una regulación negativa sobre la ruta de AMPk.

Con el fin de confirmar que existe una relación funcional entre PARP-1 y la quinasa AMPk, trabajamos con fibroblastos murinos embrionarios MEFs *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}*. Las células MEFs *parp-1^{-/-}* presentan una importante inhibición de la actividad AMPk durante la privación de nutrientes (**Figura 2.D y Capítulo I**) en comparación con células *wildtype* para PARP-1 (**Figura S4.A**). para comprobar esta interacción tratamos las células *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* con un potente mimético del AMP, llamado AICAR, con el fin forzar la activación de AMPk durante una situación de privación de nutrientes y comprobamos los efectos sobre la actividad de AMPk (medida como grado de fosforilización de su sustrato ACC) inhibición de mTORC1 (medida como grado de fosforilización de su sustrato p70^{S6k}) y la inducción clásica de autofagia (translocación de la forma endógena de LC3-II y morfología GFPLC3). En la Figura 2.F se observa que las células *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* privadas de nutrientes se comportan de la forma esperada, es decir encontramos una recuperación en los niveles de actividad de mTORC1 y una importante deficiencia en la formación de la forma LC3-II en 3T3s *parp-1^{-/-}* (**Figura 2.F Panel Izquierdo y Central**). El tratamiento con AICAR en células *parp-1^{-/-}* promueve la activación de AMPk (se recupera la fosforilación de ACC) durante privación de nutrientes. AMPk activa, inducirá la inhibición de mTORC1 y una correcta translocación de LC3-II (**Figura 2.F Panel Derecho**). Del mismo modo el uso de AICAR combinado con Solución HANK en células *parp-1^{+/+}* no provoca una mayor activación de AMPk durante privación, con lo cual no tiene efectos apreciables en los niveles de inducción de autofagia (Datos no Mostrados). Estos resultados fueron confirmados morfológicamente por microscopía de fluorescencia,

transfectando células *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* con el plásmido GFPLC3 y privándolas de nutrientes en presencia de AICAR. La reactivación de AMPk con AICAR incrementa el número de células autofágicas con una patrón GFPLC3 punteado (**Figura 2.E**) y la cantidad de vesículas autofágicas presentes en cada célula (**Figura S.4.B**). En este caso los niveles de inducción de autofagia en células *parp-1^{-/-}* tratadas con AICAR y privadas de nutrientes son similares a los obtenidos para células *parp-1^{+/+}*, poniendo de manifiesto la importancia de la actividad PARP-1 en la ruta. Todos estos datos sugieren que tanto la presencia física como la correcta activación de PARP-1 son necesarias para la activación de AMPk durante la retirada de nutrientes y que con ello promueva la inhibición de mTORC1 y la inducción de autofagia.

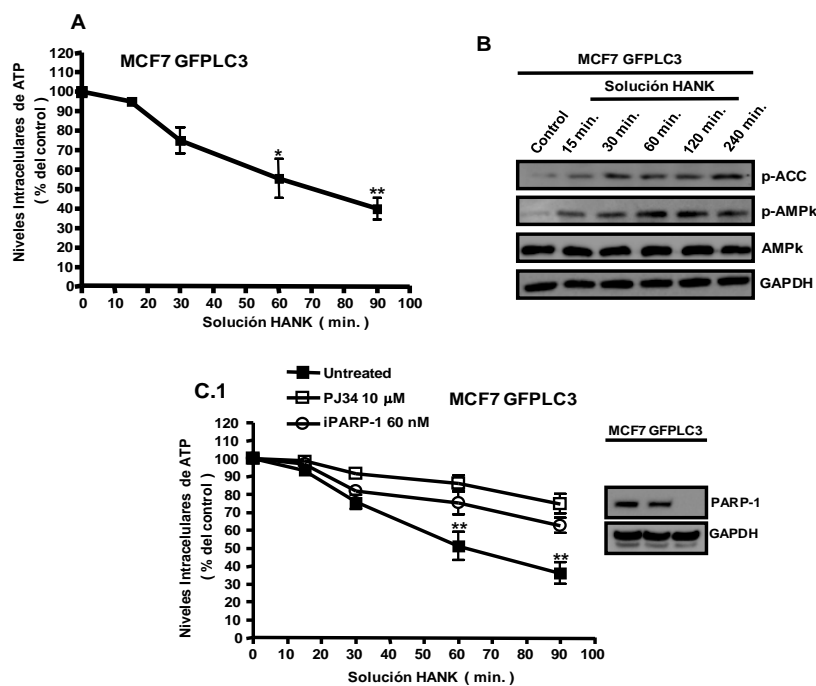


Figura 2: La inhibición de la PARilación inhibe la actividad AMPk (I). **(A)** Niveles de ATP durante retirada de nutrientes. Células MCF7 GFPLC3 fueron sometidas a Solución HANK a tiempos de 15, 30, 60 y 90 minutos. Las concentraciones de ATP fueron normalizadas con respecto a la concentración total de proteínas de cada muestra y referidas con respecto al 100% del control. Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ para comparar entre células MCF7 GFPLC3 controles y privadas de nutrientes. **(B)** Análisis *western blot* de la actividad de AMPk a diferentes tiempos de privación. Células MCF7 GFPLC3 se privaron con Solución HANK y la actividad de AMPk se midió por fosforilación directa de la quinasa y por fosforilación de su sustrato ACC. AMPk total fue usada para normalizar los niveles de proteínas fosforiladas. **(C) Efecto de la inhibición de la PARilación sobre los niveles de ATP y la activación de AMPk.** **(C.1)** El tratamiento con PJ34 10 μ M y el silenciamiento de PARP-1 (60nM) evita la caída de ATP asociada a la privación de nutrientes en células MCF7 GFPLC3. El panel de la derecha muestra la eficiencia del silenciamiento de PARP-1 por *western blot* en comparación con su ARN SIMA inespecífico y una situación no transfectada. ** $p < 0.01$ para comparar entre células MCF7 GFPLC3 controles y privadas de nutrientes.

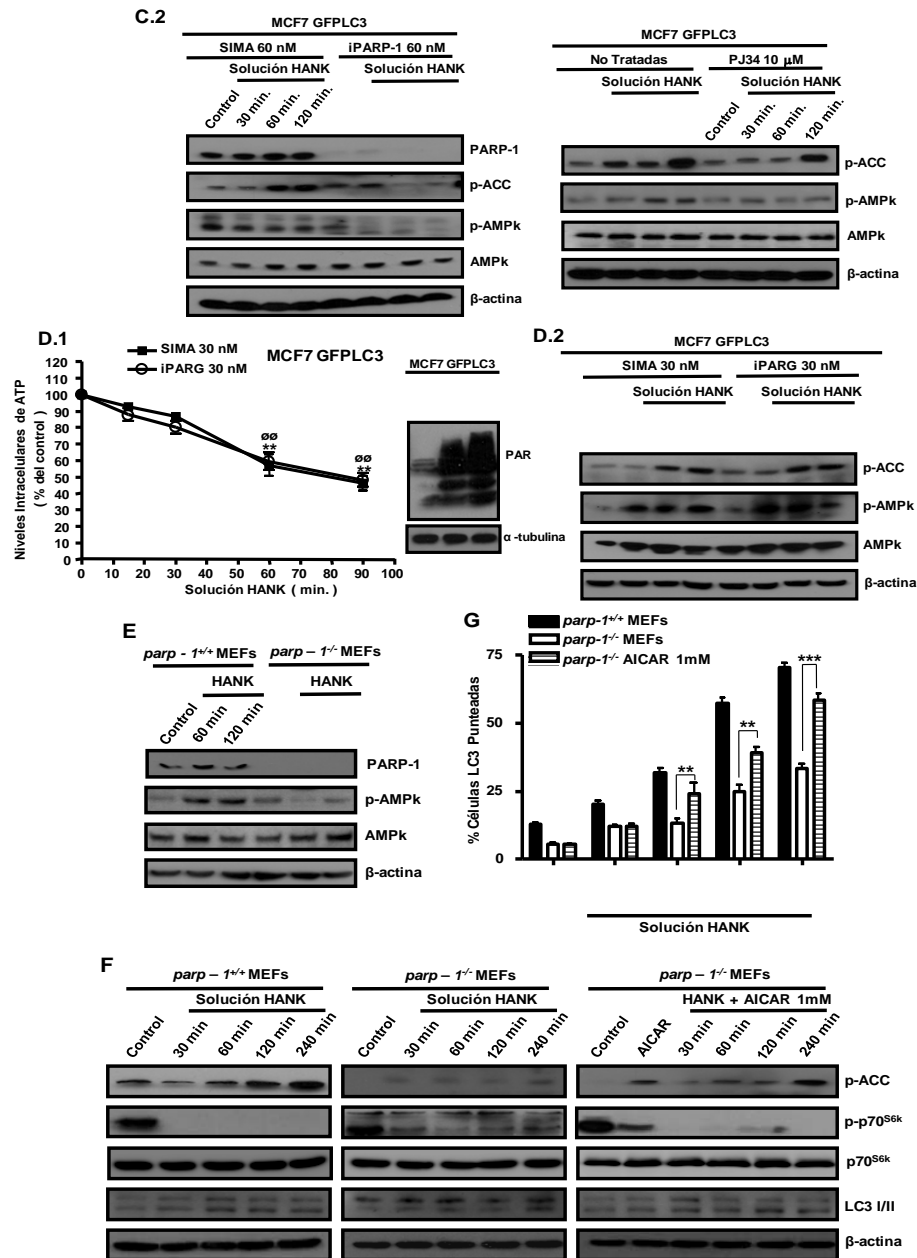


Figura 2: La inhibición de la PARilación inhibe la actividad AMPk (II). **C.2)** Células MCF7 GFPLC3 silenciadas para PARP-1 (panel izquierdo) o tratadas con el inhibidor PJ34 (panel derecho) muestran inhibición de la actividad AMPk, medida por el grado de fosforilación del sustrato ACC y como *phospho-AMPk*. AMPk total es usada para normalizar los niveles de proteínas fosforiladas. Idéntico resultado se obtuvo en 3 experimentos independientes. **(D)** Efecto de la acumulación no tóxica de polímero PAR sobre los niveles de activación de AMPk. **(D.1)** El silenciamiento específico de PARG (30nM) acumula polímero PAR y no tiene efecto sobre la pérdida en los niveles de ATP asociada a la privación de nutrientes. La eficiencia del silenciamiento se muestra como *western blot* de PAR en comparación con una situación control y transfecteda con el siRNA inespecífico o SIMA. H₂O₂ 10 mM como control positivo de PARilación y especificidad del anticuerpo. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. **p<0.01 para comparar entre MCF7 GFPLC3 controles y privadas de nutrientes. ∅ p<0.01 para comparar entre MCF7 GFPLC3 controles y privada iPARG. **(D.2)** Células silenciadas para PARG y SIMA (30nM) fueron privadas de nutrientes. Los niveles de actividad de AMPk se midieron como el grado de fosforilación del sustrato ACC y como *phospho-AMPk*. AMPk total es usada para normalizar los niveles de proteínas fosforiladas. Idéntico resultado se obtuvo en 3 experimentos independientes.

Figura 2: Continuación: (E) La ausencia de PARP-1 causa una pérdida total de actividad AMPk. MEFs 3T3 *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* fueron privados de nutrientes con Solución HANK, analizando el grado de activación de AMPk (*phospho-AMPk*). Resultados similares se obtuvieron en 4 ensayos independientes. **(F)** AICAR induce reactivación de AMPk en células MEFs 3T3 *parp-1^{-/-}* privadas de nutrientes. MEFs 3T3 *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* controles y tratadas con AICAR fueron privadas con Solución HANK a tiempos de 30, 60, 120 y 240 minutos. La activación de AMPk se midió como grado de fosforilación del sustrato ACC, inhibición de mTORC1 como fosforilación del sustrato p70^{S6k} e inducción de autofagia como translocación de la forma endógena LC3-II. Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos independientes. **(G)** AICAR dispara la autofagia inducida por privación de nutrientes en MEFs 3T3 *parp-1^{-/-}*. MEFs 3T3 *parp-1^{+/+}* y *parp-1^{-/-}* fueron transfectadas con GFPLC3 y sometidas a privación a tiempos de 30, 60, 120 y 240 minutos. AICAR se usó como pretratamiento y se mantuvo durante la privación de nutrientes. El número de células GFPLC3 positivas se obtuvo bajo recuento con microscopía de fluorescencia. **p<0.01, ***p<0.001 para comparar MEFs 3T3 *parp-1^{-/-}* tratadas con AICAR y privadas, con MEFs 3T3 *parp-1^{-/-}* privadas y no tratadas. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes. En las figura G al menos 250 células fueron contadas bajo microscopía de fluorescencia. α -tubulina, β -actina y GAPDH fueron usadas como control de carga.

La activación de AMPk requiere de la interacción con PARP-1 y de su modificación por Poli ADP-Ribosilación

Los mecanismos por los cuales AMPk regula la respuesta celular al estrés metabólico o energético, no se conocen con detalle. Hasta ahora en este capítulo hemos descrito que la inhibición de la Poli ADP-Ribosilación induce una importante inactivación de AMPk y que ello acarrea un retraso en la inducción de autofagia. Por lo tanto el siguiente apartado trataremos de determinar si existe interacción física entre AMPk y PARP-1 e intentar explicar un mecanismo de adaptación y supervivencia al estrés metabólico, que implique a PARP-1 en la regulación del eje AMPk/mTORC1/autofagia.

Para evaluar si PARP-1 y AMPk se encuentran formando un complejo, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en distintas condiciones de privación de nutrientes. Para ello tratamos células MCF7 GFPLC3 con Solución HANK a tiempos comprendidos entre 15 y 60 minutos de privación, suficientes como para inducir PARilación, activación de AMPk y total inactivación del mTORC1. Datos directos de inmunoprecipitación indican que en condiciones basales existe una interacción importante entre PARP-1 y AMPk; la interacción se obtuvo realizando la inmunoprecipitación en ambos sentidos (**Figura 3.A**). Asimismo cuando se priva de nutrientes a tiempos de 15, 30 y 60 minutos, observamos una pérdida paulatina de la interacción entre ambas proteínas

(Figura 3.A), que coincide en el tiempo con la activación por fosforilación de AMPk (INPUT) y la inactivación de mTORC1 e inducción de autofagia (Figura 1.A y 1.B). Como material anexo adjuntamos las inmunoprecipitaciones con un anticuerpo inespecífico (Citocromo C) que demuestra la especificidad de la interacción (Material Anexo Figura 3). La inmunoprecipitación de AMPk revelada frente a PARP-1, muestra un máximo de interacción a 15 minutos de tratamiento con Solución HANK, que indica la posibilidad de que varias moléculas de PARP-1 estuvieran interaccionando con AMPk; sin embargo estos datos estequiométricos aún no han sido confirmados y representan una perspectiva de trabajo futuro muy atractiva para conocer mejor la ruta.

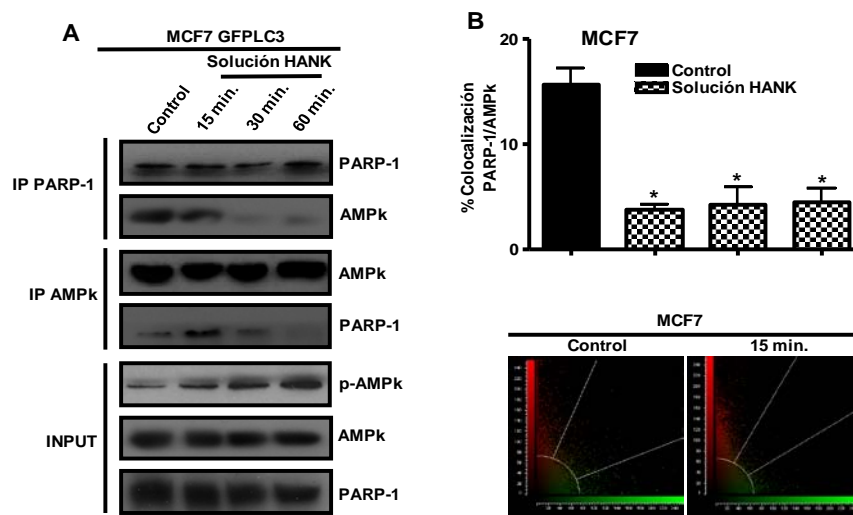


Figura 3: Presencia nuclear de AMPk e interacción con PARP-1 (I): (A) Inmunoprecipitación endógena de PARP-1 y AMPk. Células MCF7 GFPLC3 fueron tratadas con Solución HANK a tiempos de 15, 30 y 60 minutos. INPUT muestra los niveles totales de AMPk y PARP-1, así como el grado de activación de AMPk (*phospho-AMPk*). Se realizó IP de ambas proteínas y el revelado correspondiente con anticuerpos frente a las formas endógenas de AMPk y PARP-1. Resultados similares se obtuvieron en 3 ensayos independientes. **(B)** Colocalización endógena de PARP-1 y AMPk. Células MCF7 GFPLC3 fueron tratadas con Solución HANK a tiempos de 15, 30 y 60 minutos. Se procesaron las muestras según el protocolo de microscopía confocal. El porcentaje de colocalización se obtuvo para 3 experimentos independientes con 2 réplicas por condición, analizando al menos 30 núcleos por ensayo. El panel de la derecha muestra el análisis típico realizado sobre las imágenes, según el *software Leica SP5*. * $p < 0.05$ para comparar células MCF7 GFPLC3 controles y privadas de nutrientes.

Para cerciorarnos de los datos obtenidos por co-inmunoprecipitación, se realizó un ensayo de colocalización entre PARP-1 y AMPk, mediante microscopía confocal. El análisis de colocalización se realizó en un microscopio confocal Leica LCS SP5 y el porcentaje de colocalización se obtuvo cuantificando la fluorescencia obtenida de los planos en Z de cada imagen (*z-stacks*) tal y como se especifica en el

apartado de material y métodos. El análisis microscópico muestra un porcentaje de colocalización nuclear entre AMPk y PARP-1 endógenas de aproximadamente un 17% (**Figura 3.B**). Durante la retirada de nutrientes y de forma proporcional al incremento en el tiempo de tratamiento, observamos que el porcentaje de colocalización AMPk/PARP-1 se reducía hasta un 6%, lo que indica que la interacción entre ambas proteínas queda rota durante la privación (**Figura 3.B**). Al igual que como hemos demostrado con las inmunoprecipitaciones, la caída en el porcentaje de colocalización coincide en el tiempo con la activación de AMPk y la inactivación de mTORC1 (**Figura 1.B**). El panel derecho de la figura 3.B muestra imágenes representativas de una situación control y un tiempo de privación de 15 minutos en células MCF7, obtenidas con el microscopio confocal Leica LCS SP5. La conclusión es que ambas proteínas están interaccionando de forma basal formando un complejo que se va a separar cuando se induce retirada de nutrientes.

Como hemos descrito en el Capítulo I de resultados, durante privación de nutrientes se producen daños al ADN, inducidos por ROS, que hacen que se active PARP-1. En este contexto PARP-1 es capaz de modificar por PARilación a diversas proteínas nucleares. El siguiente paso consiste en demostrar si AMPk una vez que se ha separado de PARP-1, queda modificada por Poli ADP-Ribosilación y evaluar la importancia de esta modificación en el proceso de inducción de autofagia. El grado de PARilación de AMPk se determinó realizando una co-inmunoprecipitación de AMPk y polímero PAR, manteniendo las mismas condiciones experimentales usadas en los ensayos de interacción AMPk/PARP-1. Utilizando anticuerpos específicos confirmamos que durante la privación de nutrientes, AMPk estaba modificada por PAR tras separarse de PARP-1 (**Figura 3.C**). De nuevo confirmamos que esta modificación que PARP-1 ejerce sobre AMPk coincide en el tiempo con la activación por fosforilación de AMPk, necesaria para que inhiba a mTORC1 y active autofagia (**INPUT**). La inmunoprecipitación de AMPk cuando se revela frente a la presencia de polímero PAR, muestra un incremento de la señal de PAR a 15 minutos de privación. Este dato coincide con el obtenido anteriormente al revelar frente a PARP-1. Si tenemos en cuenta que PARP-1 sintetiza aproximadamente el 85% de todo el polímero PAR celular bajo condiciones de estrés, los datos de las inmunoprecipitaciones y revelado frente a PARP-1, se podrían interpretar de dos formas distintas: (a) la relación estequiométrica de la

interacción de AMPk y PARP-1, indica que más de una molécula de PARP-1 interacciona con una molécula de AMPk (b) otros miembros de la familia PARP, probablemente PARP-2, estén también interaccionando con AMPk y contribuyan a que su modificación por ADP-Ribosa. A pesar de que no disponemos de datos concluyentes en uno u otro sentido, hemos demostrado que el uso de inhibidores de PARPs mantiene unido al complejo, lo cual demuestra la necesidad de que PARP-1 se active durante privación de nutrientes, modifique a AMPk por PARilación y permita que el complejo se separe (**Figura 3.D**). Este último dato indica modificación por PARilación pero aún no describe la importancia que juega AMPk PARilada en la ruta de autofagia, ruta predominantemente citosólica.

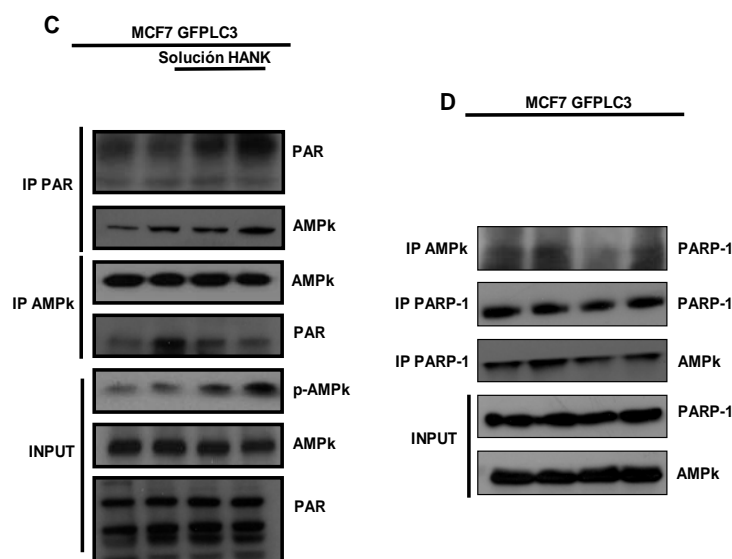


Figura 3: Presencia nuclear de AMPk e interacción con PARP-1 (II): (C) Inmunoprecipitación endógena de AMPk asociada a polímero PAR. Células MCF7 GFPLC3 fueron tratadas con Solución HANK a tiempos de 15, 30 y 60 minutos. INPUT muestra los niveles totales de AMPk y PAR, así como el grado de activación de AMPk (*phospho-AMPk*). El revelado correspondiente se realizó con anticuerpos frente a las formas endógenas de AMPk y los niveles de ADP-Ribosa. **(D) Efecto de la inhibición de la PARilación sobre la interacción AMPk/PARP-1.** Células MCF7 GFPLC3 fueron tratadas con el inhibidor PJ34 10 μ M, manteniéndolo durante el tiempo de privación de 30 minutos. INPUT muestra los niveles totales de AMPk y PARP-1. El revelado correspondiente se realizó con anticuerpos frente a las formas endógenas de AMPk y PARP-1. Resultados similares se obtuvieron en 3 ensayos independientes.

Para demostrar si la modificación de AMPk por polímero PAR es un evento crucial en la inducción de autofagia en el citosol o por el contrario es una modificación post-traducciona sin relevancia en la ruta, empleamos una estrategia basada en medir los niveles de AMPk total y activa (fosforilada) en núcleo y citosol durante privación de nutrientes. Resultados previos han puesto de manifiesto la

existencia de AMPk en el compartimento nuclear con una función en la regulación de la transcripción (Bungard, Fuerth et al. 2010, Yokoyama, Iguchi et al. 2011). Con este tipo de ensayos estamos describiendo si existe un flujo de AMPk, previamente PARilada, entre ambos compartimentos celulares y la relevancia de la población nuclear de AMPk en la inducción de autofagia, con respecto a la población citosólica. Para ello se privaron de nutrientes células MCF7 GFPLC3 con Solución HANK y se aplicó un protocolo de Subfraccionamiento Celular para separar la fracción citosólica (CE) y la fracción nuclear (NE). Los datos de subfraccionamiento muestran que durante la retirada de nutrientes, la población nuclear de AMPk se separa del complejo PARP-1/AMPk y es exportada al citosol de forma proporcional al tiempo de privación. Se confirmó que la salida de la población nuclear de AMPk va acompañada de un incremento en los niveles de fosforilación de AMPk en el citosol, asimismo en el núcleo no observamos activación por fosforilación de AMPk durante la privación, lo que confirma la salida y activación citosólica (**Figura 3.E Panel Izquierdo**). Las proteínas α -tubulina y PARP-1 son utilizadas como controles de ausencia de contaminación entre ambas fracciones. El uso del inhibidor de PARPs PJ34, que mantenía unido el complejo de PARP-1/AMPk, evita la salida de AMPk al citosol, manteniéndola en el núcleo y al mismo tiempo inhibe la activación por fosforilación de la población citosólica de AMPk (**Figura 3.E Panel Derecho**). Todos estos datos sugieren que la salida de AMPK hacia el núcleo es necesaria para la activación del AMPk citosólico.

La inhibición con Leptomicina B del transporte nuclear evita la salida de AMPk modificada por Poli ADP-Ribosa (**Figura 3.F**). Aún no tenemos datos que lo confirmen, pero es de suponer que evitando la salida de AMPk PARilada del núcleo al citosol conseguiremos un efecto inhibitorio en la activación de la población de AMPk citosólica, manteniendo la actividad de mTORC1 y en consecuencia inhibiendo la inducción de autofagia.

Todos los datos obtenidos indican que cuando las condiciones energéticas son óptimas, ambas proteínas están unidas formando un complejo que las mantiene inactivas a ambas. Cuando se produce carencia de nutrientes tienen lugar dos eventos claves: (1) Por una parte la producción de ROS induce daños al ADN que activan a PARP-1, en este momento PARP-1 es capaz de modificar a AMPk

por Poli ADP-Ribosilación, permitiendo que se separe del complejo (2) A continuación AMPk PARilada va a ser translocada desde el núcleo hacia el citosol. La presencia de AMPk PARilada citosólica actúa como señal inductora del inicio de la autofagia. De forma paralela, la depleción energética causada por una sobreactivación de PARP-1 se manifiesta en la caída de los niveles de ATP intracelulares, lo que provocaría la activación de la quinasa LKB1. Tanto la presencia de AMPk PARilada como la depleción energética, creará un nicho molecular adecuado para que LKB1 pueda activar por fosforilación al resto de la población de AMPk, promoviendo así la inducción de autofagia. Los inhibidores de PARPs bloquearán la ruta por dos motivos, por una lado mantienen inactiva a PARP-1 durante la privación y por tanto no va a modificar la población nuclear de AMPk y por otro evitan que se produzca la depleción energética asociada a la sobreactivación de PARP-1.

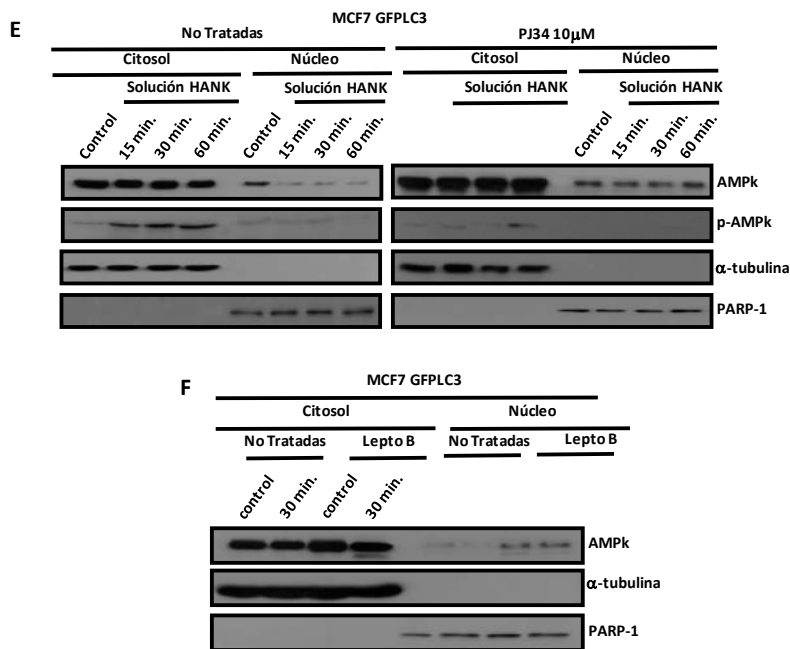


Figura 3: Presencia nuclear de AMPk e interacción con PARP-1 (III): (E) Flujo citosol-núcleo de la proteína AMPk. Células MCF7 GFPLC3 fueron privadas de nutrientes a tiempos 15, 30 y 60 minutos con Solución HANK. Se obtuvieron las fracciones citosólica (CE) y nuclear (NE) y se midieron los niveles totales de AMPk. α -tubulina y PARP-1 se usaron como controles de cada fracción separada. Resultados similares se obtuvieron en 4 experimentos independientes. **(F)** Leptomicina B evita la traslocación de AMPk y reprime la vía autofágica. Células MCF7 GFPLC3 fueron tratadas con Leptomicina B durante 3 horas como pretratamiento. El compuesto se mantuvo durante el tratamiento con Solución HANK a 30 minutos. Niveles de la quinasa AMPk en la fracción nuclear y citosólica tras el tratamiento con Leptomicina B 20 ng / ml durante privación de nutrientes. α -tubulina y PARP-1 se usaron como controles de cada fracción separada. Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos independientes.

El silenciamiento de PARP-1, impide por medio de la inhibición de AMPk, la inactivación de mTORC1 y la fosforilación de ULK1 inducida por privación de nutrientes.

Una vez que hemos confirmado la necesidad de que la población nuclear de AMPk, en interacción directa con PARP-1, sea PARilada y translocada al citosol en respuesta a privación de nutrientes, vamos a analizar cómo se ve influenciada toda la ruta de señalización desde AMPk hasta el inicio de la formación del autofagosoma. AMPk como inductor autofágico debe mantener inhibido a mTORC1 e inducir la actividad ULK1, necesaria para que se conjugue el *core* autofágico. En este sentido AMPk reprime la actividad mTORC1 a través de la fosforilación directa de Raptor (componente del complejo mTORC1) y activa a la quinasa de tipo ATG, ULK1 por unión y fosforilación directa (Mao and Klionsky 2011). Para analizar las consecuencias de la inhibición de la Poli ADP-Ribosilación en respuesta a privación de nutrientes, sobre el eje AMPk/mTORC1/ULK1, llevamos a cabo dos estrategias: tratamiento con el inhibidor de la PARilación PJ34 y el uso de siRNA específico para PARP-1 en células MCF7 GFPLC3 privadas con Solución HANK a distintos tiempos. En ambas situaciones analizamos los niveles de fosforilación de los sustratos de AMPk Raptor (mTORC1) y ULK1 (complejo ULK1/mATG13/FIP200). El silenciamiento específico de PARP-1 mantiene activo a mTORC1 tal y como demuestran los niveles de fosforilación de p70^{S6k}; al mismo tiempo los niveles de autofagia se ven comprometidos seriamente cuando eliminamos la proteína PARP-1 (**Figura 4.A Panel Izquierdo**). A pesar de que el inhibidor de PARPs, PJ34, es capaz de inhibir la activación de AMPk y reducir los niveles totales de autofagia (**Figuras 1.D y 2.C.2**) no es capaz de reactivar la actividad mTORC1, inhibida durante privación de nutrientes (**Figura 4.A Panel Derecho**). El uso de otros inhibidores como DPQ arrojó el mismo resultado en cuanto a inactivación de AMPk, descenso en los niveles de autofagia e ineficiencia a la hora de mantener activo a mTORC1 (**Material Anexo Figura 4 y Capítulo I**).

La confirmación de que la inhibición de la PARilación tiene un efecto distinto sobre mTORC1 que la eliminación física de PARP-1, la obtuvimos al realizar una dosis respuesta de inhibidor PJ34 en presencia de retirada de nutrientes en células MCF7 GFPLC3. Concentraciones elevadas de PJ34 no

consiguen mantener activo a mTORC1 a pesar de que si mantienen un efecto inhibitorio sobre la inducción final de autofagia (**Figura 4.B**).

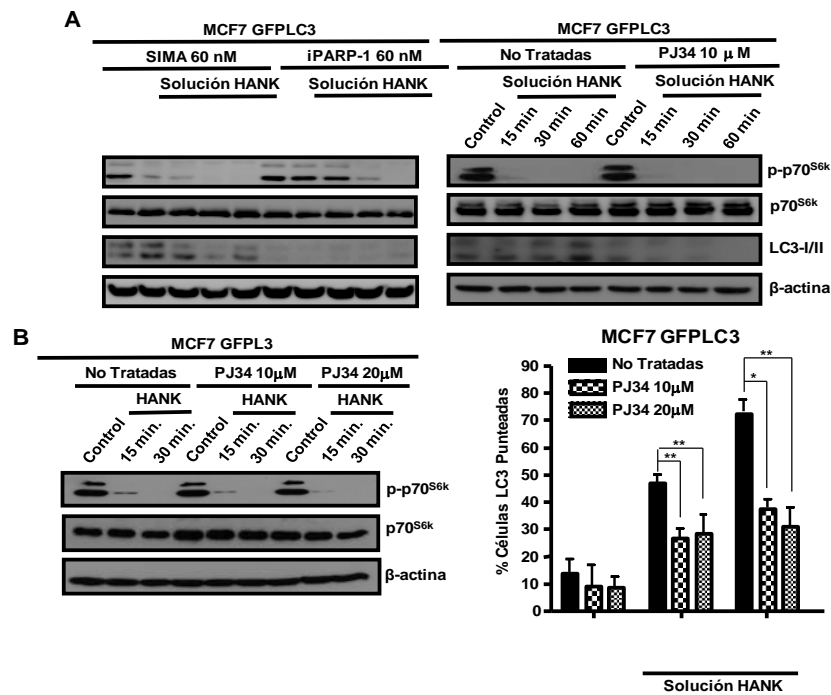


Figura 4: Efecto de la inhibición de la PARilación sobre el eje AMPk/mTORC1/ULK1 (I): (A) Efecto del inhibidor de PARPs PJ34 y del silenciamiento de PARP-1 sobre la actividad mTORC1 durante privación de nutrientes. Células MCF7 GFPLC3 fueron transfectadas con siRNA PARP-1 (60nM) (panel izquierdo) y su control siRNA inespecifico SIMA (60nM). 48 horas después, un grupo de células se trató con PJ34 10 μM durante 1.5 horas, manteniéndolo durante la privación (panel derecho). La actividad mTORC1 se midió como grado de fosforilación de su sustrato p70^{S6k}. Los niveles totales de p70^{S6k} se usaron para normalizar la proteína fosforilada. Se muestran los niveles de translocación de la forma endógena de LC3-II durante privación de nutrientes. **(B)** Efecto de dosis crecientes de PJ34 sobre la actividad mTORC1. Células MCF7 GFPLC3 fueron pretratadas durante 1.5 horas con PJ34 a concentraciones de 10 y 20 μM. El inhibidor se mantuvo durante los tiempos de privación con Solución HANK de 15 y 30 minutos. La actividad mTORC1 se midió como grado de fosforilación de su sustrato p70^{S6k}. Los niveles totales de p70^{S6k} se usaron para normalizar la proteína fosforilada (panel izquierdo). Recuento de células con morfología GFPLC3 punteada durante privación de nutrientes en presencia de dosis crecientes de PJ34. Recuento de al menos 250 células bajo microscopía de fluorescencia. *p<0.05, **p<0.01 para comparar células MCF7 GFPLC3 no tratadas y privadas de nutrientes con células privadas y tratadas con dosis crecientes de PJ34.

No se obtuvieron conclusiones aumentando la concentración a más de 20 μM de PJ34, ya que a más concentración se ve muy afectada la viabilidad celular y los resultados son contradictorios a la hora de explicarlos. Los datos demuestran que la inhibición de la autofagia inducida por privación de nutrientes por parte de los inhibidores de PARPs es independiente de mTORC1, mientras que el efecto del silenciamiento específico de PARP-1 sobre la autofagia precisa de una reactivación de mTORC1.

El segundo sustrato a través de cual AMPk regula la inducción de autofagia es ULK1. Para que AMPk se una y active por fosforilación a ULK1, se necesita que ocurran dos eventos: (1) se precisa de una carencia energética y nutricional que promueva la activación de AMPk (2) se debe disociar mTORC1 de ULK1 permitiendo que AMPk, vía fosforilación de Raptor, inactive a mTORC1 y active por unión y fosforilación a ULK1 (Zhao and Klionsky 2011). Por ello continuamos confirmando que el silenciamiento de PARP-1 es más efectivo sobre la actividad de mTORC1 que el tratamiento con PJ34, analizando el grado de fosforilación que AMPk ejerce sobre Raptor durante privación de nutrientes. La eliminación de PARP-1 acarrea una pérdida total de fosforilación de Raptor a través de AMPk y en consecuencia el complejo mTORC1 se mantiene activo y la autofagia inactiva (**Figura 4.C**). Por el contrario el PJ34 no es capaz de eliminar la fosforilación de Raptor en niveles adecuados como para reactivar mTORC1, con lo cual la inhibición de la autofagia que ejercen los inhibidores de PARPs parece ser independiente de la actividad mTORC1. La especificidad de fosforilación de Raptor por parte de AMPk la demostramos comparando el grado de fosforilación que la privación de nutrientes ejerce sobre Raptor con un control positivo de activación de AMPk como es el AICAR; podemos comparar la fosforilación de ACC y Raptor y la defosforilación de p70^{S6k} entre ambos estímulos (**Figura S.5**). Probablemente el uso de inhibidores de PARPs esté propiciando la activación de rutas suplementarias que podrían mantener inactivo a mTORC1, aunque aún no conocemos el sentido biológico de esto, ya que no concuerda con el grado de caída en los niveles totales de autofagia (**Figura 4.D**). El uso de un inhibidor de última generación de PARPs como es KUDOS muestra los mismos resultados sobre la ruta, de forma que vuelve a impedir que se active AMPk y de nuevo ejerce un efecto global sobre ULK1 de forma independiente a la inactivación de mTORC1 (**Figura S6.A y S6.B**).

Finalmente el sustrato clave de AMPk que debe ser activado para que se inicie la formación del autofagosoma es ULK1. Para ello células MCF7 GFPLC3 fueron silenciadas para PARP-1 y pretratadas con PJ34 10 μ M y posteriormente privadas de nutrientes con Solución HANK. Los niveles de fosforilación de ULK1 por parte de AMPk, desaparecieron totalmente al eliminar PARP-1 por siRNA, con lo cual la inhibición de la autofagia es total (**Figura 4.E**). EL PJ34 actúa en el mismo

sentido y prácticamente elimina la fosforilación de ULK1 al igual que la situación siPARP-1, con lo cual la autofagia también queda seriamente comprometida **(Figura 4.F)**. La conclusión es que bloqueando la formación de PAR, se paraliza la señalización del eje Sensor Energético AMPk/Sensor Nutricional mTORC1/core autofágico ULK1. El resultado final es el bloqueo de la formación de los autofagosomas.

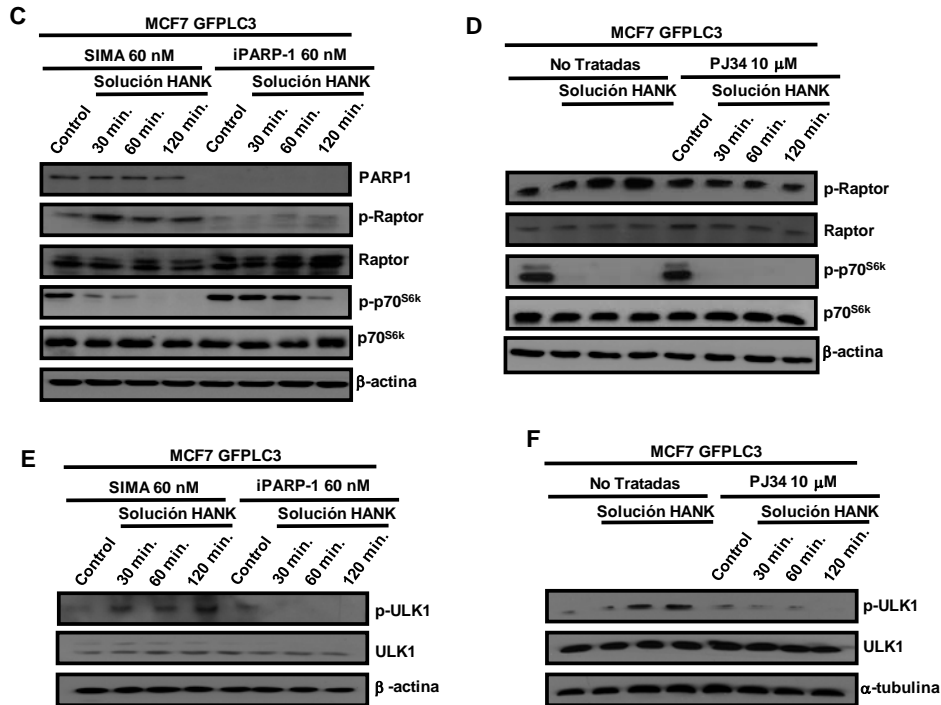


Figura 4: Efecto de la inhibición de la PARilación sobre el eje AMPk/mTORC1/ULK1 (II): (C) Efecto del PJ34 sobre el sustrato de AMPk, Raptor. Células MCF7 GFPLC3 fueron pretratadas con PJ34 10 μM durante 1.5 horas, manteniéndolo durante la privación. La actividad de AMPk sobre mTORC1 se evaluó como niveles de fosforilación de Raptor y La actividad mTORC1 se midió como grado de fosforilación de su sustrato p70^{S6k}. Proteínas Raptor y p70^{S6k} totales se usaron para normalizar los niveles de proteínas fosforiladas. **(D)** Efecto del PJ34 sobre el core autofágico regulado por AMPk. Células MCF7 GFPLC3 fueron pretratadas con PJ34 10 μM durante 1.5 horas, manteniéndolo durante la privación. La actividad de AMPk sobre la autofagia se evaluó como niveles de fosforilación de ULK1. ULK1 total se usó para normalizar la proteína fosforilada. **(E)** Efecto del silenciamiento de PARP-1 sobre el sustrato de AMPk, Raptor. Células MCF7 GFPLC3 fueron transfectadas con siRNA PARP-1 (60nM) (panel izquierdo) y su control siRNA inespecífico SIMA (60nM). 48 horas después se las privó de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 30, 60 y 120 minutos. La actividad de AMPk sobre mTORC1 se evaluó como niveles de fosforilación de Raptor y La actividad mTORC1 se midió como grado de fosforilación de su sustrato p70^{S6k}. Proteínas Raptor y p70^{S6k} totales se usaron para normalizar los niveles de proteínas fosforiladas. **(F)** Efecto del silenciamiento de PARP-1 sobre el core autofágico regulado por AMPk. Células MCF7 GFPLC3 fueron transfectadas con siRNA PARP-1 (60nM) (panel izquierdo) y su control siRNA inespecífico SIMA (60nM). 48 horas después se las privó de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 30, 60 y 120 minutos. La actividad de AMPk sobre la autofagia se evaluó como niveles de fosforilación de ULK1. ULK1 total se usó para normalizar la proteína fosforilada. En todos los casos se obtuvieron similares resultados en 3 experimentos independientes. α-tubulina y β-actina fueron usadas como control de carga.

Discusión

Uno de los requisitos fundamentales para la subsistencia celular es el mantenimiento de la homeostasis energética, que viene marcado por el balance entre la síntesis y el consumo de ATP. Las células podrían definirse como sistemas en continua adaptación al medio que las rodea, por lo tanto son sistemas que tienden al automantenimiento adaptativo. De forma general las células dependen en gran medida de la disponibilidad de nutrientes, oxígeno y energía que haya en el medio extracelular que les rodea, esta pauta se mantiene tanto en organismos unicelulares de vida libre como en células que constituyen tejidos, órganos o sistemas. Sin embargo células autónomas pueden ser capaces de monitorizar y adaptarse de forma apropiada a las continuas fluctuaciones en las fuentes externas de energía, así en el caso de que se den situaciones de insuficiencia energética o nutricional la célula podría iniciar tropismo hacia las fuentes más disponibles y de fácil acceso. Dentro de los organismos pluricelulares, o incluso en células de vida libre que no presentan fuentes energéticas externas accesibles, la carencia nutricional se intenta suplir de forma provisional con procesos de autodigestión interna (Yang and Klionsky 2010). A este proceso se le denomina Autofagia y comprende un importante tráfico de estructuras y moléculas citosólicas con el fin de que sean degradadas hasta sus componentes más esenciales, que servirán de fuente de biomoléculas esenciales en el mantenimiento de la homeostasis celular. La intensidad y durabilidad con que la célula sufra autofagia, va a marcar el destino final de la misma. En este sentido un proceso autofágico encaminado a la adaptación y supervivencia, puede derivar en muerte celular si las condiciones adversas no se restauran en un determinado momento. En este capítulo demostramos como los sensores energéticos y nutricionales más importantes de la célula (AMPk y mTORC1 respectivamente), necesitan de una correcta activación de la proteína nuclear PARP-1 para su activación y señalización hacia la autofagia adaptativa inducida por privación nutricional.

Nuestros resultados demuestran que la pérdida de la actividad PARP en células tumorales acarrea una importante inhibición de la actividad AMPk, incluso bajo condiciones de estrés energético, como es la inducción de autofagia por

retirada de nutrientes. Como consecuencia el complejo mTORC1 va a permanecer activo incluso bajo condiciones nutricionales adversas y el efecto global es una marcada ralentización del proceso de autofagia y en consecuencia una ineficaz adaptación a la carencia de nutrientes por parte de la célula. Los nuevos datos obtenidos en el laboratorio nos permiten conocer cómo PARP-1 y el proceso de ADP-Ribosilación regulan la actividad de AMPk y las repercusiones que los niveles de ADP-Ribosa tienen sobre la formación de los autofagosomas (**Figura 1**).

Distintos miembros de la familia PARP, se encargan de regular multitud de funciones relacionadas con el metabolismo celular. Ratones deficientes en la proteína PARP-1 son más pequeños y presentan menos acumulación lipídica que los ratones *wildtype*. Además se sabe que presentan alto consumo de oxígeno e importantes carencias en los procesos de β -oxidación de ácidos grasos (Bai, Canto et al. (2011). Nuestros resultados demuestran que el mantenimiento de unos niveles óptimos de Poli ADP-Ribosilación, favorecen la formación de autofagosomas durante el estrés por carencia de nutrientes y energía. Aún no se conoce con exactitud todo el mecanismo por el cual los autofagosomas se forman. Existe mucha discrepancia acerca del origen, aunque se está de acuerdo en la necesidad de que se formen a partir estructuras membranosas llamadas Fagóforos que sirvan de base sobre la cual constituir el autofagosoma. Hay datos que demuestran que no siempre son membranas de nueva síntesis, sino que derivan de dobles membranas lipídicas preexistentes (Tooze and Yoshimori 2010). Es muy probable que durante la síntesis *de novo* de los Fagóforos, el proceso de PARilación tenga una función reguladora importante ya que hemos demostrado que diversas proteínas implicadas en la etapas de Nucleación y Elongación de los Fagóforos, como es el caso de ULK1, se encuentran disminuidas en actividad en ausencia de PARP-1 o durante el uso de inhibidores de PARPs. Datos que apoyan nuestros resultados, muestran que la proteína PARP-10 (ARTD10) en su forma citosólica es susceptible de Poli Ubiquitinización y colocaliza en parte con la proteína p62/SQSTM1 que podría marcar su degradación y actuaría como punto de control de la misma. El hecho de que p62 sea una proteína que regula en parte la “carga proteica” susceptible de ser Poli ADP-Ribosilada y degradada en autofagosomas, hace pensar que ARTD10 podría estar implicada en la ruta de autofagia (Kleine, Herrmann et al. 2012).

Durante los procesos de respuesta a estrés PARP-1 puede ver comprometida su actividad por distintas proteínas, con lo cual es capaz de sufrir muchos tipos de modificaciones post-traduccionales. Está descrito que PARP-1 puede modificarse por acetilación a través de la Acetil-Transferasa p300/CBP (Hassa, Haenni et al. 2005), SUMOilización a través de la Ubiquitín Ligasa E3 RNF146/Iduna (Andrabi, Kang et al. 2011) o incluso fosforilación por las quinasas ERK1/2 (Alano, Kauppinen et al. 2006) e incluso está descrito que interaccionaría a través del metabolismo del NAD⁺ con la quinasa AMPk (Shin, Cho et al. 2009) . Hemos demostrado que existe una población nuclear de la quinasa AMPk que se encuentra en interacción directa con PARP-1 (**Figura 3**) y que necesita de la activación de ésta, para poder ejercer su acción en la ruta de autofagia en el citosol. Así en condiciones basales, AMPk se encuentra interaccionando con PARP-1 en un estado que podríamos considerar como inactivo, ya que las condiciones de energía y nutrientes son idóneas. Durante eventos de carencia nutricional y privación ocurren dos hechos fundamentales para que se induzca autofagia: (1) la ausencia de nutrientes provoca la activación de PARP-1, la cual va a modificar por Poli ADP-Ribosilación a AMPk, separándose ambas proteínas y quedando modificadas por ADP-Ribosa. Con los datos que tenemos no podemos saber si en estas condiciones se produciría también la fosforilación de PARP-1 por AMPk, que podría ser necesaria para su activación. En cualquier caso, sí parece que la automodificación PARP-1 por PAR puede ser una señal para la separación del complejo AMPk/PARP-1. (2) En este momento ambas proteínas emprenden caminos separados, PARP-1 PARilada (también probablemente fosforilada por AMPk) señalará los daños al ADN derivados de los ROS generados durante la privación y AMPk PARilada va a ser exportada a través de la membrana nuclear hacia el citosol, donde junto con la caída en los niveles de ATP como consecuencia de la sobreactivación de PARP-1 y de la propia privación de nutrientes, creará un entorno molecular adecuado para que la quinasa LKB1 se active y fosforile al resto de población citosólica de AMPk, permitiendo la inhibición de mTORC1 y la activación de *core* autofágico ULK1/mATG13/FIP200 (**Figura 5**). Trabajos anteriores han demostrado la regulación de la proteína de exportación nuclear CRM1 por PARP-1 durante la retención nuclear de p53 y de p65/NfκB (Kanai, Hanashiro et al. 2007, Zerfaoui, Errami et al. 2010); en estos trabajos se pone de manifiesto que CRM1 no puede

reconocer a p53 o p65 PARiladas y por tanto no permite su paso al citosol, facilitando así su acumulación nuclear. En nuestro caso la PARilación de AMPk parece ser la señal para permitir la salida nuclear de CRM1 por lo que debe estar actuando otro mecanismo de reconocimiento para permitir la salida nuclear de AMPk, aunque la implicación de CRM1 no puede ser excluida en este caso.

Los inhibidores de PARPs o el uso de siRNA específico para PARP-1 consiguen bloquear la activación de PARP-1 asociada a la privación de nutrientes y en consecuencia no dejan que se separe el complejo, quedando AMPk bloqueada en el núcleo. La consecuencia es que la activación de LKB1 va a ser mucho menor y la autofagia estará enlentecida. Los resultados de la figura 1 apoyan este hecho y sugieren fuertemente un papel regulador del polímero de ADP-Ribosa sobre el flujo autofágico. La consecuencia es que PARP-1 y el polímero de ADP-Ribosa no solo regulan la autofagia a nivel de AMPk, sino que parte del polímero podría intervenir sobre otros componentes de la ruta AMPk/mTORC1/ULK1.

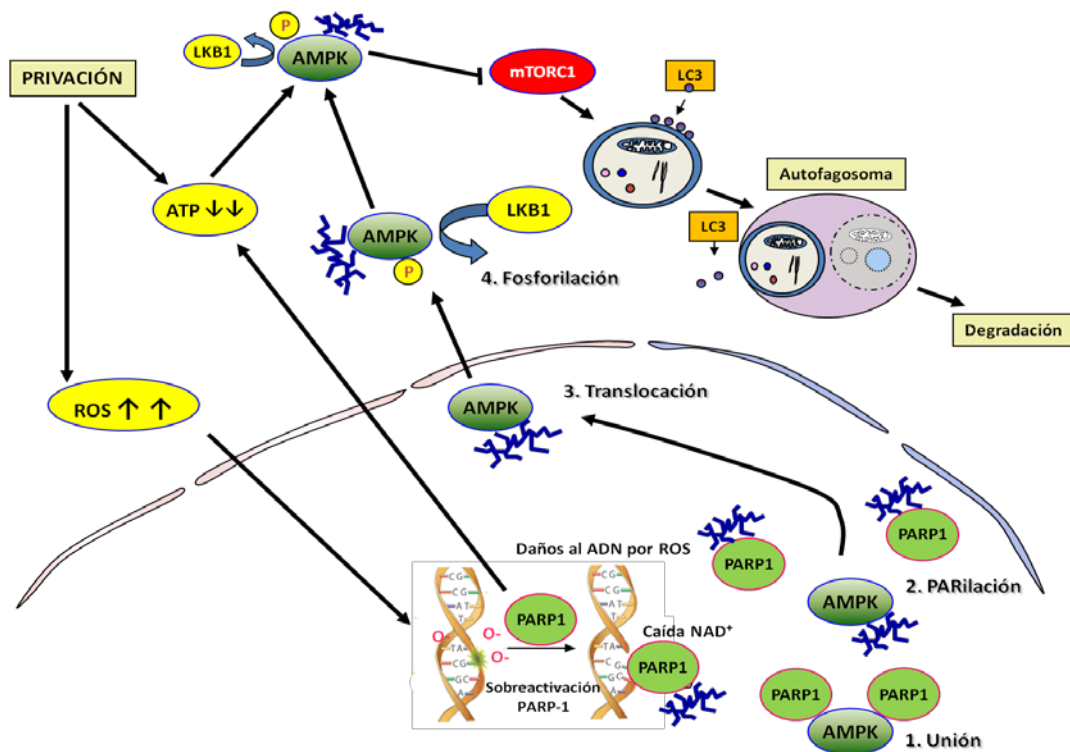


Figura 5: Interacción Física/Funcional PARP-1/AMPk. En condiciones basales ambas proteínas se encuentran interactuando. Durante privación de nutrientes la presencia de ROS induce daños al ADN, se activa a PARP-1 que PARila a AMPk y se separan. AMPk PARilada se transloca al citosol y junto con la depleción energética en ATP, permite la activación de LKB1 y la inducción de autofagia.

Una vez que se ha producido la activación de AMPk va a tener lugar la

fosforilación de dos dianas claves en el proceso de inducción de autofagia, el complejo mTORC1 y el *core* autofágico ULK1/mATG13/FIP200. Para ello AMPk realiza una serie de fosforilaciones en distintos sustratos con el fin de inhibir la interacción de mTORC1 con el complejo ULK1, consiguiendo que se separe de él y dejarlo accesible a la propia AMPk. Al mismo tiempo AMPk fosforila el componente Raptor de mTORC1 inhibiendo su actividad y se une a ULK1 activando el *core* (Yang and Klionsky 2010). Nuestros datos demuestran que PARP-1 regula la activación del *core* autofágico, ya que la pérdida o el silenciamiento de la actividad PARP-1 ocasiona una pérdida de la actividad AMPk y en consecuencia se induce reactivación del complejo mTORC1 y la caída en los niveles de fosforilación de ULK1. La consecuencia es que la autofagia queda inhibida. Los datos reflejan el potencial del polímero de ADP-Ribosa como molécula señalizadora en el eje AMPk/mTORC1/ULK1 (**Figura 6**).

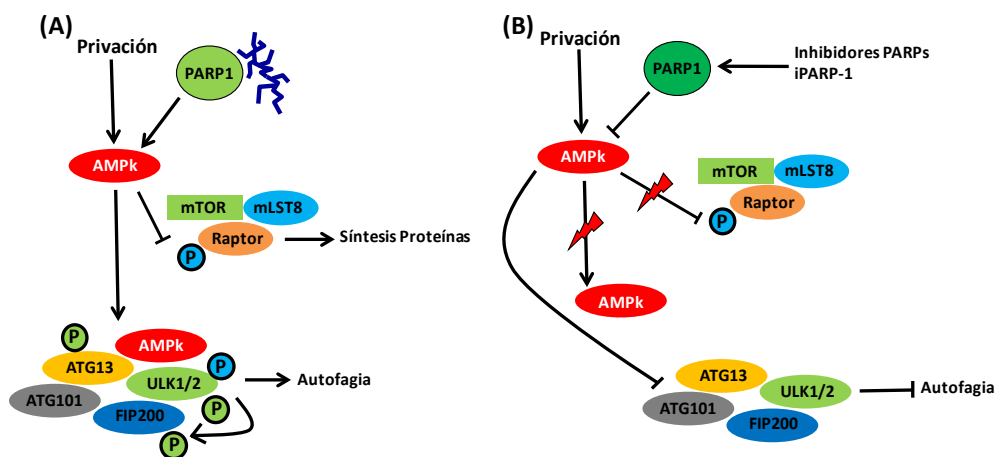


Figura 6: Eje PARP-1/AMPk/mTORC1/ULK1: **(A)** PARP-1 permite que AMPk inhiba al sensor nutricional mTORC1 y activa el complejo ULK1 (*core* autofágico) **(B)** La inhibición o el silenciamiento de PARP-1 bloquea la actividad de AMPk inhibiendo la activación del complejo ULK1.

El hecho de que la inhibición de la actividad PARP afecte de forma distinta que el silenciamiento específico de PARP-1 a la fosforilación de Raptor, indicaría que la formación del complejo AMPk/PARP-1 (y probablemente la fosforilación de PARP-1) se requiera para determinadas funciones de AMPk sobre los sustratos implicados en el inicio de la autofagia: la ausencia de PARP-1 impide completamente la activación de la ruta evitando la salida de AMPk desde el núcleo y la fosforilación de raptor y Ulk1. En este caso mTOR permanece activo durante

un tiempo y se acompaña en la ausencia de fosforilación de raptor, Ulk1 y el retraso en la autofagia; la consecuencia es el bloqueo total de la ruta en un proceso dependiente de la reactivación de mTORC1. Sin embargo la inhibición del proceso de PARilación no afecta a la activación de mTOR (que cae al mismo nivel que las células no tratadas) ejerce un efecto similar sobre AMPk y su sustrato ULK1, por lo que las consecuencias globales sobre la autofagia son las mismas que en el caso del silenciamiento de PARP-1, sin embargo parece ser un mecanismo parcialmente independiente de la reactivación de mTORC1 (**Figura 4**). Esto podría explicarse de dos formas: (1) una parte del polímero de ADP-Ribosa sintetizado por PARP-1 o por otros miembros de la familia, está translocando al citosol y ejerciendo un papel regulador sobre la activación de mTORC1 o (2) un efecto *off target* de los inhibidores de PARPs que no conocemos. En este sentido estamos analizando los niveles de reactivación de la ruta de supervivencia Akt, donde datos previos en células *parp-1*^{-/-} y en células tratadas con distintos inhibidores indican una reactivación de Akt y una fosforilación sobre su sustrato TSC1-TSC2. Dependiendo de que AMPk o Akt fosforilen al complejo TSC1-TSC2, se va a producir un efecto determinado sobre la actividad mTORC1. La fosforilación de Akt podría hacer que TSC1-TSC2 actuara sobre la GTPasa Rheb, dejando a mTORC1 inactivo a pesar de que la autofagia estuviese activa. En estos momentos, resultados preliminares parecen indicar esta posibilidad.

En resumen, el efecto que ejerce PARP-1 sobre la activación de la autofagia parece mediado por su interacción con AMPk a la que es capaz de unirse y modificar post-transduccionalmente por PARilación, siendo esta señal y la formación del complejo con PARP-1, necesarios para la salida nuclear de AMPk y la activación, aguas abajo, de la formación de autofagosomas. Quedan aún muchas preguntas por contestar: ¿cómo se explica que una cantidad pequeña de AMPk presente en el núcleo tenga que activarse en el compartimento nuclear unido a PARP-1 para disparar en el citosol toda la señal autofágica, donde reside la mayoría de la población de AMPk? ¿Hay otros componentes del core autofágico modificados por PARP-1? ¿Qué sistema de salida nuclear se está utilizando para la exportación de AMPk al citosol? ¿Cuál es la secuencia de AMPk modificada por PAR y cuáles las consecuencias de su mutación? ¿Cuál es el impacto de una PARP-1 no fosforilable por AMPk sobre el desarrollo de la autofagia? Y así podríamos seguir

haciendo un gran número de preguntas para abordar este problema biológico apasionante que nos puede arrojar luz sobre la disección molecular de la respuesta al estrés nutricional en células tumorales y abordar nuevas terapias basadas en la alteración del microambiente tumoral.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

CAPÍTULO II

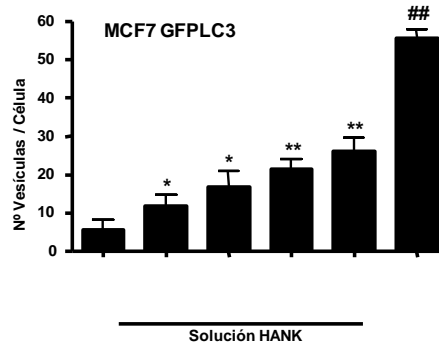


Figura S1.A. Número de vesículas GFPLC3 o autofagosomas en células MCF7 GFPLC3 privadas de nutrientes. Las células se sometieron a carencia de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 30, 60, 120 y 240 minutos. El número de vesículas positivas para LC3 se recontó bajo microscopía de fluorescencia; aproximadamente 250 células fueron contadas en 3 experimentos independientes. Con A 2nM 4horas se usó como control positivo de inducción de vesículas LC3. * p <0.05, **p<0.01 para comparar células MCF7 GFPLC3 control y privadas de nutrientes. ## p<0.01 para comparar células MCF7 GFPLC3 control y tratadas con Concanamicina A 2 nM.

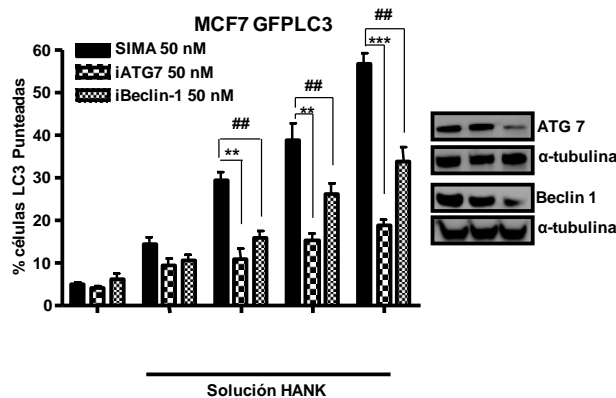


Figura S1.B. Efecto del silenciamiento de ATG7 y Beclina-1 sobre la autofagia inducida por privación de nutrientes. Células MCF7 GFPLC3 fueron transfectadas con ATG7 siRNA (60nM), Beclin1 siRNA (60nM) y SIMA o *non-specific siRNA* (60nM). 48 después de la transfección, se trataron con Solución HANK a tiempos de 30, 60, 120 y 240 minutos. El número de células con el patrón GFPLC3 se recontó bajo microscopía de fluorescencia; aproximadamente 250 células fueron contadas en 3 experimentos independientes. **p<0.01 para comparar células MCF7 GFPLC3 SIMA y silenciadas ATG7 privadas de nutrientes. ## p<0.01 para comparar células MCF7 GFPLC3 SIMA y silenciadas Beclina-1.

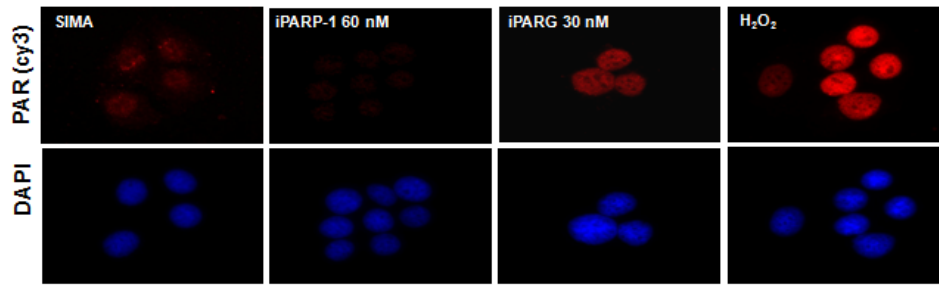


Figura S2.A. Inmunofluorescencia de polímero PAR que muestra el efecto del silenciamiento de PARP-1 y PARG en células MCF7 GFPLC3. Las células fueron transfectadas con siRNA PARP-1 (60nM) y siRNA PARG (30nM). SIMA fue utilizado como control negativo. 10 mM H₂O₂ se usó durante 10 minutos como control positivo de la formación de Poli ADP-Ribosa. Resultados similares se obtuvieron de 3 experimentos independientes.

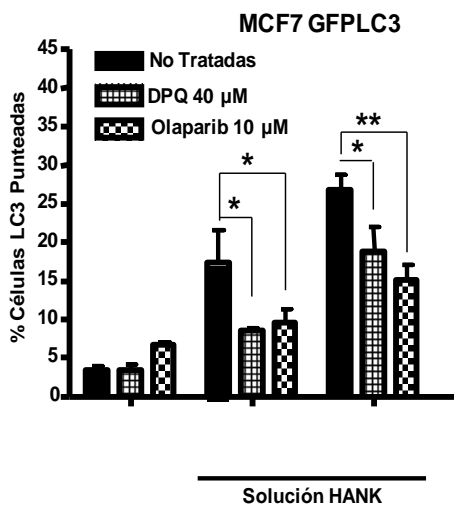


Figura S2.B. DPQ y Olaparib tienen el mismo efecto inhibitorio sobre los niveles de autofagia inducida por privación de nutrientes. Células MCF7 GFPLC3 fueron pre-tratadas con DPQ 40 μM y Olaparib 10 μM durante 1,5 horas. Ambos inhibidores fueron mantenidos durante el tiempo de tratamiento con Solución HANK durante 60 y 120 minutos. Al menos 250 células se recontaron bajo microscopía de fluorescencia, mostrándose en el gráfico el porcentaje de células con patrón autofágico GFPLC3. *p<0.05, **p<0.01 para comparar células MCF7 GFPLC3 no tratadas y privadas con MCF7 GFPLC3 con células PARPs inhibidas y privadas de nutrientes.

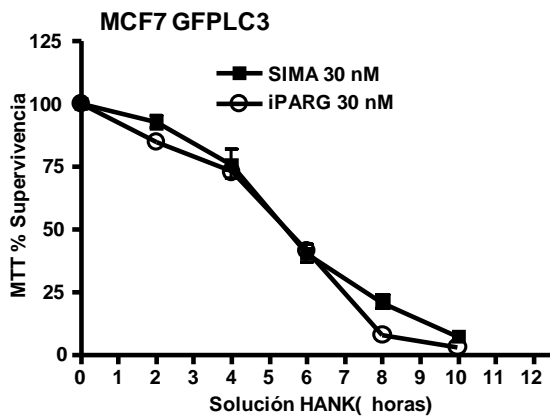


Figura S2.C. Silenciamiento de PARG y acumulación de polímero PAR no afecta a la viabilidad celular. Células MCF7 GFPLC3 fueron transfectadas con siRNA PARG (30nM) y con el control negativo SIMA (30nM) y posteriormente tratadas con Solución HANK a distintos tiempos. El porcentaje de viabilidad celular se obtuvo por el método del MTT según se describe en el apartado de material y métodos. Resultados similares se obtuvieron de 4 experimentos independientes con 2 réplicas por condición ensayada.

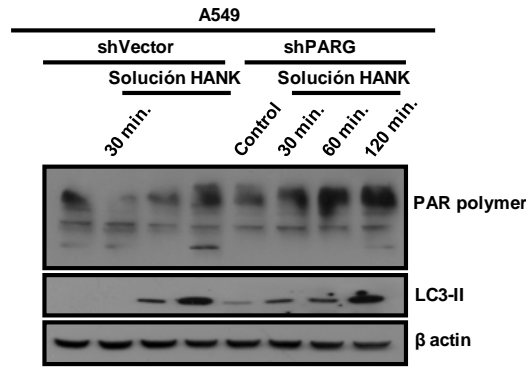


Figura S3. Producción de PAR en células A549 durante retirada de nutrientes. Células *shVector* y *shPARG* A549 fueron privadas de nutrientes con Solución HANK a 30, 60 y 120 minutos y posteriormente se les extrajo proteínas totales para analizar formación de Poli ADP-Ribosa y la traslocación de la forma endógena de LC3-II, asociadas a la activación de PARP-1 y autofagia respectivamente. Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos independientes.

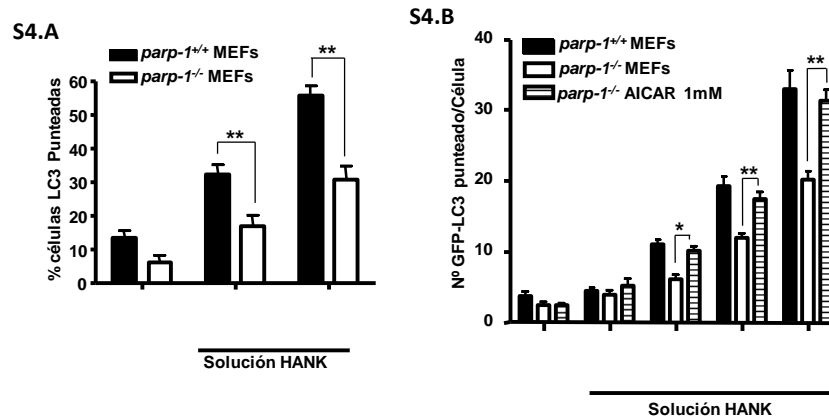


Figura S4. (A) Retraso de la autofagia en MEFs 3T3 *parp-1*^{-/-} durante la retirada de nutrientes. Ambas líneas celulares se transfectaron con el plásmido GFPLC3 y se privaron de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 60 y 120 minutos. El recuento de la población autofágica en cada línea se realizó bajo microscopía de fluorescencia en al menos 250 células repartidas en 3 experimentos independientes. ***p*<0.01 para comparar MEFs 3T3 *parp-1*^{+/+} and *parp-1*^{-/-} privados de nutrientes. **(B) El tratamiento con AICAR incrementa el número de vesículas positivas para GFPLC3 en MEFs 3T3 *parp-1*^{-/-} during starvation.** MEFs 3T3 *parp-1*^{+/+} y *parp-1*^{-/-} fueron transfectados con GFPLC3 y privadas con Solución HANK durante 30, 60, 120 y 240 minutos. El número de vesículas GFPC3 de al menos 250 células se contaron bajo microscopía de fluorescencia en 3 experimentos independientes. **p*<0.05, ***p*<0.01 para comparar MEFs 3T3 *parp-1*^{-/-} no tratados y en presencia de AICAR, ambos en un contexto de privación nutricional.

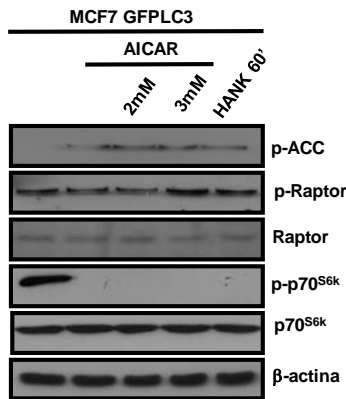


Figura S5. La fosforilación de Raptor es específica de la activación de AMPk durante retirada de nutrientes. Células MCF7 GFPLC3 fueron tratadas con AICAR a concentraciones de 1, 2 y 3 mM durante 4 horas. Los niveles de activación de AMPk, medidos como la fosforilación del sustrato ACC, además de la inhibición de mTORC1, se compararon con los resultados obtenidos para el estímulo de privación nutricional de 60 minutos con Solución HANK. Raptor total y p70^{S6k} se usaron para normalizar el grado de fosforilación de ambas proteínas y β actina como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos independientes.

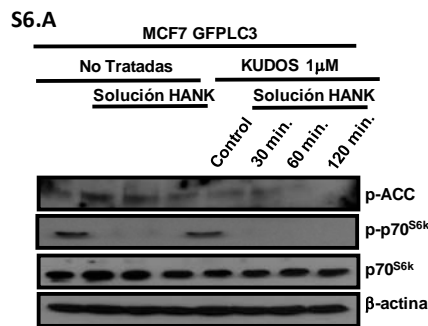


Figura S6.A. KUDOS inactiva a AMPk pero no afecta a la actividad de mTORC1 durante la retirada de nutrientes. Células MCF7 GFPLC3 fueron pretratadas con KUDOS a concentración 1µM durante 1,5 horas. El inhibidor fue mantenido durante la retirada de nutrientes con Solución HANK. La actividad de AMPk se midió como grado de fosforilización de ACC y la de mTORC1 a través del sustrato p70^{S6k}. Resultados similares fueron obtenidos en 2 experimentos independientes.

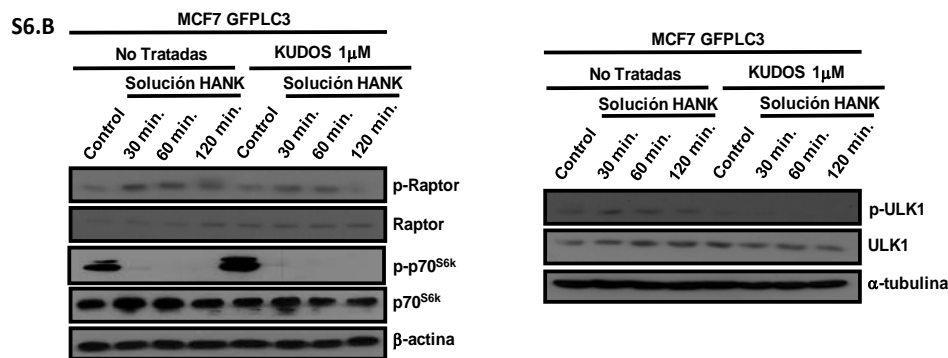


Figura S6.B KUDOS reduce los niveles de fosforilación de ULK1 por AMPk durante privación de nutrientes. Células MCF7 GFPLC3 fueron pretratadas con KUDOS a concentración 1µM durante 1,5 horas. El inhibidor fue mantenido durante la retirada de nutrientes con Solución HANK. La actividad de mTORC1 se midió a través del sustrato p70^{S6k}. Resultados similares fueron obtenidos en 2 experimentos independientes.

FIGURAS ANEXAS

CAPÍTULO II

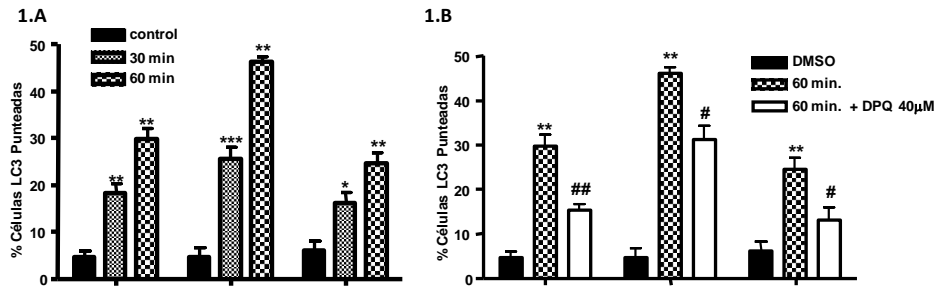


Figura Anexa 1: Niveles de autofagia en distintas líneas tumorales. (a) Células HeLa, HepG2 y EVSA-t fueron transfectadas con el plásmido GFPLC3 y privadas de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 30 y 60 minutos. En el gráfico se muestra el porcentaje de células positivas para el punteado LC3, obtenido bajo microscopía de fluorescencia. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 para comparar situación control y privadas de nutrientes en cada línea. **(b)** Efecto del inhibidor DPQ sobre la autofagia en células HeLa, HepG2 y EVSA-t transfectadas con GFPLC3 y privadas de nutrientes a 60 minutos. **p<0.01 para comparar situación control y privadas de nutrientes # p<0.05 y ## p<0.01 para comparar privadas sin tratar y tratadas con DPQ en cada línea

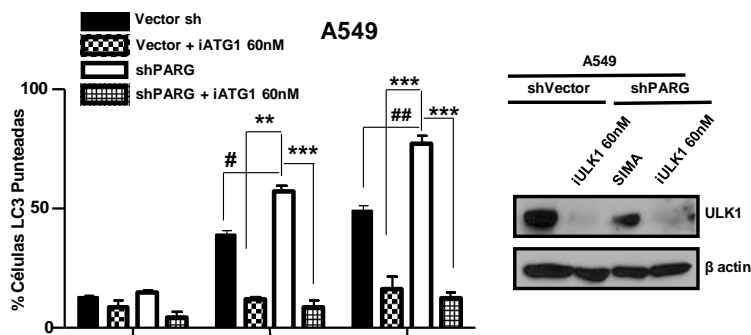


Figura Anexa 2: Efecto del Silenciamiento de ATG1 sobre los niveles de inducción de autofagia. Células A549 *shVector* y *shPARG* fueron silenciadas para ATG1 (60nM). Pasadas 48 horas fueron transfectadas con GFPLC3 y privadas de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 60 y 120 minutos. Recuento de al menos 250 células bajo microscopía de fluorescencia. *Western Blot* indicativo del grado de silenciamiento en ambas líneas celulares. # p<0.05 y ## p<0.01 para comparar A549 *shVector* privadas y A549 *shPARG* privadas de nutrientes. **p<0.01, ***p<0.001 para comparar situación iATG1 A549 *shVector* privadas e iATG1 A549 *shPARG* privadas, con respecto a A549 *shPARG* privadas de nutrientes.

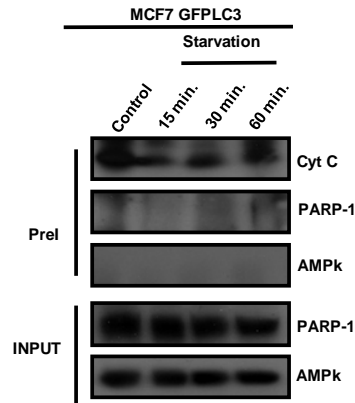


Figura Anexa 3: PreI utilizando Citocromo C como anticuerpo inespecífico. Células MCF7 GFPLC3 fueron privadas de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 15, 30 y 60 minutos. Durante el protocolo de inmunoprecipitación se usó el Citocromo C como anticuerpo inespecífico o control de la especificidad de la inmunoprecipitación de AMPk y PARP-1. Resultados similares se obtuvieron en todas las IPs realizadas en esta tesis doctoral.

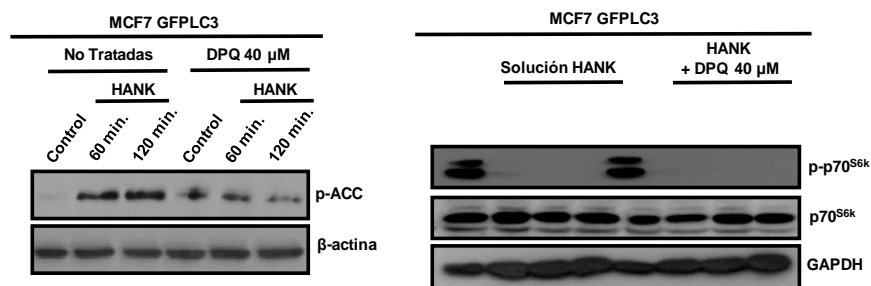


Figura Anexa 4: Efecto del inhibidor DPQ sobre la activación de AMPk e inactivación de mTORC1. Células MCF7 GFPLC3 fueron pretratadas con DPQ 40 μ M durante 1.5 horas. Pasado este tiempo fueron privadas de nutrientes con Solución HANK a tiempos de 15, 30 y 60 minutos, manteniendo en todos los casos el inhibidor. Los niveles de activación de AMPk se midieron como fosforilación del sustrato ACC y los de inactivación de mTORC1 como pérdida de fosforilación de p70^{S6k}. GAPDH y β -actina fueron usados como controles de carga. Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos independientes.

CONCLUSIONES

1. La ausencia de PARP-1 o su inhibición dan lugar a un retraso en el desarrollo de la autofagia inducida por retirada de nutrientes tanto en células normales (fibroblastos murinos) como en células tumorales de mama MCF7.
2. La retirada de nutrientes conlleva la liberación de especies reactivas de oxígeno que causan daños en el ADN y activación de PARP-1. Dicha activación repercute en la disminución de la carga energética celular, en la activación del sensor energético AMPk y la inhibición del sensor nutricional mTORC1. La inhibición farmacológica, el silenciamiento y el uso de células *knockout* para PARP-1 causa una disminución en la liberación de ROS, la caída de ATP y la activación de AMPk.
3. En ausencia de PARP-1 o tras su inhibición, la inducción de autofagia por privación de nutrientes conduce a muerte celular por apoptosis, mientras que las células donde PARP-1 no se ha alterado mueren a consecuencia de la autofagia sin características de apoptosis.
4. El retraso de la autofagia en ausencia de PARP-1 tiene consecuencias *in vivo* con la falta de acumulación de vesículas lipídicas y de características morfológicas de autofagia en el hígado de ratones *parp-1 knockout*.
5. La acumulación de Poli (ADP-Ribosa) (PAR) incrementa la autofagia, sin afectar a la viabilidad celular, en células tumorales de mama o de pulmón silenciadas para el enzima de degradación de PAR, Poli (ADP-Ribosa) Glicohidrolasa (PARG). Esta acumulación también se acompaña por un aumento de la activación de AMPk. La activación forzada de AMPk por el inductor AICAR impide el retraso en autofagia inducido por la inhibición de PARP, indicando que la interacción entre AMPk y PARP es determinante en el papel de PARP-1 sobre la autofagia.
6. AMPk y PARP-1 se encuentran formando un complejo nuclear en células no inducidas a autofagia. Tras la privación de nutrientes este complejo se disocia, AMPk es Poli (ADP-Ribosilada) y exportada al citoplasma para activar sustratos aguas abajo necesarios para inducir la autofagia.
7. La modificación de AMPk por PAR y la formación del complejo AMPk/PARP-1 son necesarios para la activación óptima de AMPk durante la autofagia.

Todos estos resultados ponen de manifiesto una función reguladora fundamental de PARP-1 y de Poli (ADP-ribosa) que determina, en último término, la capacidad adaptativa de las células tanto tumorales como no tumorales, en respuesta a estrés nutricional y demuestran una interacción estructural y funcional entre AMPk y la señalización a través de PARP-1.

PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis doctoral y atendiendo a la gran cantidad de funciones que se le atribuyen a las rutas (Poli ADP-Ribosilación y Autofagia) y proteínas (PARP-1 y AMPk) objeto de estudio, proponemos los siguientes experimentos futuros que ayudarán a conocer mejor la interconexión y las implicaciones en biología tumoral:

1) Ensayos Interacción PARP-1/AMPk:

- Estudiar la interacción de la quinasa AMPk con otros miembros de la familia PARP dependientes de NAD⁺ durante privación de nutrientes, destacando PARP-2 por sus implicaciones en el metabolismo energético y en el desarrollo celular.
- Realizar ensayos de PARilación *in vitro* para confirmar el grado de modificación por Poli ADP-Ribosa que sufre AMPk. En caso de existir interacción física con PARP-2, determinar la importancia del polímero PAR sintetizado por PARP-1 y PARP-2 en la activación de AMPk durante privación de nutrientes, mediante siRNA específico para ambas proteínas.
- Confirmar los dominios de interacción/PARilación de AMPk con PARP-1 y así determinar si la modificación por PAR es una señal de traslocación o por el contrario es necesaria para la activación de AMPk en el citosol. Realizar ensayos de mutagénesis dirigida a los dominios de interacción o putativos de ser Poli ADP-Ribosilados y observar las consecuencias en autofagia.
- Realizar ensayos de subfraccionamiento núcleo-citosol durante privación de nutrientes en presencia de inhibidores del proteasoma y de inhibidores de la traslocación nuclear, para confirmar la funcionalidad de la proteína AMPk PARilada fuera del núcleo.
- Ensayos de Fosforilación *in vitro* de AMPk sobre PARP-1 para estudiar si AMPk podría estar implicada en la activación de PARP-1 durante fenómenos de daños al ADN.

2) Ensayos Señalización Ruta LKB1/AMPk/mTORC1/ULK1:

- Determinar el grado de activación de la proteína LKB1 durante privación de nutrientes en presencia de inhibidores de PARP-1.
- Realizar el silenciamiento específico de LKB1 y medir niveles totales de activación de AMPk, inactivación de mTORC1 e inducción de autofagia durante privación de nutrientes, siempre en comparativa con el efecto de los inhibidores de PARPs sobre la ruta.
- Completar el estudio de la regulación de AMPk sobre mTORC1 estudiando el grado de activación de TSC1/TSC2 en presencia de inhibidores de PARPs y silenciamiento específico de PARP-1. Confirmar el mayor efecto sobre la inhibición de mTORC1 del silenciamiento de PARP-1.
- Estudiar la interacción física entre AMPk y el *core* autofágico ULK1/mATG13/FIP200 necesario para el inicio de la formación de los autofagosomas, durante retirada de nutrientes y en presencia de inhibidores de PARPs.
- Ampliar el conocimiento en la ruta de señalización de autofagia utilizando como objeto de estudio la proteína p62, reguladora de la vía del proteasoma. Estudiar el efecto del silenciamiento de PARP-1 y PARG sobre la regulación de p62 durante retirada de nutrientes.
- Estudiar en profundidad la ruta de supervivencia Akt y su relación con AMPk/mTORC1, durante retirada de nutrientes en presencia de inhibidores de la PARilación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguiar, R. C., K. Takeyama, C. He, K. Kreinbrink and M. A. Shipp (2005). "B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity." J Biol Chem **280**(40): 33756-33765.
- Aguilar-Quesada, R., J. A. Munoz-Gamez, D. Martin-Oliva, A. Peralta, M. T. Valenzuela, R. Matinez-Romero, R. Quiles-Perez, J. Menissier-de Murcia, G. de Murcia, M. Ruiz de Almodovar and F. J. Oliver (2007). "Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition." BMC Mol Biol **8**: 29.
- Akiyama, T., S. Takasawa, K. Nata, S. Kobayashi, M. Abe, N. J. Shervani, T. Ikeda, K. Nakagawa, M. Unno, S. Matsuno and H. Okamoto (2001). "Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosylation)." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 48-53.
- Alano, C. C., T. M. Kauppinen, A. V. Valls and R. A. Swanson (2006). "Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(25): 9685-9690.
- Alessi, D. R., K. Sakamoto and J. R. Bayascas (2006). "LKB1-dependent signaling pathways." Annu Rev Biochem **75**: 137-163.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell **87**(2): 171.
- Altmeyer, M., S. Messner, P. O. Hassa, M. Fey and M. O. Hottiger (2009). "Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites." Nucleic Acids Res **37**(11): 3723-3738.
- Alvarez-Gonzalez, R., T. A. Watkins, P. K. Gill, J. L. Reed and H. Mendoza-Alvarez (1999). "Regulatory mechanisms of poly(ADP-ribose) polymerase." Mol Cell Biochem **193**(1-2): 19-22.
- Allan, L. A. and P. R. Clarke (2009). "Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation." FEBS J **276**(21): 6063-6073.
- Ambrose, H. E., V. Papadopoulou, R. W. Beswick and S. D. Wagner (2007). "Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) binds in a sequence-specific manner at the Bcl-6 locus and contributes to the regulation of Bcl-6 transcription." Oncogene **26**(42): 6244-6252.
- Ambrose, H. E., S. Willimott, R. W. Beswick, F. Dantzer, J. M. de Murcia, J. Yelamos and S. D. Wagner (2009). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1)-deficient mice demonstrate abnormal antibody responses." Immunology **127**(2): 178-186.
- Ame, J. C., V. Rolli, V. Schreiber, C. Niedergang, F. Apiou, P. Decker, S. Muller, T. Hoger, J. Menissier-de Murcia and G. de Murcia (1999). "PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase." J Biol Chem **274**(25): 17860-17868.
- Ame, J. C., C. Spenlehauer and G. de Murcia (2004). "The PARP superfamily." Bioessays **26**(8): 882-893.
- Amiri, K. I., H. C. Ha, M. E. Smulson and A. Richmond (2006). "Differential regulation of CXCL1 transcription in melanoma cell lines by poly(ADP-ribose) polymerase-1." Oncogene **25**(59): 7714-7722.
- Andrabi, S. A., H. C. Kang, J. F. Haince, Y. I. Lee, J. Zhang, Z. Chi, A. B. West, R. C. Koehler, G. G. Poirier, T. M. Dawson and V. L. Dawson (2011). "Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymerase-induced cell death." Nat Med **17**(6): 692-699.

- Andrabi, S. A., N. S. Kim, S. W. Yu, H. Wang, D. W. Koh, M. Sasaki, J. A. Klaus, T. Otsuka, Z. Zhang, R. C. Koehler, P. D. Hurn, G. G. Poirier, V. L. Dawson and T. M. Dawson (2006). "Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18308-18313.
- Arias, E. and A. M. Cuervo (2011). "Chaperone-mediated autophagy in protein quality control." Curr Opin Cell Biol **23**(2): 184-189.
- Asher, G., H. Reinke, M. Altmeyer, M. Gutierrez-Arcelus, M. O. Hottiger and U. Schibler (2010). "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding." Cell **142**(6): 943-953.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
- Ashworth, A. (2008). "Drug resistance caused by reversion mutation." Cancer Res **68**(24): 10021-10023.
- Augustin, A., C. Spenlehauer, H. Dumond, J. Menissier-De Murcia, M. Piel, A. C. Schmit, F. Apiou, J. L. Vonesch, M. Kock, M. Bornens and G. De Murcia (2003). "PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression." J Cell Sci **116**(Pt 8): 1551-1562.
- Babiychuk, E., M. Van Montagu and S. Kushnir (2001). "N-terminal domains of plant poly(ADP-ribose) polymerases define their association with mitotic chromosomes." Plant J **28**(3): 245-255.
- Bach, M., M. Larance, D. E. James and G. Ramm (2011). "The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events." Biochem J **440**(2): 283-291.
- Baehrecke, E. H. (2005). "Autophagy: dual roles in life and death?" Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 505-510.
- Bai, P., C. Canto, A. Brunyanszki, A. Huber, M. Szanto, Y. Cen, H. Yamamoto, S. M. Houten, B. Kiss, H. Oudart, P. Gergely, J. Menissier-de Murcia, V. Schreiber, A. A. Sauve and J. Auwerx (2011). "PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure." Cell Metab **13**(4): 450-460.
- Bai, P., C. Canto, H. Oudart, A. Brunyanszki, Y. Cen, C. Thomas, H. Yamamoto, A. Huber, B. Kiss, R. H. Houtkooper, K. Schoonjans, V. Schreiber, A. A. Sauve, J. Menissier-de Murcia and J. Auwerx (2011). "PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation." Cell Metab **13**(4): 461-468.
- Banasik, M., H. Komura, M. Shimoyama and K. Ueda (1992). "Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase." J Biol Chem **267**(3): 1569-1575.
- Barnhart, B. C., P. Legembre, E. Pietras, C. Bubic, G. Franzoso and M. E. Peter (2004). "CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells." EMBO J **23**(15): 3175-3185.
- Bateman, A. (1997). "The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein." Trends Biochem Sci **22**(1): 12-13.
- Baud, V. and M. Karin (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." Trends Cell Biol **11**(9): 372-377.
- Bauer, P. I., H. J. Chen, E. Kenesi, I. Kenessey, K. G. Buki, E. Kirsten, A. Hakam, J. I. Hwang and E. Kun (2001). "Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding." FEBS Lett **506**(3): 239-242.

- Behrends, C., M. E. Sowa, S. P. Gygi and J. W. Harper (2010). "Network organization of the human autophagy system." Nature **466**(7302): 68-76.
- Bernstein, C., H. Bernstein, C. M. Payne and H. Garewal (2002). "DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis." Mutat Res **511**(2): 145-178.
- Bertazza, L., S. Mocellin and D. Nitti (2008). "Circulating tumor cells in solid cancer: tumor marker of clinical relevance?" Curr Oncol Rep **10**(2): 137-146.
- Besson, V. C., N. Croci, R. G. Boulu, M. Plotkine and C. Marchand-Verrecchia (2003). "Deleterious poly(ADP-ribose)polymerase-1 pathway activation in traumatic brain injury in rat." Brain Res **989**(1): 58-66.
- Besson, V. C., I. Margail, M. Plotkine and C. Marchand-Verrecchia (2003). "Deleterious activation of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in brain after in vivo oxidative stress." Free Radic Res **37**(11): 1201-1208.
- Blenn, C., P. Wyrsh, J. Bader, M. Bollhalder and F. R. Althaus (2011). "Poly(ADP-ribose)glycohydrolase is an upstream regulator of Ca²⁺ fluxes in oxidative cell death." Cell Mol Life Sci **68**(8): 1455-1466.
- Blommaert, E. F., U. Krause, J. P. Schellens, H. Vreeling-Sindelarova and A. J. Meijer (1997). "The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes." Eur J Biochem **243**(1-2): 240-246.
- Bodemann, B. O., A. Orvedahl, T. Cheng, R. R. Ram, Y. H. Ou, E. Formstecher, M. Maiti, C. C. Hazelett, E. M. Wauson, M. Balakireva, J. H. Camonis, C. Yeaman, B. Levine and M. A. White (2011). "RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly." Cell **144**(2): 253-267.
- Boehler, C. and F. Dantzer (2011). "PARP-3, a DNA-dependent PARP with emerging roles in double-strand break repair and mitotic progression." Cell Cycle **10**(7): 1023-1024.
- Boehler, C., L. Gauthier, J. Yelamos, A. Noll, V. Schreiber and F. Dantzer (2011). "Phenotypic characterization of Parp-1 and Parp-2 deficient mice and cells." Methods Mol Biol **780**: 313-336.
- Boehler, C., L. R. Gauthier, O. Mortusewicz, D. S. Biard, J. M. Saliou, A. Bresson, S. Sanglier-Cianferani, S. Smith, V. Schreiber, F. Boussin and F. Dantzer (2011). "Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(7): 2783-2788.
- Bork, P., K. Hofmann, P. Bucher, A. F. Neuwald, S. F. Altschul and E. V. Koonin (1997). "A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins." FASEB J **11**(1): 68-76.
- Bras, M., B. Queenan and S. A. Susin (2005). "Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying." Biochemistry (Mosc) **70**(2): 231-239.
- Brennan, M. A. and B. T. Cookson (2000). "Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis." Mol Microbiol **38**(1): 31-40.
- Broker, L. E., F. A. Kruyt and G. Giaccone (2005). "Cell death independent of caspases: a review." Clin Cancer Res **11**(9): 3155-3162.
- Brown, E. J., M. W. Albers, T. B. Shin, K. Ichikawa, C. T. Keith, W. S. Lane and S. L. Schreiber (1994). "A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex." Nature **369**(6483): 756-758.
- Bryant, H. E., E. Petermann, N. Schultz, A. S. Jemth, O. Loseva, N. Issaeva, F. Johansson, S. Fernandez, P. McGlynn and T. Helleday (2009). "PARP is activated at stalled forks to

- mediate Mre11-dependent replication restart and recombination." *EMBO J* **28**(17): 2601-2615.
- Bryant, H. E., N. Schultz, H. D. Thomas, K. M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N. J. Curtin and T. Helleday (2005). "Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase." *Nature* **434**(7035): 913-917.
- Budanov, A. V. and M. Karin (2008). "p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling." *Cell* **134**(3): 451-460.
- Bungard, D., B. J. Fuerth, P. Y. Zeng, B. Faubert, N. L. Maas, B. Viollet, D. Carling, C. B. Thompson, R. G. Jones and S. L. Berger (2010). "Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation." *Science* **329**(5996): 1201-1205.
- Burkle, A. (2001). "Poly(ADP-ribosyl)ation, a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability." *Cancer Lett* **163**(1): 1-5.
- Burkle, A. (2005). "Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD+." *FEBS J* **272**(18): 4576-4589.
- Burman, C. and N. T. Ktistakis (2010). "Autophagosome formation in mammalian cells." *Semin Immunopathol* **32**(4): 397-413.
- Cafferkey, R., P. R. Young, M. M. McLaughlin, D. J. Bergsma, Y. Koltin, G. M. Sathe, L. Faucette, W. K. Eng, R. K. Johnson and G. P. Livi (1993). "Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity." *Mol Cell Biol* **13**(10): 6012-6023.
- Calabrese, C. R., R. Almassy, S. Barton, M. A. Batey, A. H. Calvert, S. Canan-Koch, B. W. Durkacz, Z. Hostomsky, R. A. Kumpf, S. Kyle, J. Li, K. Maegley, D. R. Newell, E. Notarianni, I. J. Stratford, D. Skalitzky, H. D. Thomas, L. Z. Wang, S. E. Webber, K. J. Williams and N. J. Curtin (2004). "Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361." *J Natl Cancer Inst* **96**(1): 56-67.
- Caldecott, K. W. (2003). "XRCC1 and DNA strand break repair." *DNA Repair (Amst)* **2**(9): 955-969.
- Caldecott, K. W., S. Aoufouchi, P. Johnson and S. Shall (1996). "XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro." *Nucleic Acids Res* **24**(22): 4387-4394.
- Canan Koch, S. S., L. H. Thoresen, J. G. Tikhe, K. A. Maegley, R. J. Almassy, J. Li, X. H. Yu, S. E. Zook, R. A. Kumpf, C. Zhang, T. J. Boritzki, R. N. Mansour, K. E. Zhang, A. Ekker, C. R. Calabrese, N. J. Curtin, S. Kyle, H. D. Thomas, L. Z. Wang, A. H. Calvert, B. T. Golding, R. J. Griffin, D. R. Newell, S. E. Webber and Z. Hostomsky (2002). "Novel tricyclic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: design, synthesis, and X-ray cocrystal structure." *J Med Chem* **45**(23): 4961-4974.
- Candi, E., R. Schmidt and G. Melino (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 328-340.
- Cardenas, C., R. A. Miller, I. Smith, T. Bui, J. Molgo, M. Muller, H. Vais, K. H. Cheung, J. Yang, I. Parker, C. B. Thompson, M. J. Birnbaum, K. R. Hallows and J. K. Foskett (2010). "Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria." *Cell* **142**(2): 270-283.

- Carling, D., V. A. Zammit and D. G. Hardie (1987). "A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis." FEBS Lett **223**(2): 217-222.
- Caro-Maldonado, A., S. W. Tait, S. Ramirez-Peinado, J. E. Ricci, I. Fabregat, D. R. Green and C. Munoz-Pinedo (2010). "Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells." Cell Death Differ **17**(8): 1335-1344.
- Castedo, M., J. L. Perfettini, T. Roumier, K. Andreau, R. Medema and G. Kroemer (2004). "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition." Oncogene **23**(16): 2825-2837.
- Cebollero, E., F. Reggiori and C. Kraft (2012). "Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories." Int J Cell Biol **2012**: 182834.
- Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." Anat Embryol (Berl) **181**(3): 195-213.
- Clohessy, J. G., M. Reschke and P. P. Pandolfi (2012). "Found in translation of mTOR signaling." Cell Res **22**(9): 1315-1318.
- Cook, B. D., J. N. Dynek, W. Chang, G. Shostak and S. Smith (2002). "Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres." Mol Cell Biol **22**(1): 332-342.
- Coppola, D., F. Khalil, S. A. Eschrich, D. Boulware, T. Yeatman and H. G. Wang (2008). "Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma." Cancer **113**(10): 2665-2670.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-656.
- Cory, S., D. C. Huang and J. M. Adams (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." Oncogene **22**(53): 8590-8607.
- Chambon, P., J. D. Weill and P. Mandel (1963). "Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme." Biochem Biophys Res Commun **11**: 39-43.
- Chang, P., M. Coughlin and T. J. Mitchison (2005). "Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function." Nat Cell Biol **7**(11): 1133-1139.
- Checinska, A. and M. S. Soengas (2011). "The gluttonous side of malignant melanoma: basic and clinical implications of macroautophagy." Pigment Cell Melanoma Res **24**(6): 1116-1132.
- Chen, S., S. K. Rehman, W. Zhang, A. Wen, L. Yao and J. Zhang (2010). "Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance." Biochim Biophys Acta **1806**(2): 220-229.
- Chen, Y. and D. J. Klionsky (2011). "The regulation of autophagy - unanswered questions." J Cell Sci **124**(Pt 2): 161-170.
- Chi, N. W. and H. F. Lodish (2000). "Tankyrase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles." J Biol Chem **275**(49): 38437-38444.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, B. R. Lane and V. M. Dixit (1997). "Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death." Science **275**(5303): 1122-1126.

- Chittenden, T., E. A. Harrington, R. O'Connor, C. Flemington, R. J. Lutz, G. I. Evan and B. C. Guild (1995). "Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak." Nature **374**(6524): 733-736.
- Christofferson, D. E. and J. Yuan (2010). "Necroptosis as an alternative form of programmed cell death." Curr Opin Cell Biol **22**(2): 263-268.
- Chugani, D. C., L. H. Rome and N. L. Kedersha (1993). "Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex." J Cell Sci **106 (Pt 1)**: 23-29.
- D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva and G. G. Poirier (1999). "Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions." Biochem J **342 (Pt 2)**: 249-268.
- D'Amours, D., F. R. Sallmann, V. M. Dixit and G. G. Poirier (2001). "Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis." J Cell Sci **114**(Pt 20): 3771-3778.
- da Silva Xavier, G., I. Leclerc, I. P. Salt, B. Doiron, D. G. Hardie, A. Kahn and G. A. Rutter (2000). "Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4023-4028.
- Dantzer, F., J. C. Ame, V. Schreiber, J. Nakamura, J. Menissier-de Murcia and G. de Murcia (2006). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair." Methods Enzymol **409**: 493-510.
- Dantzer, F., M. Mark, D. Quenet, H. Scherthan, A. Huber, B. Liebe, L. Monaco, A. Chicheportiche, P. Sassone-Corsi, G. de Murcia and J. Menissier-de Murcia (2006). "Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(40): 14854-14859.
- Dantzer, F., H. P. Nasheuer, J. L. Vonesch, G. de Murcia and J. Menissier-de Murcia (1998). "Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication." Nucleic Acids Res **26**(8): 1891-1898.
- Davidovic, L., M. Vodenicharov, E. B. Affar and G. G. Poirier (2001). "Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism." Exp Cell Res **268**(1): 7-13.
- de Murcia, G., V. Schreiber, M. Molinete, B. Saulier, O. Poch, M. Masson, C. Niedergang and J. Menissier de Murcia (1994). "Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase." Mol Cell Biochem **138**(1-2): 15-24.
- de Murcia, J. M., C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F. J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon and G. de Murcia (1997). "Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7303-7307.
- Degenhardt, K., R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. Gelinas, Y. Fan, D. A. Nelson, S. Jin and E. White (2006). "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis." Cancer Cell **10**(1): 51-64.
- Degli-Esposti, M. A., W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A. Smith and R. G. Goodwin (1997). "The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain." Immunity **7**(6): 813-820.
- Degterev, A., J. Hitomi, M. Germscheid, I. L. Ch'en, O. Korkina, X. Teng, D. Abbott, G. D. Cuny, C. Yuan, G. Wagner, S. M. Hedrick, S. A. Gerber, A. Lugovskoy and J. Yuan (2008).

- "Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins." Nat Chem Biol **4**(5): 313-321.
- Degterev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz and J. Yuan (2005). "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury." Nat Chem Biol **1**(2): 112-119.
- Deretic, V. (2008). "Autophagosome and phagosome." Methods Mol Biol **445**: 1-10.
- Devalaraja-Narashimha, K. and B. J. Padanilam (2010). "PARP1 deficiency exacerbates diet-induced obesity in mice." J Endocrinol **205**(3): 243-252.
- Di Girolamo, M., N. Dani, A. Stilla and D. Corda (2005). "Physiological relevance of the endogenous mono(ADP-ribosyl)ation of cellular proteins." FEBS J **272**(18): 4565-4575.
- Diefenbach, J. and A. Burkle (2005). "Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism." Cell Mol Life Sci **62**(7-8): 721-730.
- Droit, A., J. M. Hunter, M. Rouleau, C. Ethier, A. Picard-Cloutier, D. Bourgeois and G. G. Poirier (2007). "PARPs database: a LIMS systems for protein-protein interaction data mining or laboratory information management system." BMC Bioinformatics **8**: 483.
- Dunai, Z., P. I. Bauer and R. Mihalik (2011). "Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects." Pathol Oncol Res **17**(4): 791-800.
- Dunlop, E. A., D. K. Hunt, H. A. Acosta-Jaquez, D. C. Fingar and A. R. Tee (2011). "ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding." Autophagy **7**(7): 737-747.
- Edwards, S. L., R. Brough, C. J. Lord, R. Natrajan, R. Vatcheva, D. A. Levine, J. Boyd, J. S. Reis-Filho and A. Ashworth (2008). "Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2." Nature **451**(7182): 1111-1115.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan and H. R. Horvitz (1991). "Mechanisms and functions of cell death." Annu Rev Cell Biol **7**: 663-698.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz and P. M. Henson (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." Nature **405**(6782): 85-90.
- Farmer, H., N. McCabe, C. J. Lord, A. N. Tutt, D. A. Johnson, T. B. Richardson, M. Santarosa, K. J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N. M. Martin, S. P. Jackson, G. C. Smith and A. Ashworth (2005). "Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy." Nature **434**(7035): 917-921.
- Faro, R., Y. Toyoda, J. D. McCully, P. Jagtap, E. Szabo, L. Virag, C. Bianchi, S. Levitsky, C. Szabo and F. W. Sellke (2002). "Myocardial protection by PJ34, a novel potent poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor." Ann Thorac Surg **73**(2): 575-581.
- Feng, Z., W. Hu, E. de Stanchina, A. K. Teresky, S. Jin, S. Lowe and A. J. Levine (2007). "The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways." Cancer Res **67**(7): 3043-3053.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1371-1387.
- Fischer, M. E., C. J. Kasales and D. B. Kelley (1994). "Gastrointestinal case of the day. Pancreatic abscess due to *Pneumocystis carinii*." AJR Am J Roentgenol **162**(6): 1450-1451.

- Formentini, L., A. Macchiarulo, G. Cipriani, E. Camaioni, E. Rapizzi, R. Pellicciari, F. Moroni and A. Chiarugi (2009). "Poly(ADP-ribose) catabolism triggers AMP-dependent mitochondrial energy failure." *J Biol Chem* **284**(26): 17668-17676.
- Frias, M. A., C. C. Thoreen, J. D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2006). "mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s." *Curr Biol* **16**(18): 1865-1870.
- Frosig, C., S. B. Jorgensen, D. G. Hardie, E. A. Richter and J. F. Wojtaszewski (2004). "5'-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance training in human skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**(3): E411-417.
- Galluzzi, L., N. Joza, E. Tasdemir, M. C. Maiuri, M. Hengartner, J. M. Abrams, N. Tavernarakis, J. Penninger, F. Madeo and G. Kroemer (2008). "No death without life: vital functions of apoptotic effectors." *Cell Death Differ* **15**(7): 1113-1123.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* **19**(1): 107-120.
- Ganley, I. G., H. Lam du, J. Wang, X. Ding, S. Chen and X. Jiang (2009). "ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy." *J Biol Chem* **284**(18): 12297-12305.
- Garcia-Martinez, J. M. and D. R. Alessi (2008). "mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)." *Biochem J* **416**(3): 375-385.
- Garrido, C. and G. Kroemer (2004). "Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins." *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 639-646.
- Geng, J. and D. J. Klionsky (2008). "The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series." *EMBO Rep* **9**(9): 859-864.
- Germain, M., E. B. Affar, D. D'Amours, V. M. Dixit, G. S. Salvesen and G. G. Poirier (1999). "Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7." *J Biol Chem* **274**(40): 28379-28384.
- Gibson, B. A. and W. L. Kraus (2012). "New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(7): 411-424.
- Gilmore, A. P. (2005). "Anoikis." *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1473-1477.
- Gogvadze, V., S. Orrenius and B. Zhivotovsky (2008). "Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?" *Trends Cell Biol* **18**(4): 165-173.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." *Trends Biochem Sci* **32**(1): 37-43.
- Gonzalez-Flores, R. A.-Q., Eva Siles, Laura López -, M. I. R.-L. Jiménez, Marién López-Rodríguez 1, Sara Pozo ,, D. M.-O. Diego Villar, Luis del Peso , Eurne Berra and F. Javier and O. 1 (2012). "Interaction between PARP-1 and HIF-2 α in the hypoxic response." *Oncogene in press*.
- Gozuacik, D. and A. Kimchi (2004). "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism." *Oncogene* **23**(16): 2891-2906.

- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-1312.
- Grossmann, J. (2002). "Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis"." Apoptosis **7**(3): 247-260.
- Gunji, A., A. Uemura, M. Tsutsumi, T. Nozaki, O. Kusuoka, K. Omura, H. Suzuki, H. Nakagama, T. Sugimura and M. Masutani (2006). "Parp-1 deficiency does not increase the frequency of tumors in the oral cavity and esophagus of ICR/129Sv mice by 4-nitroquinoline 1-oxide, a carcinogen producing bulky adducts." Cancer Lett **241**(1): 87-92.
- Gutierrez, M. G., D. B. Munafo, W. Beron and M. I. Colombo (2004). "Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells." J Cell Sci **117**(Pt 13): 2687-2697.
- Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk and R. J. Shaw (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." Mol Cell **30**(2): 214-226.
- Hailey, D. W., A. S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P. K. Kim and J. Lippincott-Schwartz (2010). "Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation." Cell **141**(4): 656-667.
- Haince, J. F., S. Kozlov, V. L. Dawson, T. M. Dawson, M. J. Hendzel, M. F. Lavin and G. G. Poirier (2007). "Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents." J Biol Chem **282**(22): 16441-16453.
- Haince, J. F., D. McDonald, A. Rodrigue, U. Dery, J. Y. Masson, M. J. Hendzel and G. G. Poirier (2008). "PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites." J Biol Chem **283**(2): 1197-1208.
- Hakem, R. (2008). "DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly." EMBO J **27**(4): 589-605.
- Hanada, M., S. Krajewski, S. Tanaka, D. Cazals-Hatem, B. A. Spengler, R. A. Ross, J. L. Biedler and J. C. Reed (1993). "Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells." Cancer Res **53**(20): 4978-4986.
- Hara, K., Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch and K. Yonezawa (2002). "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action." Cell **110**(2): 177-189.
- Hara, T., K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano and N. Mizushima (2006). "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice." Nature **441**(7095): 885-889.
- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 774-785.
- Hassa, P. O., S. S. Haenni, C. Buerki, N. I. Meier, W. S. Lane, H. Owen, M. Gersbach, R. Imhof and M. O. Hottiger (2005). "Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription." J Biol Chem **280**(49): 40450-40464.
- Hassa, P. O. and M. O. Hottiger (2002). "The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders." Cell Mol Life Sci **59**(9): 1534-1553.

- Hassa, P. O. and M. O. Hottiger (2008). "The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases." Front Biosci **13**: 3046-3082.
- Hawley, S. A., J. Boudeau, J. L. Reid, K. J. Mustard, L. Udd, T. P. Makela, D. R. Alessi and D. G. Hardie (2003). "Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade." J Biol **2**(4): 28.
- Hawley, S. A., M. Davison, A. Woods, S. P. Davies, R. K. Beri, D. Carling and D. G. Hardie (1996). "Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **271**(44): 27879-27887.
- Hawley, S. A., D. A. Pan, K. J. Mustard, L. Ross, J. Bain, A. M. Edelman, B. G. Frenguelli and D. G. Hardie (2005). "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase." Cell Metab **2**(1): 9-19.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.
- Hayakawa, Y., V. Screpanti, H. Yagita, A. Grandien, H. G. Ljunggren, M. J. Smyth and B. J. Chambers (2004). "NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy." J Immunol **172**(1): 123-129.
- Hengartner, M. O. (1996). "Programmed cell death in invertebrates." Curr Opin Genet Dev **6**(1): 34-38.
- Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz (1994). "The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **345**(1313): 243-246.
- Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz (1994). "Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*." Curr Opin Genet Dev **4**(4): 581-586.
- Herceg, Z. and Z. Q. Wang (2001). "Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death." Mutat Res **477**(1-2): 97-110.
- Herrero-Martin, G., M. Hoyer-Hansen, C. Garcia-Garcia, C. Fumarola, T. Farkas, A. Lopez-Rivas and M. Jaattela (2009). "TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells." EMBO J **28**(6): 677-685.
- Hojlund, K., K. J. Mustard, P. Staehr, D. G. Hardie, H. Beck-Nielsen, E. A. Richter and J. F. Wojtaszewski (2004). "AMPK activity and isoform protein expression are similar in muscle of obese subjects with and without type 2 diabetes." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(2): E239-244.
- Hojlund, K., P. Staehr, B. F. Hansen, K. A. Green, D. G. Hardie, E. A. Richter, H. Beck-Nielsen and J. F. Wojtaszewski (2003). "Increased phosphorylation of skeletal muscle glycogen synthase at NH2-terminal sites during physiological hyperinsulinemia in type 2 diabetes." Diabetes **52**(6): 1393-1402.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed and J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol **1**(6): 489-495.
- Hoyer-Hansen, M. and M. Jaattela (2007). "AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy?" Autophagy **3**(4): 381-383.

- Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan and D. V. Goeddel (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.
- Hsu, S. Y., A. Kaipia, E. McGee, M. Lomeli and A. J. Hsueh (1997). "Bcl-2 is a proapoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12401-12406.
- Hudson, E. R., D. A. Pan, J. James, J. M. Lucocq, S. A. Hawley, K. A. Green, O. Baba, T. Terashima and D. G. Hardie (2003). "A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias." Curr Biol **13**(10): 861-866.
- Huletsky, A., G. de Murcia, S. Muller, M. Hengartner, L. Menard, D. Lamarre and G. G. Poirier (1989). "The effect of poly(ADP-ribosylation) on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosylation) on core nucleosome structure." J Biol Chem **264**(15): 8878-8886.
- Hurley, R. L., K. A. Anderson, J. M. Franzone, B. E. Kemp, A. R. Means and L. A. Witters (2005). "The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases." J Biol Chem **280**(32): 29060-29066.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nat Rev Cancer **2**(4): 277-288.
- Imamura, K., T. Ogura, A. Kishimoto, M. Kaminishi and H. Esumi (2001). "Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line." Biochem Biophys Res Commun **287**(2): 562-567.
- Inoki, K., Y. Li, T. Xu and K. L. Guan (2003). "Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling." Genes Dev **17**(15): 1829-1834.
- Inoki, K., Y. Li, T. Zhu, J. Wu and K. L. Guan (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." Nat Cell Biol **4**(9): 648-657.
- Inoki, K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada, K. Stankunas, C. Y. Wang, X. He, O. A. MacDougald, M. You, B. O. Williams and K. L. Guan (2006). "TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth." Cell **126**(5): 955-968.
- Inoki, K., T. Zhu and K. L. Guan (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." Cell **115**(5): 577-590.
- Inoue, Y. and D. J. Klionsky (2010). "Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." Semin Cell Dev Biol **21**(7): 664-670.
- Iqbal, J., C. Kucuk, R. J. Deleeuw, G. Srivastava, W. Tam, H. Geng, D. Klinkebiel, J. K. Christman, K. Patel, K. Cao, L. Shen, K. Dybkaer, I. F. Tsui, H. Ali, N. Shimizu, W. Y. Au, W. L. Lam and W. C. Chan (2009). "Genomic analyses reveal global functional alterations that promote tumor growth and novel tumor suppressor genes in natural killer-cell malignancies." Leukemia **23**(6): 1139-1151.
- Itakura, E. and N. Mizushima (2010). "Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins." Autophagy **6**(6): 764-776.
- Ivana Scovassi, A. and M. Diederich (2004). "Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells." Biochem Pharmacol **68**(6): 1041-1047.

- Iwata, J., J. Ezaki, M. Komatsu, S. Yokota, T. Ueno, I. Tanida, T. Chiba, K. Tanaka and E. Kominami (2006). "Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals." J Biol Chem **281**(7): 4035-4041.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin and B. Su (2006). "SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity." Cell **127**(1): 125-137.
- Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall and M. N. Hall (2004). "Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive." Nat Cell Biol **6**(11): 1122-1128.
- Jagtap, P. and C. Szabo (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors." Nat Rev Drug Discov **4**(5): 421-440.
- Jahreiss, L., F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein (2008). "The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes." Traffic **9**(4): 574-587.
- James, C., S. Gschmeissner, A. Fraser and G. I. Evan (1997). "CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9." Curr Biol **7**(4): 246-252.
- Jha, R., A. Agarwal, R. Mahfouz, U. Paasch, S. Grunewald, E. Sabanegh, S. P. Yadav and R. Sharma (2009). "Determination of Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) homologues in human ejaculated sperm and its correlation with sperm maturation." Fertil Steril **91**(3): 782-790.
- Jin, S. and E. White (2007). "Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress." Autophagy **3**(1): 28-31.
- Jung, C. H., C. B. Jun, S. H. Ro, Y. M. Kim, N. M. Otto, J. Cao, M. Kundu and D. H. Kim (2009). "ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery." Mol Biol Cell **20**(7): 1992-2003.
- Kaczmarek, A., P. Vandenabeele and D. V. Krysko (2013). "Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance." Immunity **38**(2): 209-223.
- Kahn, B. B., T. Alquier, D. Carling and D. G. Hardie (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." Cell Metab **1**(1): 15-25.
- Kaizuka, T., T. Hara, N. Oshiro, U. Kikkawa, K. Yonezawa, K. Takehana, S. Iemura, T. Natsume and N. Mizushima (2010). "Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly." J Biol Chem **285**(26): 20109-20116.
- Kalisch, T., J. C. Ame, F. Dantzer and V. Schreiber (2012). "New readers and interpretations of poly(ADP-ribosylation)." Trends Biochem Sci **37**(9): 381-390.
- Kaminker, P. G., S. H. Kim, R. D. Taylor, Y. Zebarjadian, W. D. Funk, G. B. Morin, P. Yaswen and J. Campisi (2001). "TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression." J Biol Chem **276**(38): 35891-35899.
- Kanai, M., K. Hanashiro, S. H. Kim, S. Hanai, A. H. Boulares, M. Miwa and K. Fukasawa (2007). "Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation)." Nat Cell Biol **9**(10): 1175-1183.
- Kanai, M., M. Uchida, S. Hanai, N. Uematsu, K. Uchida and M. Miwa (2000). "Poly(ADP-ribose) polymerase localizes to the centrosomes and chromosomes." Biochem Biophys Res Commun **278**(2): 385-389.

- Kanai, Y., S. Tanuma and T. Sugimura (1981). "Immunofluorescent staining of poly(ADP-ribose) in situ in HeLa cell chromosomes in the M phase." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(5): 2801-2804.
- Kanayama, A., R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng and Z. J. Chen (2004). "TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains." Mol Cell **15**(4): 535-548.
- Karantza-Wadsworth, V., S. Patel, O. Kravchuk, G. Chen, R. Mathew, S. Jin and E. White (2007). "Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis." Genes Dev **21**(13): 1621-1635.
- Karlberg, T., M. F. Langelier, J. M. Pascal and H. Schuler (2013). "Structural biology of the writers, readers, and erasers in mono- and poly(ADP-ribose) mediated signaling." Mol Aspects Med.
- Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson and G. G. Poirier (1993). "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." Cancer Res **53**(17): 3976-3985.
- Kawaichi, M., K. Ueda and O. Hayaishi (1981). "Multiple autopoly(ADP-ribosyl)ation of rat liver poly(ADP-ribose) synthetase. Mode of modification and properties of automodified synthetase." J Biol Chem **256**(18): 9483-9489.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kickhoefer, V. A., A. C. Siva, N. L. Kedersha, E. M. Inman, C. Ruland, M. Streuli and L. H. Rome (1999). "The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase." J Cell Biol **146**(5): 917-928.
- Kiehlbauch, C. C., N. Aboul-Ela, E. L. Jacobson, D. P. Ringer and M. K. Jacobson (1993). "High resolution fractionation and characterization of ADP-ribose polymers." Anal Biochem **208**(1): 26-34.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." Cell **110**(2): 163-175.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, R. R. Latek, K. V. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2003). "GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR." Mol Cell **11**(4): 895-904.
- Kim, J. and D. J. Klionsky (2000). "Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells." Annu Rev Biochem **69**: 303-342.
- Kim, J., M. Kundu, B. Viollet and K. L. Guan (2011). "AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1." Nat Cell Biol **13**(2): 132-141.
- Kim, J. W., K. Kim, K. Kang and C. O. Joe (2000). "Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis." J Biol Chem **275**(11): 8121-8125.
- Kim, M. Y., S. Mauro, N. Gevry, J. T. Lis and W. L. Kraus (2004). "NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1." Cell **119**(6): 803-814.
- Kim, M. Y., T. Zhang and W. L. Kraus (2005). "Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal." Genes Dev **19**(17): 1951-1967.

- Kimberley, F. C. and G. R. Screaton (2004). "Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors." *Cell Res* **14**(5): 359-372.
- Kimura, N., C. Tokunaga, S. Dalal, C. Richardson, K. Yoshino, K. Hara, B. E. Kemp, L. A. Witters, O. Mimura and K. Yonezawa (2003). "A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway." *Genes Cells* **8**(1): 65-79.
- Kleine, H., A. Herrmann, T. Lamark, A. H. Forst, P. Verheugd, J. Luscher-Firzlaff, B. Lippok, K. L. Feijs, N. Herzog, E. Kremmer, T. Johansen, G. Muller-Newen and B. Luscher (2012). "Dynamic subcellular localization of the mono-ADP-ribosyltransferase ARTD10 and interaction with the ubiquitin receptor p62." *Cell Commun Signal* **10**(1): 28.
- Klionsky, D. J. (2007). "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(11): 931-937.
- Klionsky, D. J. (2010). "The autophagy connection." *Dev Cell* **19**(1): 11-12.
- Klionsky, D. J., H. Abeliovich, P. Agostinis, D. K. Agrawal, G. Aliev, D. S. Askew, M. Baba, E. H. Baehrecke, B. A. Bahr, A. Ballabio, B. A. Bamber, D. C. Bassham, E. Bergamini, X. Bi, M. Biard-Piechaczyk, J. S. Blum, D. E. Bredesen, J. L. Brodsky, J. H. Brumell, U. T. Brunk, W. Bursch, N. Camougrand, E. Cebollero, F. Cecconi, Y. Chen, L. S. Chin, A. Choi, C. T. Chu, J. Chung, P. G. Clarke, R. S. Clark, S. G. Clarke, C. Clave, J. L. Cleveland, P. Codogno, M. I. Colombo, A. Coto-Montes, J. M. Cregg, A. M. Cuervo, J. Debnath, F. Demarchi, P. B. Dennis, P. A. Dennis, V. Deretic, R. J. Devenish, F. Di Sano, J. F. Dice, M. Difiglia, S. Dinesh-Kumar, C. W. Distelhorst, M. Djavaheri-Mergny, F. C. Dorsey, W. Droge, M. Dron, W. A. Dunn, Jr., M. Duszenko, N. T. Eissa, Z. Elazar, A. Esclatine, E. L. Eskelinen, L. Fesus, K. D. Finley, J. M. Fuentes, J. Fueyo, K. Fujisaki, B. Galliot, F. B. Gao, D. A. Gewirtz, S. B. Gibson, A. Gohla, A. L. Goldberg, R. Gonzalez, C. Gonzalez-Estevez, S. Gorski, R. A. Gottlieb, D. Haussinger, Y. W. He, K. Heidenreich, J. A. Hill, M. Hoyer-Hansen, X. Hu, W. P. Huang, A. Iwasaki, M. Jaattela, W. T. Jackson, X. Jiang, S. Jin, T. Johansen, J. U. Jung, M. Kadowaki, C. Kang, A. Kelekar, D. H. Kessel, J. A. Kiel, H. P. Kim, A. Kimchi, T. J. Kinsella, K. Kiselyov, K. Kitamoto, E. Knecht, M. Komatsu, E. Kominami, S. Kondo, A. L. Kovacs, G. Kroemer, C. Y. Kuan, R. Kumar, M. Kundu, J. Landry, M. Laporte, W. Le, H. Y. Lei, M. J. Lenardo, B. Levine, A. Lieberman, K. L. Lim, F. C. Lin, W. Liou, L. F. Liu, G. Lopez-Berestein, C. Lopez-Otin, B. Lu, K. F. Macleod, W. Malorni, W. Martinet, K. Matsuoka, J. Mautner, A. J. Meijer, A. Melendez, P. Michels, G. Miotto, W. P. Mistiaen, N. Mizushima, B. Mograbi, I. Monastyrska, M. N. Moore, P. I. Moreira, Y. Moriyasu, T. Motyl, C. Munz, L. O. Murphy, N. I. Naqvi, T. P. Neufeld, I. Nishino, R. A. Nixon, T. Noda, B. Nurnberg, M. Ogawa, N. L. Oleinick, L. J. Olsen, B. Ozpolat, S. Paglin, G. E. Palmer, I. Papassideri, M. Parkes, D. H. Perlmutter, G. Perry, M. Piacentini, R. Pinkas-Kramarski, M. Prescott, T. Proikas-Cezanne, N. Raben, A. Rami, F. Reggiori, B. Rohrer, D. C. Rubinsztein, K. M. Ryan, J. Sadoshima, H. Sakagami, Y. Sakai, M. Sandri, C. Sasakawa, M. Sass, C. Schneider, P. O. Seglen, O. Seleverstov, J. Settleman, J. J. Shacka, I. M. Shapiro, A. Sibirny, E. C. Silva-Zacarin, H. U. Simon, C. Simone, A. Simonsen, M. A. Smith, K. Spanel-Borowski, V. Srinivas, M. Steeves, H. Stenmark, P. E. Stromhaug, C. S. Subauste, S. Sugimoto, D. Sulzer, T. Suzuki, M. S. Swanson, I. Tabas, F. Takeshita, N. J. Talbot, Z. Talloczy, K. Tanaka, K. Tanaka, I. Tanida, G. S. Taylor, J. P. Taylor, A. Terman, G. Tettamanti, C. B. Thompson, M. Thumm, A. M. Tolkovsky, S. A. Tooze, R. Truant, L. V. Tumanovska, Y. Uchiyama, T. Ueno, N. L. Uzcategui, I. van der Klei, E. C. Vaquero, T. Vellai, M. W. Vogel, H. G. Wang, P. Webster, J. W. Wiley, Z. Xi, G. Xiao, J. Yahalom, J. M. Yang, G. Yap, X. M. Yin, T. Yoshimori, L. Yu, Z. Yue, M. Yuzaki, O. Zabinnyk, X. Zheng, X.

- Zhu and R. L. Deter (2008). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes." Autophagy **4**(2): 151-175.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science **290**(5497): 1717-1721.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." Nature **441**(7095): 880-884.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Ueno, J. Iwata, S. Murata, I. Tanida, J. Ezaki, N. Mizushima, Y. Ohsumi, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka and T. Chiba (2005). "Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice." J Cell Biol **169**(3): 425-434.
- Kondo, Y., T. Kanzawa, R. Sawaya and S. Kondo (2005). "The role of autophagy in cancer development and response to therapy." Nat Rev Cancer **5**(9): 726-734.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh and P. H. Schlesinger (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." Cell Death Differ **7**(12): 1166-1173.
- Kourtis, N. and N. Tavernarakis (2009). "Autophagy and cell death in model organisms." Cell Death Differ **16**(1): 21-30.
- Kraus, W. L. and J. T. Lis (2003). "PARP goes transcription." Cell **113**(6): 677-683.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, G. Melino and D. Nomenclature Committee on Cell (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1463-1467.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino and D. Nomenclature Committee on Cell (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- Kroemer, G. and B. Levine (2008). "Autophagic cell death: the story of a misnomer." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(12): 1004-1010.
- Kroemer, G., G. Marino and B. Levine (2010). "Autophagy and the integrated stress response." Mol Cell **40**(2): 280-293.
- Kryston, T. B., A. B. Georgiev, P. Pissis and A. G. Georgakilas (2011). "Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis." Mutat Res **711**(1-2): 193-201.
- Kuma, A., M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhiya and N. Mizushima (2004). "The role of autophagy during the early neonatal starvation period." Nature **432**(7020): 1032-1036.
- Kunz, J., R. Henriquez, U. Schneider, M. Deuter-Reinhard, N. R. Movva and M. N. Hall (1993). "Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression." Cell **73**(3): 585-596.
- Kuranaga, E. and M. Miura (2007). "Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination." Trends Cell Biol **17**(3): 135-144.
- Labbe, K. and M. Saleh (2008). "Cell death in the host response to infection." Cell Death Differ **15**(9): 1339-1349.

- Lamarre, D., B. Talbot, G. de Murcia, C. Laplante, Y. Leduc, A. Mazen and G. G. Poirier (1988). "Structural and functional analysis of poly(ADP ribose) polymerase: an immunological study." Biochim Biophys Acta **950**(2): 147-160.
- Lamparska-Przybysz, M., B. Gajkowska and T. Motyl (2006). "BID-deficient breast cancer MCF-7 cells as a model for the study of autophagy in cancer therapy." Autophagy **2**(1): 47-48.
- Langelier, M. F. and J. M. Pascal (2013). "PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis." Curr Opin Struct Biol **23**(1): 134-143.
- Langelier, M. F., J. L. Planck, S. Roy and J. M. Pascal (2011). "Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity." J Biol Chem **286**(12): 10690-10701.
- Langelier, M. F., J. L. Planck, S. Roy and J. M. Pascal (2012). "Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1." Science **336**(6082): 728-732.
- Langelier, M. F., J. L. Planck, K. M. Servent and J. M. Pascal (2011). "Purification of human PARP-1 and PARP-1 domains from Escherichia coli for structural and biochemical analysis." Methods Mol Biol **780**: 209-226.
- Langelier, M. F., K. M. Servent, E. E. Rogers and J. M. Pascal (2008). "A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation." J Biol Chem **283**(7): 4105-4114.
- LaPlaca, M. C., R. Raghupathi, A. Verma, A. A. Pieper, K. E. Saatman, S. H. Snyder and T. K. McIntosh (1999). "Temporal patterns of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the cortex following experimental brain injury in the rat." J Neurochem **73**(1): 205-213.
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.
- Lautier, D., J. Lagueux, J. Thibodeau, L. Menard and G. G. Poirier (1993). "Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism." Mol Cell Biochem **122**(2): 171-193.
- Lavrik, I., A. Krueger, I. Schmitz, S. Baumann, H. Weyd, P. H. Krammer and S. Kirchhoff (2003). "The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC." Cell Death Differ **10**(1): 144-145.
- Lavrik, I. N., A. Golks and P. H. Krammer (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death." J Clin Invest **115**(10): 2665-2672.
- Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier and W. C. Earnshaw (1994). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE." Nature **371**(6495): 346-347.
- Le Bot, N. (2007). "Entosis: cell death by invasion." Nat Cell Biol **9**(12): 1346.
- Le May, N., I. Iltis, J. C. Ame, A. Zhovmer, D. Biard, J. M. Egly, V. Schreiber and F. Coin (2012). "Poly (ADP-ribose) glycohydrolase regulates retinoic acid receptor-mediated gene expression." Mol Cell **48**(5): 785-798.
- Le Page, C., J. Sanceau, J. C. Drapier and J. Wietzerbin (1998). "Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation." Biochem Biophys Res Commun **243**(2): 451-457.
- LeBel, C. P., H. Ischiropoulos and S. C. Bondy (1992). "Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress." Chem Res Toxicol **5**(2): 227-231.

- Leduc, Y., J. J. Lawrence, G. De Murcia and G. G. Poirier (1988). "Cell cycle regulation of poly(ADP-ribose) synthetase in FR3T3 cells." Biochim Biophys Acta **968**(3): 275-282.
- Legakis, J. E., W. L. Yen and D. J. Klionsky (2007). "A cycling protein complex required for selective autophagy." Autophagy **3**(5): 422-432.
- Legembre, P., B. C. Barnhart and M. E. Peter (2004). "The relevance of NF-kappaB for CD95 signaling in tumor cells." Cell Cycle **3**(10): 1235-1239.
- Legler, D. F., O. Micheau, M. A. Doucey, J. Tschopp and C. Bron (2003). "Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation." Immunity **18**(5): 655-664.
- Lemasters, J. J., T. Qian, L. He, J. S. Kim, S. P. Elmore, W. E. Cascio and D. A. Brenner (2002). "Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy." Antioxid Redox Signal **4**(5): 769-781.
- Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." Dev Cell **6**(4): 463-477.
- Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." Cell **132**(1): 27-42.
- Levine, B. and J. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" J Clin Invest **115**(10): 2679-2688.
- Li, J. and J. Yuan (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." Oncogene **27**(48): 6194-6206.
- Liang, X. H., S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh and B. Levine (1999). "Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1." Nature **402**(6762): 672-676.
- Lindahl, T., M. S. Satoh, G. G. Poirier and A. Klungland (1995). "Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks." Trends Biochem Sci **20**(10): 405-411.
- Lipinski, M. M., G. Hoffman, A. Ng, W. Zhou, B. F. Py, E. Hsu, X. Liu, J. Eisenberg, J. Liu, J. Blenis, R. J. Xavier and J. Yuan (2010). "A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions." Dev Cell **18**(6): 1041-1052.
- Lippens, S., G. Denecker, P. Ovaere, P. Vandenabeele and W. Declercq (2005). "Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1497-1508.
- Liu, Y., B. E. Snow, V. A. Kickhoefer, N. Erdmann, W. Zhou, A. Wakeham, M. Gomez, L. H. Rome and L. Harrington (2004). "Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo." Mol Cell Biol **24**(12): 5314-5323.
- Loffler, A. S., S. Alers, A. M. Dieterle, H. Keppeler, M. Franz-Wachtel, M. Kundu, D. G. Campbell, S. Wesselborg, D. R. Alessi and B. Stork (2011). "Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop." Autophagy **7**(7): 696-706.
- Longatti, A., A. Orsi and S. A. Tooze (2010). "Autophagosome formation: not necessarily an inside job." Cell Res **20**(11): 1181-1184.
- Lonkar, P. and P. C. Dedon (2011). "Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates." Int J Cancer **128**(9): 1999-2009.

- Lonn, P., L. P. van der Heide, M. Dahl, U. Hellman, C. H. Heldin and A. Moustakas (2010). "PARP-1 attenuates Smad-mediated transcription." *Mol Cell* **40**(4): 521-532.
- Lord, C. J. and A. Ashworth (2008). "Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors." *Curr Opin Pharmacol* **8**(4): 363-369.
- Los, M., M. Mozoluk, D. Ferrari, A. Stepczynska, C. Stroh, A. Renz, Z. Herceg, Z. Q. Wang and K. Schulze-Osthoff (2002). "Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling." *Mol Biol Cell* **13**(3): 978-988.
- Lum, J. J., R. J. DeBerardinis and C. B. Thompson (2005). "Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(6): 439-448.
- Ma, X. and K. Cline (2010). "Multiple precursor proteins bind individual Tat receptor complexes and are collectively transported." *EMBO J* **29**(9): 1477-1488.
- Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 307-318.
- Mahfouz, R. Z., R. K. Sharma, K. Poenicke, R. Jha, U. Paasch, S. Grunewald and A. Agarwal (2009). "Evaluation of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage (cPARP) in ejaculated human sperm fractions after induction of apoptosis." *Fertil Steril* **91**(5 Suppl): 2210-2220.
- Mamane, Y., E. Petroulakis, O. LeBacquer and N. Sonenberg (2006). "mTOR, translation initiation and cancer." *Oncogene* **25**(48): 6416-6422.
- Manning, B. D., A. R. Tee, M. N. Logsdon, J. Blenis and L. C. Cantley (2002). "Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway." *Mol Cell* **10**(1): 151-162.
- Mao, K. and D. J. Klionsky (2011). "AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1." *Circ Res* **108**(7): 787-788.
- Marino, G., N. Salvador-Montoliu, A. Fueyo, E. Knecht, N. Mizushima and C. Lopez-Otin (2007). "Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3." *J Biol Chem* **282**(25): 18573-18583.
- Martin-Oliva, D., R. Aguilar-Quesada, F. O'Valle, J. A. Munoz-Gamez, R. Martinez-Romero, R. Garcia Del Moral, J. M. Ruiz de Almodovar, R. Villuendas, M. A. Piris and F. J. Oliver (2006). "Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis." *Cancer Res* **66**(11): 5744-5756.
- Martin, K. A. and J. Blenis (2002). "Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways." *Adv Cancer Res* **86**: 1-39.
- Martinon, F., O. Gaide, V. Petrilli, A. Mayor and J. Tschopp (2007). "NALP inflammasomes: a central role in innate immunity." *Semin Immunopathol* **29**(3): 213-229.
- Masson, M., C. Niedergang, V. Schreiber, S. Muller, J. Menissier-de Murcia and G. de Murcia (1998). "XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage." *Mol Cell Biol* **18**(6): 3563-3571.
- Masutani, M., H. Nakagama and T. Sugimura (2005). "Poly(ADP-ribosyl)ation in relation to cancer and autoimmune disease." *Cell Mol Life Sci* **62**(7-8): 769-783.
- Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth and E. White (2007). "Role of autophagy in cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(12): 961-967.

- Mathew, R., C. M. Karp, B. Beaudoin, N. Vuong, G. Chen, H. Y. Chen, K. Bray, A. Reddy, G. Bhanot, C. Gelinas, R. S. Dipaola, V. Karantza-Wadsworth and E. White (2009). "Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62." Cell **137**(6): 1062-1075.
- Matsunaga, K., T. Saitoh, K. Tabata, H. Omori, T. Satoh, N. Kurotori, I. Maejima, K. Shirahama-Noda, T. Ichimura, T. Isobe, S. Akira, T. Noda and T. Yoshimori (2009). "Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages." Nat Cell Biol **11**(4): 385-396.
- McCabe, N., M. A. Cerone, T. Ohishi, H. Seimiya, C. J. Lord and A. Ashworth (2009). "Targeting Tankyrase 1 as a therapeutic strategy for BRCA-associated cancer." Oncogene **28**(11): 1465-1470.
- McCabe, N., N. C. Turner, C. J. Lord, K. Kluzek, A. Bialkowska, S. Swift, S. Giavara, M. J. O'Connor, A. N. Tutt, M. Z. Zdzienicka, G. C. Smith and A. Ashworth (2006). "Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition." Cancer Res **66**(16): 8109-8115.
- Medema, J. P., C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer and M. E. Peter (1997). "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." EMBO J **16**(10): 2794-2804.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2004). "Regulation and role of autophagy in mammalian cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2445-2462.
- Melino, G. (2001). "The Sirens' song." Nature **412**(6842): 23.
- Melino, G., F. Bernassola, R. A. Knight, M. T. Corasaniti, G. Nistico and A. Finazzi-Agro (1997). "S-nitrosylation regulates apoptosis." Nature **388**(6641): 432-433.
- Melino, G., E. Candi and P. M. Steinert (2000). "Assays for transglutaminases in cell death." Methods Enzymol **322**: 433-472.
- Mendes-Pereira, A. M., S. A. Martin, R. Brough, A. McCarthy, J. R. Taylor, J. S. Kim, T. Waldman, C. J. Lord and A. Ashworth (2009). "Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors." EMBO Mol Med **1**(6-7): 315-322.
- Meyer-Ficca, M. L., R. G. Meyer, D. L. Coyle, E. L. Jacobson and M. K. Jacobson (2004). "Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments." Exp Cell Res **297**(2): 521-532.
- Mihaylova, M. M. and R. J. Shaw (2011). "The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism." Nat Cell Biol **13**(9): 1016-1023.
- Milam, K. M. and J. E. Cleaver (1984). "Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes." Science **223**(4636): 589-591.
- Mizushima, N. (2004). "Methods for monitoring autophagy." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2491-2502.
- Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." Genes Dev **21**(22): 2861-2873.
- Mizushima, N. (2010). "The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation." Curr Opin Cell Biol **22**(2): 132-139.
- Mizushima, N. and D. J. Klionsky (2007). "Protein turnover via autophagy: implications for metabolism." Annu Rev Nutr **27**: 19-40.
- Molnar, A., A. Toth, Z. Bagi, Z. Papp, I. Edes, M. Vaszily, Z. Galajda, J. G. Papp, A. Varro, V. Szuts, Z. Lacza, D. Gero and C. Szabo (2006). "Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure." Mol Med **12**(7-8): 143-152.

- Mormone, E., P. Matarrese, A. Tinari, M. Cannella, V. Maglione, M. G. Farrace, M. Piacentini, L. Frati, W. Malorni and F. Squitieri (2006). "Genotype-dependent priming to self- and xeno-cannibalism in heterozygous and homozygous lymphoblasts from patients with Huntington's disease." J Neurochem **98**(4): 1090-1099.
- Mortimore, G. E., G. Miotto, R. Venerando and M. Kadowaki (1996). "Autophagy." Subcell Biochem **27**: 93-135.
- Munoz-Gamez, J. A., J. M. Rodriguez-Vargas, R. Quiles-Perez, R. Aguilar-Quesada, D. Martin-Oliva, G. de Murcia, J. Menissier de Murcia, A. Almendros, M. Ruiz de Almodovar and F. J. Oliver (2009). "PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage." Autophagy **5**(1): 61-74.
- Nakada, D., T. L. Saunders and S. J. Morrison (2010). "Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells." Nature **468**(7324): 653-658.
- Nakagawa, I., A. Amano, N. Mizushima, A. Yamamoto, H. Yamaguchi, T. Kamimoto, A. Nara, J. Funao, M. Nakata, K. Tsuda, S. Hamada and T. Yoshimori (2004). "Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus." Science **306**(5698): 1037-1040.
- Nakatogawa, H., K. Suzuki, Y. Kamada and Y. Ohsumi (2009). "Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(7): 458-467.
- Narendra, D., A. Tanaka, D. F. Suen and R. J. Youle (2008). "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy." J Cell Biol **183**(5): 795-803.
- Nasta, F., F. Laudisi, M. Sambucci, M. M. Rosado and C. Pioli (2010). "Increased Foxp3+ regulatory T cells in poly(ADP-Ribose) polymerase-1 deficiency." J Immunol **184**(7): 3470-3477.
- Nguewa, P. A., M. A. Fuertes, B. Valladares, C. Alonso and J. M. Perez (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications." Prog Biophys Mol Biol **88**(1): 143-172.
- Nicolas, L., C. Martinez, C. Baro, M. Rodriguez, A. Baroja-Mazo, F. Sole, J. M. Flores, C. Ampurdanes, F. Dantzer, J. Martin-Caballero, P. Aparicio and J. Yelamos (2010). "Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-2 leads to rapid development of spontaneous T-cell lymphomas in p53-deficient mice." Oncogene **29**(19): 2877-2883.
- Nicotera, P., F. Bernassola and G. Melino (1999). "Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul." Cell Death Differ **6**(10): 931-933.
- Nicotera, P. and G. Melino (2004). "Regulation of the apoptosis-necrosis switch." Oncogene **23**(16): 2757-2765.
- Nielsen, J. N., K. J. Mustard, D. A. Graham, H. Yu, C. S. MacDonald, H. Pilegaard, L. J. Goodyear, D. G. Hardie, E. A. Richter and J. F. Wojtaszewski (2003). "5'-AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle." J Appl Physiol **94**(2): 631-641.
- Niere, M., M. Mashimo, L. Agledal, C. Dolle, A. Kasamatsu, J. Kato, J. Moss and M. Ziegler (2012). "ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose)." J Biol Chem **287**(20): 16088-16102.
- Oei, S. L., J. Griesenbeck and M. Schweiger (1997). "The role of poly(ADP-ribosylation)." Rev Physiol Biochem Pharmacol **131**: 127-173.
- Oei, S. L., J. Griesenbeck, M. Schweiger, V. Babich, A. Kropotov and N. Tomilin (1997). "Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase." Biochem Biophys Res Commun **240**(1): 108-111.

- Oei, S. L. and Y. Shi (2001). "Transcription factor Yin Yang 1 stimulates poly(ADP-ribose)ylation and DNA repair." Biochem Biophys Res Commun **284**(2): 450-454.
- Oka, S., J. Kato and J. Moss (2006). "Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase." J Biol Chem **281**(2): 705-713.
- Okada, H. and T. W. Mak (2004). "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells." Nat Rev Cancer **4**(8): 592-603.
- Okano, S., L. Lan, K. W. Caldecott, T. Mori and A. Yasui (2003). "Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells." Mol Cell Biol **23**(11): 3974-3981.
- Oliver, A. W., J. C. Ame, S. M. Roe, V. Good, G. de Murcia and L. H. Pearl (2004). "Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2." Nucleic Acids Res **32**(2): 456-464.
- Oliver, F. J., G. de la Rubia, V. Rolli, M. C. Ruiz-Ruiz, G. de Murcia and J. M. Murcia (1998). "Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant." J Biol Chem **273**(50): 33533-33539.
- Oliver, F. J., J. Menissier-de Murcia, C. Nacci, P. Decker, R. Andriantsitohaina, S. Muller, G. de la Rubia, J. C. Stoclet and G. de Murcia (1999). "Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice." EMBO J **18**(16): 4446-4454.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky and P. Nicotera (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 552-565.
- Overholtzer, M., A. A. Mailleux, G. Mouneimne, G. Normand, S. J. Schnitt, R. W. King, E. S. Cibas and J. S. Brugge (2007). "A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion." Cell **131**(5): 966-979.
- Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.
- Pacher, P., L. Liaudet, F. G. Soriano, J. G. Mabley, E. Szabo and C. Szabo (2002). "The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes." Diabetes **51**(2): 514-521.
- Pacher, P. and C. Szabo (2006). "Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes." Curr Opin Pharmacol **6**(2): 136-141.
- Peralta-Leal, A., J. M. Rodriguez-Vargas, R. Aguilar-Quesada, M. I. Rodriguez, J. L. Linares, M. R. de Almodovar and F. J. Oliver (2009). "PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases." Free Radic Biol Med **47**(1): 13-26.
- Peterson, T. R., M. Laplante, C. C. Thoreen, Y. Sancak, S. A. Kang, W. M. Kuehl, N. S. Gray and D. M. Sabatini (2009). "DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival." Cell **137**(5): 873-886.
- Phulwani, N. K. and T. Kielian (2008). "Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) 1-3 regulate astrocyte activation." J Neurochem **106**(2): 578-590.
- Pleschke, J. M., H. E. Kleczkowska, M. Strohm and F. R. Althaus (2000). "Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins." J Biol Chem **275**(52): 40974-40980.
- Plo, I., Z. Y. Liao, J. M. Barcelo, G. Kohlhagen, K. W. Caldecott, M. Weinfeld and Y. Pommier (2003). "Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions." DNA Repair (Amst) **2**(10): 1087-1100.

- Plummer, R., C. Jones, M. Middleton, R. Wilson, J. Evans, A. Olsen, N. Curtin, A. Boddy, P. McHugh, D. Newell, A. Harris, P. Johnson, H. Steinfeldt, R. Dewji, D. Wang, L. Robson and H. Calvert (2008). "Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors." Clin Cancer Res **14**(23): 7917-7923.
- Pop, C. and G. S. Salvesen (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." J Biol Chem **284**(33): 21777-21781.
- Popoff, I., H. Jijon, B. Monia, M. Tavernini, M. Ma, R. McKay and K. Madsen (2002). "Antisense oligonucleotides to poly(ADP-ribose) polymerase-2 ameliorate colitis in interleukin-10-deficient mice." J Pharmacol Exp Ther **303**(3): 1145-1154.
- Purnell, M. R. and W. J. Whish (1980). "Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase." Biochem J **185**(3): 775-777.
- Pyriochou, A., G. Olah, E. A. Deitch, C. Szabo and A. Papapetropoulos (2008). "Inhibition of angiogenesis by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34." Int J Mol Med **22**(1): 113-118.
- Qu, X., J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E. L. Eskelinen, N. Mizushima, Y. Ohsumi, G. Cattoretti and B. Levine (2003). "Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene." J Clin Invest **112**(12): 1809-1820.
- Quenet, D., R. El Ramy, V. Schreiber and F. Dantzer (2009). "The role of poly(ADP-ribose)ylation in epigenetic events." Int J Biochem Cell Biol **41**(1): 60-65.
- Quenet, D., V. Gasser, L. Fouillen, F. Cammas, S. Sanglier-Cianferani, R. Losson and F. Dantzer (2008). "The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha." FASEB J **22**(11): 3853-3865.
- Rabinowitz, J. D. and E. White (2010). "Autophagy and metabolism." Science **330**(6009): 1344-1348.
- Rambold, A. S., B. Kostelecky, N. Elia and J. Lippincott-Schwartz (2011). "Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(25): 10190-10195.
- Rambold, A. S. and J. Lippincott-Schwartz (2011). "Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk." Cell Cycle **10**(23): 4032-4038.
- Ranger, A. M., B. A. Malynn and S. J. Korsmeyer (2001). "Mouse models of cell death." Nat Genet **28**(2): 113-118.
- Rasper, D. M., J. P. Vaillancourt, S. Hadano, V. M. Houtzager, I. Seiden, S. L. Keen, P. Tawa, S. Xanthoudakis, J. Nasir, D. Martindale, B. F. Koop, E. P. Peterson, N. A. Thornberry, J. Huang, D. P. MacPherson, S. C. Black, F. Hornung, M. J. Lenardo, M. R. Hayden, S. Roy and D. W. Nicholson (1998). "Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex." Cell Death Differ **5**(4): 271-288.
- Ratnam, K. and J. A. Low (2007). "Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology." Clin Cancer Res **13**(5): 1383-1388.
- Realini, C. A. and F. R. Althaus (1992). "Histone shuttling by poly(ADP-riboseylation)." J Biol Chem **267**(26): 18858-18865.
- Reed, J. C. (1999). "Dysregulation of apoptosis in cancer." J Clin Oncol **17**(9): 2941-2953.

- Reggiori, F., K. A. Tucker, P. E. Stromhaug and D. J. Klionsky (2004). "The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure." Dev Cell **6**(1): 79-90.
- Roach, P. J. (2011). "AMPK -> ULK1 -> autophagy." Mol Cell Biol **31**(15): 3082-3084.
- Rodriguez-Vargas, J. M., M. J. Ruiz-Magana, C. Ruiz-Ruiz, J. Majuelos-Melguizo, A. Peralta-Leal, M. I. Rodriguez, J. A. Munoz-Gamez, M. R. de Almodovar, E. Siles, A. L. Rivas, M. Jaattela and F. J. Oliver (2012). "ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy." Cell Res **22**(7): 1181-1198.
- Rodriguez, M. I., A. Gonzalez-Flores, F. Dantzer, J. Collard, A. G. de Herreros and F. J. Oliver "Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of Snail1 protein stability." Oncogene.
- Rodriguez, M. I., A. Gonzalez-Flores, F. Dantzer, J. Collard, A. G. de Herreros and F. J. Oliver (2011). "Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of Snail1 protein stability." Oncogene **30**(42): 4365-4372.
- Roninson, I. B., E. V. Broude and B. D. Chang (2001). "If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells." Drug Resist Updat **4**(5): 303-313.
- Rosner, M., M. Hanneder, N. Siegel, A. Valli, C. Fuchs and M. Hengstschlager (2008). "The mTOR pathway and its role in human genetic diseases." Mutat Res **659**(3): 284-292.
- Rouleau, M., D. McDonald, P. Gagne, M. E. Ouellet, A. Droit, J. M. Hunter, S. Dutertre, C. Prigent, M. J. Hendzel and G. G. Poirier (2007). "PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery." J Cell Biochem **100**(2): 385-401.
- Ruf, A., G. de Murcia and G. E. Schulz (1998). "Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling." Biochemistry **37**(11): 3893-3900.
- Ruf, A., J. Mennissier de Murcia, G. de Murcia and G. E. Schulz (1996). "Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7481-7485.
- Sabatini, D. M. (2006). "mTOR and cancer: insights into a complex relationship." Nat Rev Cancer **6**(9): 729-734.
- Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst and S. H. Snyder (1994). "RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs." Cell **78**(1): 35-43.
- Sabers, C. J., M. M. Martin, G. J. Brunn, J. M. Williams, F. J. Dumont, G. Wiederrecht and R. T. Abraham (1995). "Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells." J Biol Chem **270**(2): 815-822.
- Sakai, W., E. M. Swisher, B. Y. Karlan, M. K. Agarwal, J. Higgins, C. Friedman, E. Villegas, C. Jacquemont, D. J. Farrugia, F. J. Couch, N. Urban and T. Taniguchi (2008). "Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers." Nature **451**(7182): 1116-1120.
- Saleh-Gohari, N., H. E. Bryant, N. Schultz, K. M. Parker, T. N. Cassel and T. Helleday (2005). "Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks." Mol Cell Biol **25**(16): 7158-7169.

- Salt, I., J. W. Celler, S. A. Hawley, A. Prescott, A. Woods, D. Carling and D. G. Hardie (1998). "AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform." Biochem J **334** (Pt 1): 177-187.
- Sancak, Y., C. C. Thoreen, T. R. Peterson, R. A. Lindquist, S. A. Kang, E. Spooner, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2007). "PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase." Mol Cell **25**(6): 903-915.
- Sanders, M. J., P. O. Grondin, B. D. Hegarty, M. A. Snowden and D. Carling (2007). "Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade." Biochem J **403**(1): 139-148.
- Sanjo, H., K. Takeda, T. Tsujimura, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto and S. Akira (2003). "TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for interleukin-1 signaling." Mol Cell Biol **23**(4): 1231-1238.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, D. H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2004). "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton." Curr Biol **14**(14): 1296-1302.
- Sbodio, J. I., H. F. Lodish and N. W. Chi (2002). "Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase)." Biochem J **361**(Pt 3): 451-459.
- Scott, J. W., S. A. Hawley, K. A. Green, M. Anis, G. Stewart, G. A. Scullion, D. G. Norman and D. G. Hardie (2004). "CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations." J Clin Invest **113**(2): 274-284.
- Screaton, G. R., J. Mongkolsapaya, X. N. Xu, A. E. Cowper, A. J. McMichael and J. I. Bell (1997). "TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL." Curr Biol **7**(9): 693-696.
- Scheffer, G. L., A. B. Schroeijers, M. A. Izquierdo, E. A. Wiemer and R. J. Scheper (2000). "Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer." Curr Opin Oncol **12**(6): 550-556.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil and Z. Elazar (2007). "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4." EMBO J **26**(7): 1749-1760.
- Schreiber, V., J. C. Ame, P. Dolle, I. Schultz, B. Rinaldi, V. Fraulob, J. Menissier-de Murcia and G. de Murcia (2002). "Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1." J Biol Chem **277**(25): 23028-23036.
- Schreiber, V., F. Dantzer, J. C. Ame and G. de Murcia (2006). "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 517-528.
- Shall, S. and G. de Murcia (2000). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?" Mutat Res **460**(1): 1-15.
- Shaw, R. J. (2009). "LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth." Acta Physiol (Oxf) **196**(1): 65-80.
- Shaw, R. J., N. Bardeesy, B. D. Manning, L. Lopez, M. Kosmatka, R. A. DePinho and L. C. Cantley (2004). "The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling." Cancer Cell **6**(1): 91-99.
- Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature **441**(7092): 424-430.

- Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski and A. Ashkenazi (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." Science **277**(5327): 818-821.
- Shimizu, S., M. Narita and Y. Tsujimoto (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." Nature **399**(6735): 483-487.
- Shin, S. M., I. J. Cho and S. G. Kim (2009). "Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3beta inhibition downstream of poly(ADP-ribose)polymerase-LKB1 pathway." Mol Pharmacol **76**(4): 884-895.
- Sim, A. T. and D. G. Hardie (1988). "The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase." FEBS Lett **233**(2): 294-298.
- Simbulan-Rosenthal, C. M., D. S. Rosenthal, H. Hilz, R. Hickey, L. Malkas, N. Applegren, Y. Wu, G. Bers and M. E. Smulson (1996). "The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex." Biochemistry **35**(36): 11622-11633.
- Slade, D., M. S. Dunstan, E. Barkauskaite, R. Weston, P. Lafite, N. Dixon, M. Ahel, D. Leys and I. Ahel (2011). "The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase." Nature **477**(7366): 616-620.
- Smith, C. A., T. Farrah and R. G. Goodwin (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-962.
- Smith, S. and T. de Lange (2000). "Tankyrase promotes telomere elongation in human cells." Curr Biol **10**(20): 1299-1302.
- Smith, S., I. Gariat, A. Schmitt and T. de Lange (1998). "Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres." Science **282**(5393): 1484-1487.
- Soldatenkov, V. A., S. Chasovskikh, V. N. Potaman, I. Trofimova, M. E. Smulson and A. Dritschilo (2002). "Transcriptional repression by binding of poly(ADP-ribose) polymerase to promoter sequences." J Biol Chem **277**(1): 665-670.
- Soriano, F. G., L. Liaudet, E. Szabo, L. Virag, J. G. Mabley, P. Pacher and C. Szabo (2002). "Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice." Shock **17**(4): 286-292.
- Sperandio, S., I. de Belle and D. E. Bredesen (2000). "An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14376-14381.
- Stevens, M. J., F. Li, V. R. Drel, O. I. Abatan, H. Kim, D. Burnett, D. Larkin and I. G. Obrosova (2007). "Nicotinamide reverses neurological and neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats." J Pharmacol Exp Ther **320**(1): 458-464.
- Strasser, A., L. O'Connor and V. M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-245.
- Suzuki, H., P. Quesada, B. Farina and E. Leone (1986). "In vitro poly(ADP-ribosylation) of seminal ribonuclease." J Biol Chem **261**(13): 6048-6055.
- Taccioli, G. E., G. Rathbun, E. Oltz, T. Stamato, P. A. Jeggo and F. W. Alt (1993). "Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants." Science **260**(5105): 207-210.

- Tang, D., R. Kang, K. M. Livesey, C. W. Cheh, A. Farkas, P. Loughran, G. Hoppe, M. E. Bianchi, K. J. Tracey, H. J. Zeh, 3rd and M. T. Lotze (2010). "Endogenous HMGB1 regulates autophagy." *J Cell Biol* **190**(5): 881-892.
- Tang, H., E. Hornstein, M. Stolovich, G. Levy, M. Livingstone, D. Templeton, J. Avruch and O. Meyuhas (2001). "Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8671-8683.
- Tanuma, S. I., T. Enomoto and M. A. Yamada (1978). "Changes in the level of poly ADP-ribosylation during a cell cycle." *Exp Cell Res* **117**(2): 421-430.
- Tentori, L., P. M. Lacal, A. Muzi, A. S. Dorio, C. Leonetti, M. Scarsella, F. Ruffini, W. Xu, W. Min, A. Stoppacciaro, C. Colarossi, Z. Q. Wang, J. Zhang and G. Graziani (2007). "Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition or PARP-1 gene deletion reduces angiogenesis." *Eur J Cancer* **43**(14): 2124-2133.
- Thedieck, K., P. Polak, M. L. Kim, K. D. Molle, A. Cohen, P. Jenö, C. Arriemerlou and M. N. Hall (2007). "PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis." *PLoS One* **2**(11): e1217.
- Ting, J. P., S. B. Willingham and D. T. Bergstralh (2008). "NLRs at the intersection of cell death and immunity." *Nat Rev Immunol* **8**(5): 372-379.
- Tomitsuka, E., K. Kita and H. Esumi (2010). "The NADH-fumarate reductase system, a novel mitochondrial energy metabolism, is a new target for anticancer therapy in tumor microenvironments." *Ann N Y Acad Sci* **1201**: 44-49.
- Tooze, S. A. and T. Yoshimori (2010). "The origin of the autophagosomal membrane." *Nat Cell Biol* **12**(9): 831-835.
- Trump, B. F., I. K. Berezsky, S. H. Chang and P. C. Phelps (1997). "The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis." *Toxicol Pathol* **25**(1): 82-88.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* **333**(1-2): 169-174.
- Tucker, J. A., N. Bennett, C. Brassington, S. T. Durant, G. Hassall, G. Holdgate, M. McAlister, J. W. Nissink, C. Truman and M. Watson (2012). "Structures of the human poly (ADP-ribose) glycohydrolase catalytic domain confirm catalytic mechanism and explain inhibition by ADP-HPD derivatives." *PLoS One* **7**(12): e50889.
- Tulin, A., Y. Chinenov and A. Spradling (2003). "Regulation of chromatin structure and gene activity by poly(ADP-ribose) polymerases." *Curr Top Dev Biol* **56**: 55-83.
- Tulin, A. and A. Spradling (2003). "Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci." *Science* **299**(5606): 560-562.
- Turnley, A. M., D. Stapleton, R. J. Mann, L. A. Witters, B. E. Kemp and P. F. Bartlett (1999). "Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system." *J Neurochem* **72**(4): 1707-1716.
- Vander Haar, E., S. I. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin and D. H. Kim (2007). "Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40." *Nat Cell Biol* **9**(3): 316-323.
- Varfolomeev, E. E. and A. Ashkenazi (2004). "Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?" *Cell* **116**(4): 491-497.
- Venkannagari, H., A. Fallarero, K. L. Feijs, B. Luscher and L. Lehtio (2013). "Activity-based assay for human mono-ADP-ribosyltransferases ARTD7/PARP15 and

- ARTD10/PARP10 aimed at screening and profiling inhibitors." Eur J Pharm Sci **49**(2): 148-156.
- Virag, L. (2005). "Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies." Curr Vasc Pharmacol **3**(3): 209-214.
- Virag, L., A. Robaszekiewicz, J. M. Vargas and F. Javier Oliver (2013). "Poly(ADP-ribose) signaling in cell death." Mol Aspects Med.
- Virag, L., A. L. Salzman and C. Szabo (1998). "Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death." J Immunol **161**(7): 3753-3759.
- Virag, L. and C. Szabo (2002). "The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors." Pharmacol Rev **54**(3): 375-429.
- Vittorini, S., C. Paradiso, A. Donati, G. Cavallini, M. Masini, Z. Gori, M. Pollera and E. Bergamini (1999). "The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **54**(8): B318-323.
- Wacker, D. A., D. D. Ruhl, E. H. Balagamwala, K. M. Hope, T. Zhang and W. L. Kraus (2007). "The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription." Mol Cell Biol **27**(21): 7475-7485.
- Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin and C. T. Rauch (1997). "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL." EMBO J **16**(17): 5386-5397.
- Walker, K. S., M. Deak, A. Paterson, K. Hudson, P. Cohen and D. R. Alessi (1998). "Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha." Biochem J **331** (Pt 1): 299-308.
- Wang, C., L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue and Z. J. Chen (2001). "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." Nature **412**(6844): 346-351.
- Wang, K. K., N. Liu, N. Radulovich, D. A. Wigle, M. R. Johnston, F. A. Shepherd, M. D. Minden and M. S. Tsao (2002). "Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma." Oncogene **21**(49): 7598-7604.
- Watanabe, F., H. Fukazawa, M. Masutani, H. Suzuki, H. Teraoka, S. Mizutani and Y. Uehara (2004). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits ATM kinase activity in DNA damage response." Biochem Biophys Res Commun **319**(2): 596-602.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-730.
- Welsby, I., D. Hutin and O. Leo (2012). "Complex roles of members of the ADP-ribosyl transferase super family in immune defences: looking beyond PARP1." Biochem Pharmacol **84**(1): 11-20.
- Wellen, K. E. and C. B. Thompson (2010). "Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess." Mol Cell **40**(2): 323-332.
- Whitacre, C. M., H. Hashimoto, M. L. Tsai, S. Chatterjee, S. J. Berger and N. A. Berger (1995). "Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences." Cancer Res **55**(17): 3697-3701.

- Willis, S. N. and J. M. Adams (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 617-625.
- Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, A. A. Moss and R. P. Rasmussen (1997). "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." Biotechniques **22**(1): 130-131, 134-138.
- Wojtaszewski, J. F., C. MacDonald, J. N. Nielsen, Y. Hellsten, D. G. Hardie, B. E. Kemp, B. Kiens and E. A. Richter (2003). "Regulation of 5'AMP-activated protein kinase activity and substrate utilization in exercising human skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(4): E813-822.
- Woods, A., S. R. Johnstone, K. Dickerson, F. C. Leiper, L. G. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson and D. Carling (2003). "LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade." Curr Biol **13**(22): 2004-2008.
- Wu, G. S., T. F. Burns, E. R. McDonald, 3rd, W. Jiang, R. Meng, I. D. Krantz, G. Kao, D. D. Gan, J. Y. Zhou, R. Muschel, S. R. Hamilton, N. B. Spinner, S. Markowitz, G. Wu and W. S. el-Deiry (1997). "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene." Nat Genet **17**(2): 141-143.
- Wu, L. C., Z. W. Wang, J. T. Tsan, M. A. Spillman, A. Phung, X. L. Xu, M. C. Yang, L. Y. Hwang, A. M. Bowcock and R. Baer (1996). "Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product." Nat Genet **14**(4): 430-440.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr and A. R. Currie (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.
- Xie, Z. and D. J. Klionsky (2007). "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." Nat Cell Biol **9**(10): 1102-1109.
- Yamaguchi, H. and H. G. Wang (2004). "CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells." J Biol Chem **279**(44): 45495-45502.
- Yamaguchi, K., K. Shirakabe, H. Shibuya, K. Irie, I. Oishi, N. Ueno, T. Taniguchi, E. Nishida and K. Matsumoto (1995). "Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction." Science **270**(5244): 2008-2011.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Eaten alive: a history of macroautophagy." Nat Cell Biol **12**(9): 814-822.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation." Curr Opin Cell Biol **22**(2): 124-131.
- Yelamos, J., Y. Monreal, L. Saenz, E. Aguado, V. Schreiber, R. Mota, T. Fuente, A. Minguela, P. Parrilla, G. de Murcia, E. Almarza, P. Aparicio and J. Menissier-de Murcia (2006). "PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes." EMBO J **25**(18): 4350-4360.
- Yip, C. K., K. Murata, T. Walz, D. M. Sabatini and S. A. Kang (2010). "Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition." Mol Cell **38**(5): 768-774.
- Yokoyama, Y., K. Iguchi, S. Usui and K. Hirano (2011). "AMP-activated protein kinase modulates the gene expression of aquaporin 9 via forkhead box a2." Arch Biochem Biophys **515**(1-2): 80-88.
- Young, A. R., M. Narita, M. Ferreira, K. Kirschner, M. Sadaie, J. F. Darot, S. Tavares, S. Arakawa, S. Shimizu, F. M. Watt and M. Narita (2009). "Autophagy mediates the mitotic senescence transition." Genes Dev **23**(7): 798-803.

- Yu, L., A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S. Welsh, E. H. Baehrecke and M. J. Lenardo (2004). "Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8." Science **304**(5676): 1500-1502.
- Yu, S. W., S. A. Andrabi, H. Wang, N. S. Kim, G. G. Poirier, T. M. Dawson and V. L. Dawson (2006). "Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18314-18319.
- Yu, S. W., H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson and V. L. Dawson (2002). "Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor." Science **297**(5579): 259-263.
- Yue, Z., S. Jin, C. Yang, A. J. Levine and N. Heintz (2003). "Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15077-15082.
- Zaniolo, K., S. Desnoyers, S. Leclerc and S. L. Guerin (2007). "Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Sp1: a nuclear target protein of PARP-1." BMC Mol Biol **8**: 96.
- Zerfaoui, M., Y. Errami, A. S. Naura, Y. Suzuki, H. Kim, J. Ju, T. Liu, C. P. Hans, J. G. Kim, Z. Y. Abd Elmageed, S. Koochekpour, A. Catling and A. H. Boulares (2010). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a determining factor in Crm1-mediated nuclear export and retention of p65 NF-kappa B upon TLR4 stimulation." J Immunol **185**(3): 1894-1902.
- Zha, H., C. Aime-Sempe, T. Sato and J. C. Reed (1996). "Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2." J Biol Chem **271**(13): 7440-7444.
- Zhang, K. and R. J. Kaufman (2008). "From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response." Nature **454**(7203): 455-462.
- Zhao, M. and D. J. Klionsky (2011). "AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 induces autophagy." Cell Metab **13**(2): 119-120.
- Zhu, C. Q., F. H. Blackhall, M. Pintilie, P. Iyengar, N. Liu, J. Ho, T. Chomiak, D. Lau, T. Winton, F. A. Shepherd and M. S. Tsao (2004). "Skp2 gene copy number aberrations are common in non-small cell lung carcinoma, and its overexpression in tumors with ras mutation is a poor prognostic marker." Clin Cancer Res **10**(6): 1984-1991.
- Zinzalla, V., D. Stracka, W. Oppliger and M. N. Hall (2011). "Activation of mTORC2 by association with the ribosome." Cell **144**(5): 757-768.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS