

# TESIS DOCTORAL

---

## Control metabólico de la sensibilidad a TRAIL en células epiteliales de mama: Papel de AMPK

Celina García García

2009

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa

Consejo Superior de Investigaciones científicas





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

**CERTIFICA:**

Que el trabajo titulado **“Control metabólico de la sensibilidad a TRAIL en células epiteliales de mama: Papel de AMPK”**, presentado por **Doña Celina García García**, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizado bajo su supervisión en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea defendido ante el tribunal correspondiente.

Y, para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 24 de Septiembre de 2009.

Fdo: Dr. Abelardo López Rivas

VºBº: Dr. Andrés Aguilera López  
Catedrático del  
Departamento de  
Genética  
Tutor del presente trabajo de  
doctorado



<i>ÍNDICE</i>	
I. Abreviaturas.....	1
II. Resumen.....	13
III. Introducción.....	17
1. <i>Apoptosis y otros mecanismos de muerte celular</i> .....	19
1.1. Apoptosis.....	19
1.2. Autofagia.....	20
1.3. Necrosis.....	20
2. <i>Caspasas</i> .....	22
2.1. Características principales.....	22
2.2. Clasificación estructural.....	22
2.2.1. Caspasas de prodominio largo.....	22
2.2.2. Caspasas de prodominio corto.....	23
2.3. Activación.....	24
2.3.1. Activación por proximidad.....	25
2.3.2. Proteólisis por otra caspasa.....	26
2.4. Inhibidores.....	26
2.4.1. IAPs.....	26
2.4.2. FLIP.....	28
3. <i>Rutas de apoptosis</i> .....	30
3.1. Ruta intrínseca.....	31
3.1.1. Familia Bcl-2.....	32
3.1.2. Permeabilización de la membrana mitocondrial.....	34
3.2. Ruta extrínseca.....	35
3.2.1. Receptores de TNF $\alpha$ .....	36
3.2.2. Receptores de FasL.....	38
3.2.3. Receptores de TRAIL.....	39
3.3. Interconexión entre ambas rutas.....	44
4. <i>TRAIL en la terapia antitumoral</i> .....	44
5. <i>Metabolismo de las células tumorales</i> .....	49
5.1. Glucólisis aeróbica.....	49
5.2. Regulación del metabolismo tumoral por factores de transcripción.....	50

5.2.1. Myc.....	50
5.2.2. HIF-1.....	52
5.2.3. p53.....	52
5.3. mTOR, el centro de regulación del crecimiento celular.....	53
5.3.1. Estructura.....	53
5.3.2. Función.....	53
5.3.3. Regulación.....	54
<b>6. AMPK: sensor del estado energético celular.....</b>	<b>57</b>
6.1. Introducción.....	57
6.2. Estructura.....	57
6.3. Regulación.....	60
6.3.1. LKB1.....	61
6.3.2. CaMKK $\beta$ .....	61
6.3.3. TAK1.....	62
6.4. Función.....	64
6.4.1. ACC y HMGCR: inhibición de la síntesis de ácidos grasos y colesterol.....	65
6.4.2. mTOR: inhibición de la síntesis proteica.....	65
6.4.3. p53: control del ciclo celular.....	65
<b>7. Activadores de AMPK.....</b>	<b>66</b>
7.1. Biguanidinas: Metformina y Fenformina.....	66
7.2. 2DG: 2-Deoxiglucosa.....	66
7.3. AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleasa.....	67
7.4. A-769662.....	67
7.5. PT1.....	68
<b>8. AMPK y Cáncer.....</b>	<b>68</b>
<b>IV. Objetivos.....</b>	<b>71</b>
<b>V. Materiales y Métodos.....</b>	<b>75</b>
<b>1. Materiales.....</b>	<b>77</b>
1.1. Cultivos celulares.....	77
1.2. Reactivos.....	78
1.3. Anticuerpos.....	78
1.4. RNAs de interferencia.....	80
1.5. Cebadores para RT-PCR.....	81

1.6. Construcciones adenovirales.....	81
1.7. Soluciones comunes.....	82
<b>2. Metodología.....</b>	<b>83</b>
2.1. Cuantificación de la viabilidad celular por cristal violeta.....	83
2.2. Cuantificación de la viabilidad celular por SYTOX.....	83
2.3. Cuantificación de apoptosis.....	83
2.4. Análisis de receptores de TRAIL en la superficie celular.....	84
2.5. Producción de TRAIL recombinante y TRAIL biotinilado recombinante (b-TRAIL).....	85
2.6. Aislamiento del DISC de TRAIL.....	86
2.7. Inmunoprecipitación de TAB2.....	87
2.8. Inmunodetección de proteínas por Western Blot.....	88
2.9. Fraccionamiento celular.....	89
2.10. Medida de la concentración de proteína.....	89
2.11. Transfección transitoria por DHARMAFECT para silenciamiento de proteínas.....	90
2.12. Infecciones adenovirales.....	90
2.13. Inmunoprecipitación de AMPK y medida de actividad AMPK 'in vitro'.....	91
2.14. Fosforilación del DISC de TRAIL 'in vitro'.....	92
2.15. RT-PCR (Transcripción reversa de RNA y amplificación de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)).....	93
2.16. Análisis estadístico.....	94
<b>VI. Resultados.....</b>	<b>95</b>
<i><b>CAPÍTULO 1: Activadores de AMPK sensibilizan a las células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.....</b></i>	<i><b>97</b></i>
1. AICAR, A-679662, Fenformina y la limitación de glucosa sensibilizan a células tumorales a la apoptosis inducida por TRAIL.....	97
2. La sensibilización a TRAIL inducida por AICAR requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial.....	104

3. La sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL, observada tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con AICAR, A-769662, limitación de Glucosa y Fenformina, es independiente de la activación de AMPK.....	107
4. La sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL, observada tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con activadores de AMPK es independiente de la activación de JNK.....	114
5. El estado de fosforilación de bad no está implicado en la sensibilización a TRAIL inducida por los activadores de AMPK en las células MDA-MB231.....	117
6. Análisis del DISC tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con activadores de AMPK.....	119
7. La disminución, independiente de AMPK, de los niveles de cFLIP por los activadores de AMPK es necesaria para la sensibilización de las células tumorales de mama a TRAIL.....	123

***CAPÍTULO 2: IMPLICACIÓN DE AMPK EN SUPERVIVENCIA CELULAR..... 127***

1. La reducción de los niveles de AMPK sensibiliza a las células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.....	127
2. La sensibilización a TRAIL inducida por el silenciamiento de AMPK requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial.....	129
3. La función antiapoptótica de AMPK es independiente de la resistencia a la apoptosis determinada por los niveles de cFLIP en las células MDA-MB231.....	132
4. El silenciamiento de AMPK implica una disminución en la expresión de bcl2 que no es suficiente para sensibilizar las células MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL.....	133
5. El silenciamiento de AMPK viene acompañado por un aumento en la expresión de TRAIL-R2 en la superficie de las células MDA-MB231.....	135



<b>CAPÍTULO 3: Mecanismo de activación de AMPK por TRAIL.....</b>	<b>139</b>
1. TRAIL activa AMPK en células tumorales.....	139
2. La reducción de LKB1, CaMkk $\beta$ y TAK1 mediante siRNA no bloquea la activación de AMPK en las células MDA-MB231.....	139
3. La implicación de la actividad caspasa en la activación de AMPK por TRAIL es dependiente del tipo celular.....	141
4. TRAIL activa AMPK en células epiteliales de mama a través de la inducción y activación del complejo TAK1-TAB2.....	144
<b>VII. Discusión.....</b>	<b>147</b>
1. Sensibilización a TRAIL por activadores de AMPK, a través de una regulación negativa de FLIP independiente de AMPK.....	149
2. Sensibilización a TRAIL por silenciamiento de AMPK, a través de la inducción de TRAIL-R2.....	156
3. Mecanismo de activación de AMPK por TRAIL.....	160
<b>VIII. Conclusiones.....</b>	<b>165</b>
<b>IX. Bibliografía.....</b>	<b>169</b>
<b>X. Anexo: Publicaciones.....</b>	<b>205</b>





## I. ABREVIATURAS



<b>2DG</b>	2-Deoxiglucosa <i>(del inglés, 2-Deoxyglucose)</i>
<b>3MA</b>	3-Metiladenina <i>(del inglés, 3-Methyladenine)</i>
<b>4EBP1</b>	Proteína 1 de unión a eIF4E <i>(del inglés, eIF4E Binding Protein 1)</i>
<b>Aa</b>	Aminoácido.
<b>ACC</b>	Acetil-CoA carboxilasa <i>(del inglés, Acetil-CoA carboxilase)</i>
<b>Ac-CoA</b>	Acetil-Coenzima A <i>(del inglés, Acetyl-CoenzymeA)</i>
<b>αKG</b>	α-cetoglutarato <i>(del inglés, α-ketoglutarate)</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico <i>(del inglés, DNA)</i>
<b>ADP</b>	Adenosin difosfato <i>(del inglés, Adenosine diphosphate)</i>
<b>AICAR</b>	5-Aminoimidazol-4-carboxamida 1-β-D-ribofuranóxido <i>(del inglés, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-β-D-ribofuranoside)</i>
<b>AID</b>	Dominio autoinhibitorio <i>(del inglés, Autoinhibitory domain)</i>
<b>AIF</b>	Factor inductor de apoptosis <i>(del inglés, Apoptosis Inducing Factor)</i>
<b>ALD-A/C</b>	Aldolasa-A/C <i>(del inglés, Aldolase-A/C)</i>
<b>AMP</b>	Adenosin monofosfato <i>(del inglés, Adenosine monophosphate)</i>
<b>AMPK</b>	Quinasa activada por AMP <i>(del inglés, AMP-activated kinase)</i>
<b>APAF-1</b>	Factor 1 activador de proteasas apoptóticas <i>(del inglés, Apoptotic protease-activating factor-1)</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico <i>(del inglés, RNA)</i>
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero <i>(del inglés, mRNA)</i>
<b>ARNsi</b>	Ácido ribonucleico de interferencia <i>(del inglés, siRNA)</i>
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato <i>(del inglés, Adenosine triphosphate)</i>
<b>Bcl-2</b>	<i>(del inglés, B-cell CLL/lymphoma 2)</i>
<b>BH</b>	Dominio de homología a Bcl-2 <i>(del inglés, Bcl-2 homology domain)</i>
<b>BIR</b>	<i>(del inglés, Baculoviral IAP repeat)</i>
<b>BRUCE</b>	Enzima portadora de BIR conjugadora de ubiquitina <i>(del inglés, BIR-containing Ubiquitin Conjugating Enzyme)</i>
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina <i>(del inglés, Bovine serum albumin)</i>

<b>CaMkk<math>\beta</math></b>	Calcio/calmodulina quinasa quinasa- $\beta$ <i>(del inglés, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent kinase kinase-<math>\beta</math>)</i>
<b>CARD</b>	Dominio de reclutamiento y activación de caspasa <i>(del inglés, Caspase activation and recruitment domain)</i>
<b>CBS</b>	Sintasa cristationina- $\beta$ <i>(del inglés, Crystathionine-<math>\beta</math>-sintase)</i>
<b>CHOP</b>	<i>(del inglés, CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein)</i>
<b>CHX</b>	Cicloheximida <i>(del inglés, Cycloheximide)</i>
<b>clAP1/2</b>	IAP1/2 celular <i>(del inglés, cellular IAP1/2)</i>
<b>Cit</b>	Citrato <i>(del inglés, Citrate)</i>
<b>CLL</b>	Leucemia linfocítica crónica <i>(del inglés, Chronic lymphocytic leukaemia)</i>
<b>CPT1</b>	Carnitina palmitoiltransferasa 1 <i>(del inglés, Carnitine palmitoyltransferase 1)</i>
<b>CRD</b>	Dominio rico en cisteínas <i>(del inglés, Cystein-Rich Domain)</i>
<b>CTD</b>	Dominio C-terminal <i>(del inglés, C-terminal domain)</i>
<b>DcR</b>	Receptor señuelo <i>(del inglés, Decoy receptor)</i>
<b>DD</b>	Dominio de muerte <i>(del inglés, Death domain)</i>
<b>DED</b>	Dominio efector de muerte <i>(del inglés, Death effector domain)</i>
<b>DIABLO</b>	Proteína de unión al inhibidor directo de apoptosis <i>(del inglés, Direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI)</i>
<b>DISC</b>	Complejo inductor de muerte <i>(del inglés, Death-inducing signaling complex)</i>
<b>DMEM</b>	<i>(del inglés, Dubelco's modified Eagle's medium)</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido <i>(del inglés, Dimethyl sulfoxide)</i>
<b>DNA</b>	ADN <i>(del inglés, Deoxyribonucleic acid)</i>
<b>DNAsa</b>	Desoxirribonucleasa <i>(del inglés, Deoxyribonuclease)</i>
<b>DTT</b>	Ditiotreitól <i>(del inglés, Dithiothreitol)</i>
<b>ECL</b>	Reactivo quimioluminiscente <i>(del inglés, Enhanced chemiluminescence)</i>
<b>EDTA</b>	Etinildiaminotetraacetato <i>(del inglés, Etinildiaminotetraacetate)</i>

<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico <i>(del inglés, Epidermal growth factor)</i>
<b>EGFR</b>	Receptor de factores de crecimiento epidérmicos <i>(del inglés, Epidermal Growth Factor Receptor)</i>
<b>eIF4E</b>	Factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E <i>(del inglés, Eukaryotic translation initiation factor 4E)</i>
<b>ENaC</b>	Canales de sodio epiteliales <i>(del inglés, Epithelial Na<sup>+</sup> channel)</i>
<b>ENO1</b>	Enolasa 1 <i>(del inglés, Enolase 1)</i>
<b>ER</b>	Reticulo endoplásmico <i>(del inglés, Endoplasmic reticulum)</i>
<b>ERs</b>	Receptores de estrógenos <i>(del inglés, Estrogen receptors)</i>
<b>FACS</b>	Citometría de flujo <i>(del inglés, Fluorescence activated cell sorting)</i>
<b>FADD</b>	Dominio de muerte asociado a Fas <i>(del inglés, Fas-associated death domain)</i>
<b>FasL</b>	Ligando de Fas <i>(del inglés, Fas Ligand)</i>
<b>FBPasa</b>	Fructosa-1,6-bifosfatasa <i>(del inglés, Fructose-1,6-biphosphatase)</i>
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal <i>(del inglés, Fetal bovine serum)</i>
<b>F(18)-FDG</b>	F18-fluorodeoxiglucosa <i>(del inglés, F18-fluorodeoxyglucose)</i>
<b>FITC</b>	Isotiacianato de fluoresceína <i>(del inglés, Fluorescein isothiocyanate)</i>
<b>FLICE</b>	Caspasa-8 <i>(del inglés, FADD-like IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme)</i>
<b>FLIP</b>	Proteína inhibidora de caspasa-8 <i>(del inglés, FLICE inhibitory protein)</i>
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa <i>(del inglés, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)</i>
<b>GBD</b>	Dominio de unión a glucógeno <i>(del inglés, Glycogen binding domain)</i>
<b>Gln</b>	Glutamina <i>(del inglés, Glutamine)</i>
<b>GLUT-1/3/4</b>	Transportadores de glucosa-1/3/4 <i>(del inglés, Glucose transporters-1/3/4)</i>

<b>GPPasa</b>	Glucógeno fosforilasa (del inglés, Glycogen phosphorilase)
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ (del inglés, Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ )
<b>HDACi</b>	Inhibidores de la histona desacetilasa (del inglés, Histone Deacetylase inhibitors)
<b>HGS</b>	Ciencias genómicas humanas (del inglés, Human genome sciences)
<b>HK2</b>	Hexoquinasa 2 (del inglés, Hexokinase 2)
<b>HMGCoA</b>	3-Hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (del inglés, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA)
<b>HMGCR</b>	HMGCoA reductasa (del inglés, HMGCoA reductase)
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano (del inglés, Horseradish peroxidase)
<b>IAP</b>	Proteína inhibidora de apoptosis (del inglés, Inhibitor of apoptosis protein)
<b>ICE</b>	Enzima convertidora de interleuquina-1 $\beta$ (del inglés, Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme)
<b>IGF1R</b>	Receptor de factores de crecimiento parecidos a la Insulina de tipo 1 (del inglés, Insulin-like growth factor receptor 1)
<b>IL-1R</b>	Receptor de interleuquina-1 (del inglés, Interleukin-1 receptor)
<b>IR</b>	Receptor de insulina (del inglés, Insulin receptor)
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina (del inglés, Insulin Receptor Substrate)
<b>JNK</b>	Quinasa N-terminal de c-Jun (inglés, c-Jun N-terminal kinase)
<b>KD</b>	Dominio quinasa (del inglés, Kinase domain)
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>LC3</b>	Proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (del inglés, Microtubule-associated protein-light chain 3)
<b>LDH-A</b>	Lactato deshidrogenasa-A (del inglés, Lactate dehydrogenase-A)
<b>MAPK</b>	Quinasa activada por mitógenos (del inglés, Mitogen-activated protein kinase)



<b>MAPKKK</b>	Quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos <i>(del inglés, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase)</i>
<b>MCT-4</b>	Transportador de monocarboxilato-4 <i>(del inglés, Monocarboxylate transporter-4)</i>
<b>MEFs</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón <i>(del inglés, Murine embryonic fibroblasts)</i>
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MOMP</b>	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial <i>(del inglés, Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization)</i>
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección <i>(del inglés, Multiplicity of infection)</i>
<b>Mps1</b>	Quinasa del punto de control mitótico <i>(del inglés, Mitotic checkpoint kinase monopolar spindle 1)</i>
<b>mRNA</b>	ARNm <i>(del inglés, Messenger ribonucleic acid)</i>
<b>mTOR</b>	Diana de rapamicina en mamíferos <i>(del inglés, Mammalian target of rapamycin)</i>
<b>mTORC</b>	Complejo de mTOR <i>(del inglés, Mammalian target of rapamycin complex)</i>
<b>NAIP</b>	Proteína neuronal inhibidora de apoptosis <i>(del inglés, Neuronal apoptosis inhibitory protein)</i>
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B <i>(del inglés, Nuclear factor κ B)</i>
<b>NK</b>	<i>(del inglés, Natural killer)</i>
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanometros
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NTD</b>	Dominio N-terminal <i>(del inglés, N-terminal domain)</i>
<b>OAA</b>	Ácido oxalacético <i>(del inglés, Oxaloacetic acid)</i>
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>OXPHOS</b>	Fosforilación mitocondrial oxidativa <i>(del inglés, Mitochondrial oxidative phosphorylation)</i>
<b>p70<sup>S6K</sup></b>	Quinasa de la proteína ribosomal S6 <i>(del inglés, 70 kDa ribosomal protein S6 kinase)</i>
<b>PARP-1</b>	Poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 <i>(del inglés, Poly (ADP-ribose) polymerase 1)</i>

PBS	Tampón salino fosfato ( <i>del inglés, Phosphate-buffered saline</i> )
PCD	Muerte celular programada ( <i>del inglés, Programmed cell death</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>del inglés Polymerase chain reaction</i> )
PDK1	Proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol ( <i>del inglés, 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i> )
PE	Fosfatidil etanolamina ( <i>del inglés, phosphatidylethanolamine</i> )
PET	Tomografía de emisión de positrones ( <i>del inglés, Positron Emission Tomography</i> )
PFK1/2	Fosfofructo quinasa 1/2 ( <i>del inglés, Phosphofructo kinase 1/2</i> )
PFU	Unidades de formación de placa ( <i>del inglés, Plaque Forming Units,</i> )
PGI	Glucosafosfato isomerasa ( <i>del inglés, Phosphoglucose isomerase</i> )
PGK1	Fosfoglicerato quinasa 1 ( <i>del inglés, Phosphoglycerate kinase 1</i> )
PGM	Fosfoglicerato mutasa ( <i>del inglés, Phosphoglycerate mutase</i> )
pH	$\log 1/[H^+]$
PI	Ioduro de propidio ( <i>del inglés, Propidium iodide</i> )
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa ( <i>del inglés, Phosphoinositol-3-kinase</i> )
PIDD	Proteína con dominio de muerte inducida por p53 ( <i>p53-induced protein with a death domain</i> )
PJS	Síndrome de Peutz-Jeghers ( <i>del inglés, Peutz-Jeghers syndrome</i> )
PK-M	Piruvato quinasa M ( <i>del inglés, Piruvate kinase M</i> )
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluoruro ( <i>del inglés, Phenylmethyl sulphonyl fluoride</i> )
POD	Dominio oncogénico PML ( <i>del inglés, PML Oncogenic Domain</i> )
PP1	Proteína fosfatasa de tipo 1 ( <i>del inglés, Protein Phosphatase type 1</i> )

<b>PS</b>	Fosfatidilserina <i>(del inglés, phosphatidylserine)</i>
<b>PTEN</b>	<i>(del inglés, Phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10)</i>
<b>PUMA</b>	Modulador de apoptosis regulado por p53 <i>(del inglés, p53-upregulated modulator of apoptosis)</i>
<b>RHEB</b>	<i>(del inglés, Ras homologue enriched in brain)</i>
<b>RING</b>	<i>(del inglés, Really interesting new gene)</i>
<b>RIP1/3</b>	Proteína quinasa 1/3 de interacción con el receptor <i>(del inglés, Receptor-interacting protein kinase 1/3)</i>
<b>RNA</b>	ARN <i>(del inglés, Ribonucleic acid)</i>
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa <i>(del inglés, Ribonuclease)</i>
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno <i>(del inglés, Reactive oxygen species)</i>
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa de ARN y amplificación de ADN por Reacción en cadena de la polimerasa <i>(del inglés, Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)</i>
<b>RTK</b>	Receptor con actividad tirosín quinasa <i>(del inglés, Receptor Tyrosine Kinase)</i>
<b>SAMS</b>	Péptido de 15 aminoácidos con la secuencia consenso de fosforilación por AMPK (Serina-Alanina-Metionina-Serina)
<b>SCO2</b>	Síntesis de la citocromo C oxidasa 2 <i>(del inglés, Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2)</i>
<b>SDS</b>	<i>(del inglés, Sodium dodecyl sulfate)</i>
<b>siRNA</b>	ARN de interferencia <i>(del inglés, Small interfering RNA)</i>
<b>SMA</b>	Atrofia muscular espinal <i>(del inglés, Spinal muscular atrophy)</i>
<b>Smac</b>	Activador de caspasas derivado de mitocondria <i>(del inglés, Second mitochondria-derived activator of caspases)</i>
<b>SODD</b>	Silenciador del dominio de muerte <i>(del inglés, Silencer of death domain)</i>
<b>STRAD</b>	<i>(del inglés, STE20-related adaptor)</i>
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAB</b>	Proteína de unión a TAK1 <i>(del inglés, TAK1-binding protein)</i>

<b>TACE</b>	TNF $\alpha$ convertasa <i>(del inglés, TNF-<math>\alpha</math> converting enzyme)</i>
<b>TAE</b>	Tris acetato EDTA <i>(del inglés, Tris acetate-EDTA)</i>
<b>TAK1</b>	Quinasa activada por TGF- $\beta$ <i>(del inglés, TGF-<math>\beta</math> activating kinase 1)</i>
<b>tBid</b>	Bid truncado <i>(del inglés, Truncated Bid)</i>
<b>TBS</b>	Tampón salino de Tris <i>(del inglés, Tris-buffered saline)</i>
<b>TCA</b>	Ácidos tricarbóxicos <i>(del inglés, Tricarboxylic acids)</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ <i>(en inglés, Transforming growth factor-<math>\beta</math>)</i>
<b>TE</b>	Tris EDTA <i>(del inglés, Tris EDTA)</i>
<b>TEMED</b>	Tetrametiletileno diamina <i>(del inglés, N-N'-N'-N'-Tetramethylethylene diamine)</i>
<b>THD</b>	Dominio de homología a TNF <i>(del inglés, TNF-homology domain)</i>
<b>TIGAR</b>	Regulador de apoptosis y glucólisis inducido por TP53 <i>(del inglés, TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator)</i>
<b>TLR</b>	Receptor parecido a Toll <i>(del inglés, Toll-Like Receptor)</i>
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral <i>(del inglés, Tumor necrosis factor)</i>
<b>TNFR</b>	Receptor de TNF <i>(del inglés, TNF Receptor)</i>
<b>TPI</b>	Triosafofato isomerasa <i>(del inglés, Triose phosphate isomerase)</i>
<b>TRADD</b>	Dominio de muerte asociado al receptor de TNF <i>(del inglés, TNF receptor-associated death domain)</i>
<b>TRAF</b>	Factor asociado al receptor de TNF <i>(del inglés, TNF Receptor-Associated Factor)</i>
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF <i>(del inglés, TNF-related apoptosis-inducing ligand)</i>
<b>TRAIL-R</b>	Receptor de TRAIL <i>(del inglés, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor)</i>
<b>TRIS</b>	<i>(del inglés, Trishydroxymethylaminomethane)</i>
<b>TSC1/2</b>	Complejo de tuberoesclerosis <i>(del inglés, Tuberous sclerosis complex)</i>
<b>Ts-IAP</b>	IAP específico de testículo <i>(del inglés, Testis-specific IAP)</i>
<b>U</b>	Unidades
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo

<b>μl</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>UPR</b>	Respuesta a proteínas mal plegadas ( <i>del inglés, Unfolded protein response</i> )
<b>XIAP</b>	IAP del cromosoma X ( <i>del inglés, X-linked IAP</i> )
<b>z-VAD-fmk</b>	( <i>del inglés, Z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone</i> )



## II. RESUMEN





La apoptosis es el mecanismo por el cual las células son eliminadas del organismo tras una serie de procesos bioquímicos controlados, en ausencia de procesos inflamatorios que dañen a los tejidos circundantes.

El ligando de muerte relacionado con la familia de TNF (Factor de Necrosis Tumoral), TRAIL, es capaz de inducir apoptosis en células tumorales con una toxicidad mínima sobre las células normales, convirtiéndose así en una herramienta prometedora en el desarrollo de terapias antitumorales. Sin embargo, existen casos de células tumorales que muestran resistencia a la acción apoptótica de TRAIL, como es el caso de numerosas líneas celulares tumorales de mama. Por esta razón, los últimos estudios se focalizan en el conocimiento de los mecanismos de esta resistencia así como en la identificación de tratamientos que sensibilicen a la célula tumoral a la apoptosis inducida por TRAIL.

La quinasa dependiente de AMP, AMPK, es el sensor del estado energético celular, que cuando se activa es capaz de inhibir el metabolismo anabólico e inducir al mismo tiempo el catabólico, con el fin de restablecer los niveles de AMP/ATP intracelulares antes de que el ciclo celular continúe. A pesar de que la función de AMPK en el metabolismo y mantenimiento de la homeostasis energética celular está muy estudiada, la implicación de AMPK en la proliferación y supervivencia celular no está tan bien definida y resulta controvertida.

Partiendo de datos previos en nuestro laboratorio, que mostraban cómo la privación de glucosa, acompañada de una disminución en los niveles de ATP intracelulares, sensibilizaba a células tumorales a la apoptosis inducida por TRAIL, centramos nuestro trabajo en estudiar el papel de AMPK en la supervivencia y resistencia a TRAIL en células tumorales de mama.

En esta tesis se muestra cómo tratamientos activadores de la quinasa AMPK, tales como el AICAR (5-Aminoimidazol-4-carboxamida 1- $\beta$ -D-ribofuranóxido), el compuesto A-769662, la Fenformina o limitación de glucosa en el medio extracelular, sensibilizan a células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL, pero de forma independiente de AMPK. En concreto, todos esos activadores inducen una disminución, mediada por el proteasoma, de los niveles de c-FLIP (proteína inhibidora de caspasa-8), responsable de dicha sensibilización a TRAIL,

independientemente de AMPK. Aunque aún no se han descrito los mecanismos de regulación de c-FLIP por estos estímulos, queda patente que todos ellos tienen dianas alternativas a AMPK dentro de la célula.

Por otro lado, hemos observado que la disminución de los niveles basales de AMPK en las células tumorales de mama mediante siRNA sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL. Esta sensibilización se debe, al menos en parte, a un aumento de los niveles proteicos del receptor proapoptótico TRAIL-R2 en la superficie celular. Por lo tanto, la actividad AMPK parece estar implicada en señalización de supervivencia celular.

Además, durante el desarrollo de este trabajo se ha observado que TRAIL induce la activación de AMPK, tanto en células tumorales como no tumorales de mama. En las células tumorales de mama, ninguna de las quinasas conocidas de AMPK es, al menos, la única responsable de la activación de AMPK por TRAIL. Sin embargo, en células epiteliales de mama no tumorales la activación de AMPK por TRAIL viene mediada por TAK1 (quinasa activada por TGF- $\beta$ ), y requiere la proteína adaptadora TAB2 (proteína de unión a TAK1). Nuestros resultados sugieren que la activación de AMPK por TRAIL es una respuesta de supervivencia de la célula a este estímulo apoptótico. No obstante, son necesarios más estudios para esclarecer el mecanismo de activación de TAK1 y AMPK por TRAIL.



## III. INTRODUCCIÓN



## 1. Apoptosis y otros mecanismos de muerte celular.

### 1.1. Apoptosis.

La apoptosis, o muerte celular programada (PCD, *Programmed Cell Death*) de tipo 1 es el mecanismo por el cual las células son eliminadas del organismo tras una serie de procesos bioquímicos controlados, siendo esencial durante el desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en los organismos multicelulares [Kerr et al., 1972].

Se caracteriza morfológica y fisiológicamente por la ejecución de una serie de pasos: primero, la contracción de la célula y condensación de la cromatina, luego una fragmentación del DNA en múltiplos de 180-200 pb [Enari et al., 1998], dando lugar a la escalera de DNA característica de la apoptosis [Wyllie, 1980]. A continuación tiene lugar la zeiosis, que corresponde con el abultamiento o *burbujeo* de la célula debido a la dilatación y unión del retículo endoplásmico a la membrana plasmática. Finalmente, ésta se fragmenta en cuerpos apoptóticos, que impiden la liberación del contenido citoplasmático al exterior, evitando así procesos inflamatorios. Durante el desarrollo de la apoptosis existe una reorganización de la membrana celular en la que las moléculas de fosfatidilserina (PS, *phosphatidylserine*), en principio expuestas al contenido citoplasmático, se translocan a la cara externa de la membrana, convirtiéndose en señal de reconocimiento para que las células fagocíticas vecinas las eliminen [Fadok et al., 2000] (figura 1 y 2).

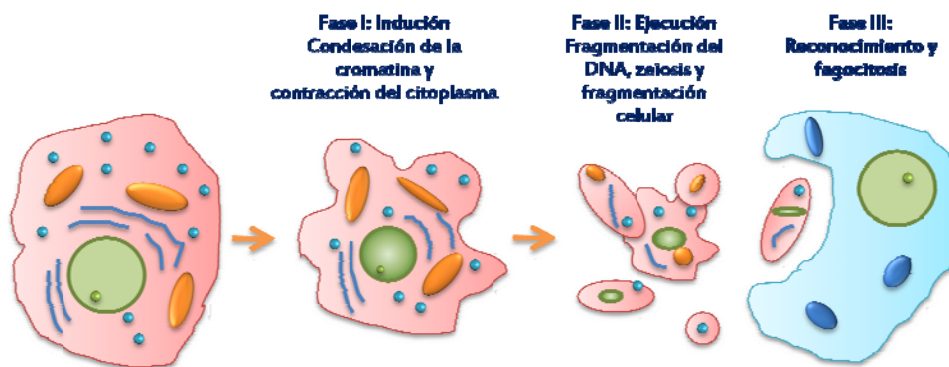


Figura 1: Fases de la apoptosis.

Existe un tipo de muerte celular programada parecida a la apoptosis (*apoptosis-like* PCD), en la que la condensación de la cromatina es más débil [Leist and Jaattela, 2001]. En este grupo se engloba la muerte celular programada independiente de caspasas, siendo esta característica la mayor diferencia con respecto a la apoptosis.

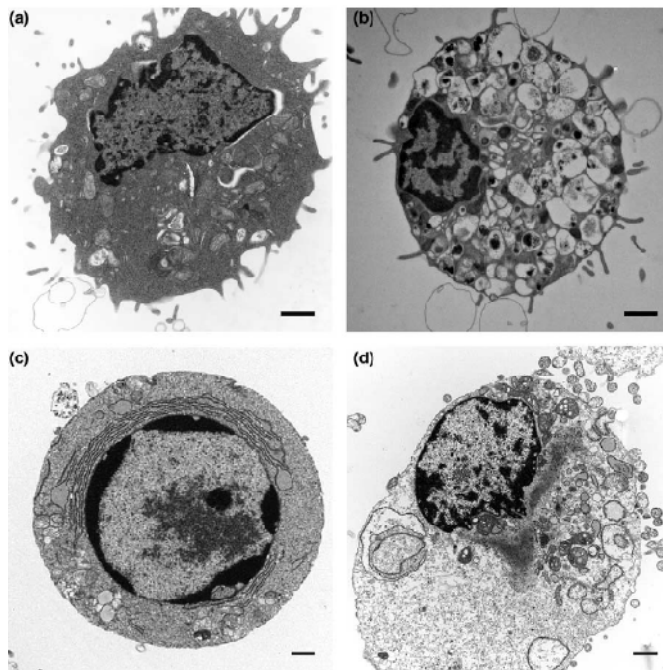
### *1.2. Autofagia.*

La autofagia, o muerte celular programada de tipo II, es un proceso catabólico que conlleva la encapsulación del contenido citoplasmático de la célula, incluyendo orgánulos, en el interior de estructuras de doble membrana, llamadas autofagosomas, que posteriormente se fusionarán con los lisosomas, donde las enzimas lisosomales degradarán su contenido [Levine and Klionsky, 2004] (figura 2). La degradación de macromoléculas y orgánulos provee una fuente alternativa de nutrientes a la célula [Klionsky and Emr, 2000], a la vez que elimina orgánulos y proteínas dañadas [Edinger and Thompson, 2003; Jin and White, 2007]. Por lo tanto, la autofagia es principalmente una respuesta adaptativa de supervivencia, convirtiéndose en un mecanismo de muerte sólo en ciertos contextos, generalmente cuando su activación se vuelve insostenible para la viabilidad celular.

### *1.3. Necrosis.*

La necrosis se describió como un proceso de muerte celular no controlado, resultado de una catástrofe bioenergética debida mayoritariamente a daños mecánicos o agentes tóxicos en la célula.

Se caracteriza por una vacuolización del citoplasma, hinchazón y posterior ruptura de la membrana plasmática, vertiendo el contenido citoplasmático a la matriz extracelular, lo que provoca procesos inflamatorios en el tejido circundante [Zong and Thompson, 2006] (figura 2).



**Figura 2: Morfología de la muerte celular.**

(a) Normal, (b) autofagia, (c) apoptosis, (d) necrosis. La vacuolización del citoplasma se observa tanto en autofagia (b) como en necrosis (d), debido a que existe una depleción de energía en estas condiciones. En el caso de la apoptosis (c) los niveles de ATP se mantienen como en las normales (a), por lo que no se observan vacuolización. La escala representa 1  $\mu\text{m}$ . [Edinger and

Sin embargo, datos más recientes demuestran que la necrosis puede darse de forma programada en determinados contextos. Así, tanto ligandos como  $\text{TNF}\alpha$  o Fas [Vercammen et al., 1998a; Vercammen et al., 1998b], a través de la activación de RIP1 y RIP3 (*Receptor-Interacting Protein kinase 1/3*) [Cho et al., 2009; Festjens et al., 2007; He et al., 2009; Holler et al., 2000], como un daño al DNA, a través de la activación de PARP-1 (*Poly (ADP-ribose) polimerase 1*) [Cipriani et al., 2005; Ha and Snyder, 1999; Yu et al., 2002], pueden inducir necrosis. A este tipo de muerte se le conoce como muerte celular programada parecida a la necrosis (*necrosis-like PCD*) [Leist and Jaattela, 2001]. Lo que les diferencia fundamentalmente de la apoptosis es la falta de condensación de la cromatina, la independencia de caspasas y que vierten su contenido citoplasmático a la matriz extracelular.

Además, existe otro tipo de necrosis llamada necrosis apoptótica, que tiene lugar cuando una célula en proceso apoptótico avanzado no es fagocitada por otras células, lo que implica una pérdida de la integridad de la membrana que provoca la liberación del citoplasma, dando lugar a procesos inflamatorios [Majno and Joris, 1995].

## 2. Caspasas.

### 2.1. Características principales

Las caspasas (*cysteine aspartyl-specific proteases*) son una familia de proteasas que constituyen la base mecánica de la muerte celular programada. La primera identificada en mamíferos fue la caspasa-1, inicialmente conocida como ICE (*Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme*), responsable de la maduración proteolítica de la interleuquina-1 $\beta$  [Black et al., 1989; Kostura et al., 1989]. Sin embargo, hasta 1993 no se le atribuyó ningún papel en muerte celular. Fue entonces cuando se clonó el dominio cisteín proteasa de CED-3 (su ortólogo en *Caenorhabditis elegans*, implicado en el programa de muerte celular) y se observó su homología con la caspasa-1 [Yuan et al., 1993].

En humanos se han descrito hasta la fecha 11 caspasas: caspasa-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -14. Las caspasas 11 y 12 son los ortólogos murinos de las caspasas -4 y -5 en humanos [Lamkanfi et al., 2002]. La caspasa-13 fue posteriormente identificada como el ortólogo bovino de la caspasa-4 [Koenig et al., 2001]. Recientemente se ha identificado la caspasa-15 en mamíferos, pero no se expresa ni en ratón ni en humanos [Eckhart et al., 2005].

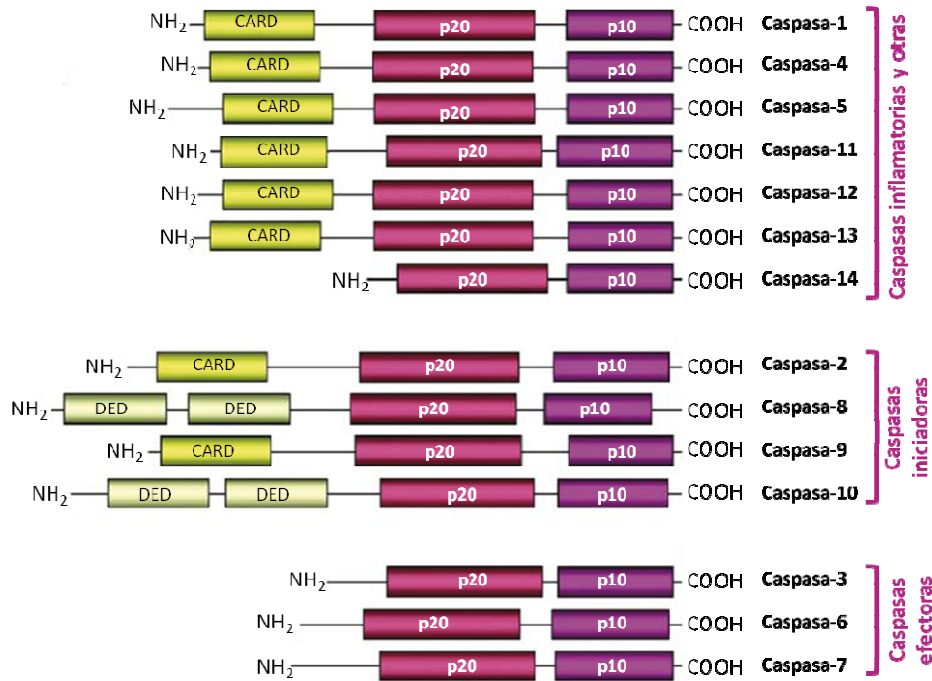
### 2.2. Clasificación estructural.

Pueden clasificarse en dos grupos atendiendo a su estructura:

#### 2.2.1. Caspasas de prodominio largo.

Estas caspasas poseen un prodominio largo N-terminal, que consta de uno o dos motivos pertenecientes a la superfamilia de dominios de muerte (DD, Death Domain): dos dominios DED (*Death Effector Domain*) en el caso de las caspasas -8 y -10 y un dominio CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) en el caso de las caspasas -1, -2, -4, -5, -9, -11, -12 y -13. Funcionalmente, este grupo de caspasas corresponden a las caspasas iniciadoras de la apoptosis, ya que se activan tras el estímulo apoptótico mediante su reclutamiento por moléculas adaptadoras a través de los dominios de muerte.





**Figura 3:** Clasificación funcional de las caspasas.

Excepto las caspasas -11 y -12 (ratón) y la -13 (bovina), todas las demás son humanas. CARD, dominio de reclutamiento y activación de caspasas; DED, dominio efector de muerte; p20, subunidad catalítica larga; p10, subunidad catalítica corta. Adaptada de [Rupinder et al., 2007].

Dentro de este grupo se distingue un subgrupo de proteasas, formado por las caspasas -1, -4, -5, -11, -12 y -13, denominadas caspasas inflamatorias, ya que, aunque se ha descrito su implicación en la inducción de apoptosis en determinados contextos, están principalmente implicadas en la maduración de citoquinas durante los procesos inflamatorios [Martinon et al., 2000] (figura 3).

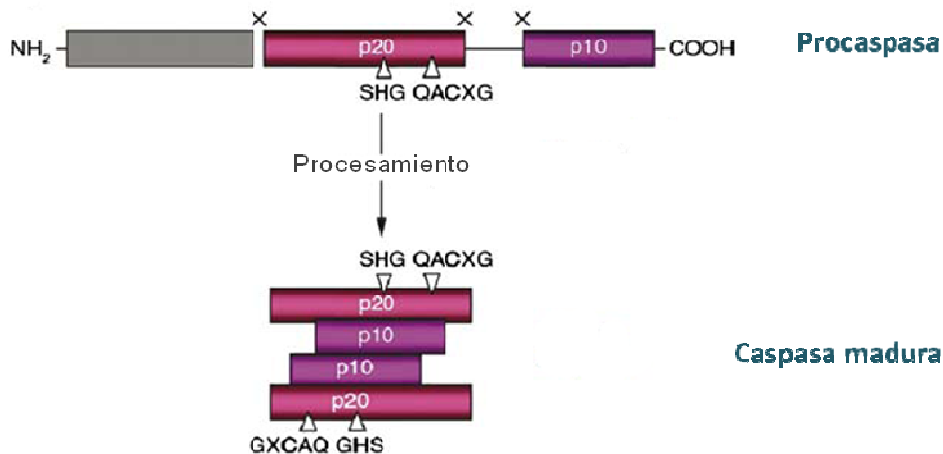
### 2.2.2. Caspasas de prodominio corto.

En este grupo están englobadas las caspasas -3, -6, -7 y -14, ya que poseen un prodominio N-terminal corto, sin ningún dominio de muerte. Engloba las caspasas efectoras de la apoptosis, las caspasas -3, -6 y -7, que son procesadas y activadas por las caspasas iniciadoras y llevan a cabo los últimos pasos de la apoptosis, proteolizando multitud de sustratos celulares. La caspasa-14, sin embargo, está implicada en la diferenciación de los queratinocitos.

### 2.3. Activación

Las caspasas, a parte del prodominio N-terminal, poseen un dominio largo (p20) y otro corto (p10), donde se encuentran repartidos los cuatro centros activos que determinan la especificidad de la caspasa por el sustrato (L1-L4). Según el modelo aceptado hasta ahora, para ser totalmente activadas las caspasas deben sufrir dos proteolisis, una inicial que separa la subunidad p10 seguida de otra que elimina el prodominio N-terminal de la subunidad p20 (revisado en [Shi, 2002]). Estas proteolisis son autocatalíticas o realizadas por otras caspasas sobre un residuo de aspártico específico. Sin embargo, muy recientemente se ha descrito en estudios 'in vitro' que la segunda proteolisis reduce parcialmente la actividad del dímero de caspasa-8, mucho más activo si sólo tiene lugar el primer corte [Hughes et al., 2009].

Tras multitud de estudios estructurales se ha demostrado que las caspasas maduras y activas forman heterotetrámeros, que contienen dos subunidades p20 y dos subunidades p10, es decir, un homodímero de dos caspasas activas, lo que les confiere dos sitios catalíticos, localizados en las subunidades p20 (figura 4).



**Figura 4:** Esquema general de activación de las caspasas.

El corte de las caspasas tiene lugar en residuos de cisteína junto a aspártico (marcados con una x en la procaspasa), lo cual libera el dominio N-terminal (en gris) y libera las subunidades p20 y p10, formándose el heterotetrámero (caspasa madura). Se muestran los residuos que conforman el centro activo catalítico (SHG QACXG). Adaptada de [Rupinder et al., 2007].

Existen distintos mecanismos de activación según se trate de caspasas iniciadoras o efectoras.

### 2.3.1. Activación por proximidad.

Este es el caso de las caspasas iniciadoras. En general, los zimógenos de estas caspasas se encuentran como monómeros inactivos que necesitan ser homodimerizados para ser activados. La dimerización es diferente según de qué caspasa se trate.

Las caspasas -8 y -10 son activadas por las citoquinas de la familia de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) cuando interaccionan con sus receptores (TNFR). Una vez formado este complejo, las caspasas -8 y -10 son reclutadas por las moléculas adaptadoras TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain*) en el caso de TNF $\alpha$ , o por FADD (*Fas-Associated Death Domain*) en el caso de Fas y TRAIL. La dimerización de estas caspasas promueve su activación mediante autocatálisis (figura 5A). Sin embargo, existen datos que demuestran que la simple interacción entre dos moléculas de caspasa-8 es suficiente para que tengan cierta actividad caspasa, aunque la autocatálisis posterior es necesaria para la activación total de la proteína [Degterev et al., 2003; Fuentes-Prior and Salvesen, 2004].

La caspasa-9 es la caspasa iniciadora de la apoptosis inducida por daño al DNA o cualquier otro tipo de estrés que implique la liberación del citocromo C mitocondrial al citosol. Su activación tiene lugar, en ausencia de proteólisis, en el complejo llamado apoptosoma, formado por siete repeticiones de las moléculas Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor-1*), citocromo C, dATP y caspasa-9, lo cual induce en caspasa-9 un cambio conformacional que expone su centro catalítico [Acehan et al., 2002; Yu et al., 2006] (figura 5B).

La caspasa-2 se activa por un estrés genotóxico de una forma parecida a las caspasas -8 y -10, mediante el reclutamiento en un complejo llamado PIDDosoma, formado por las proteínas PIDD (*p53-induced protein with a death domain*) y la proteína adaptadora RAIDD [Tinel and Tschopp, 2004].

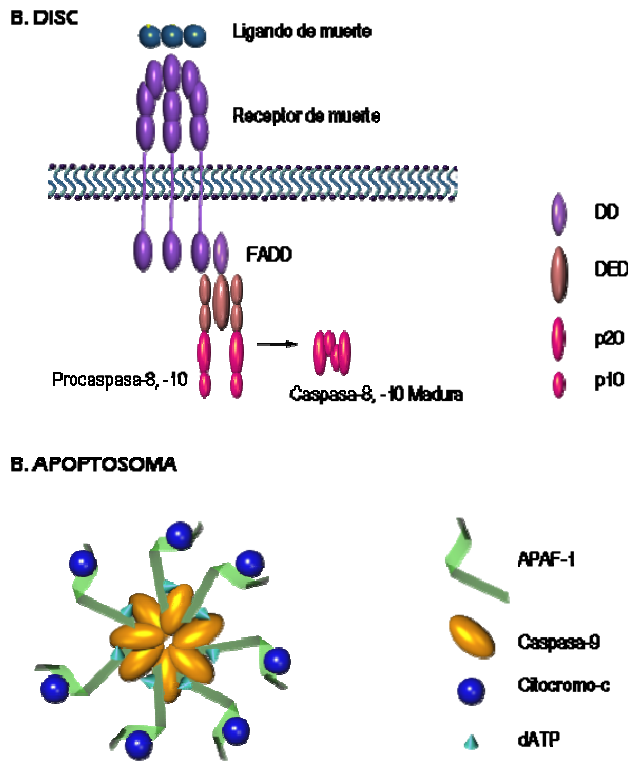


Figura 5: Complejos de activación de las caspasas -8, -9 y -10.

(A) Activación de las caspasas -8 y -9 en el DISC (Complejo inductor de muerte). FADD, Factor de asociación a dominio de muerte; DD, Dominio de muerte; DED, Dominio efector de muerte; p20 y p10, subunidades catalíticas larga y corta, respectivamente, de la caspasa-8.

(B) Activación de la caspasa-9 en el apoptosoma. APAF-1, Factor 1 activador de proteasas apoptóticas.

### 2.3.2. Proteólisis por otra caspasa.

Este es el mecanismo de activación de las caspasas efectoras -3, -6 y -7, las cuales se encuentran como homodímeros inactivos hasta que una caspasa iniciadora las procesa y activa. Son las responsables de la mayoría de proteólisis que tienen lugar en los últimos pasos de la apoptosis [Degterev et al., 2003; Fuentes-Prior and Salvesen, 2004].

## 2.4. Inhibidores

Dentro de la ruta apoptótica existen mecanismos de contención que regulan la ejecución de la muerte celular. Así, se han descrito diversas moléculas que inhiben las caspasas, contrarrestando su actividad apoptótica: IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) y FLIP (FLICE inhibitory protein).

### 2.4.1. IAPs

Los IAPs son una familia de proteínas inhibidoras de caspasas. Fueron originalmente descritas en baculovirus [Degterev et al., 2003; Fuentes-

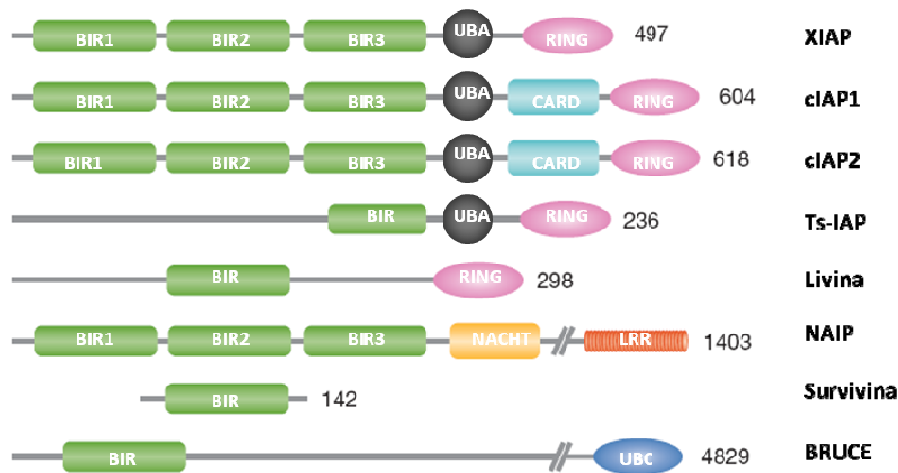
Prior and Salvesen, 2004] como inhibidoras de la apoptosis en la célula huésped infectada [Harvey et al., 1997].

En mamíferos la primera que se detectó fue NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*) durante el estudio de las causas genéticas de la atrofia muscular espinal (SMA, *Spinal Muscular Atrophy*) [Roy et al., 1995]. En total, en mamíferos se han descrito ocho proteínas dentro de esta familia: NAIP, XIAP (*X-linked IAP*), c-IAP1 (*cellular IAP1*), c-IAP2 (*cellular IAP2*) [Duckett et al., 1996; Liston et al., 1996; Rothe et al., 1995; Uren et al., 1996], Ts-IAP (*Testis-specific IAP*) [Lagace et al., 2001; Richter et al., 2001], BRUCE (*BIR-containing Ubiquitin Conjugating Enzyme*) [Hauser et al., 1998], Survivina [Ambrosini et al., 1997] y Livina [Kasof and Gomes, 2001; Lin et al., 2000; Vucic et al., 2000].

Se caracterizan por tener de 1 a 3 dominios BIR (*Baculoviral IAP repeat*), (figura 6) con estructura de dedos de zinc, responsables de la inhibición de las caspasas [Deveraux et al., 1997]. De este modo, XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 son responsables de la inhibición de las caspasas -3 y -7 por interacción a través de sus dominios BIR2 y de la inhibición de la caspasa-9 a través del dominio BIR3 [Deveraux et al., 1999; Deveraux et al., 1998; Takahashi et al., 1998].

Además, gran parte de los miembros de esta familia de proteínas tienen un dominio RING (*Really Interesting New Gene*) que les confiere actividad E3 ubiquitín ligasa. Esto les permite autoubiquitinarse y ubiquitinar sustratos, señalizando así para su degradación por el proteasoma [Yang et al., 2000].

c-IAP1 y c-IAP2 son las únicas proteínas de la familia que poseen un dominio CARD, aunque la función de este dominio aún se desconoce. Fueron caracterizados como proteínas de unión a TRAFs (*TNF Receptor-Associated Factors*) [Rothe et al., 1995]. Mediante su reclutamiento en el complejo de TNFR modulan la activación de NF- $\kappa$ B a través de la vía canónica y no canónica, modulando la poliubiquitinación de RIP1 y desestabilizando a NIK1 (*NF- $\kappa$ B Inducing Kinase 1*) respectivamente [Varfolomeev and Vucic, 2008].



**Figura 6:** Representación esquemática de los dominios estructurales de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis IAP.

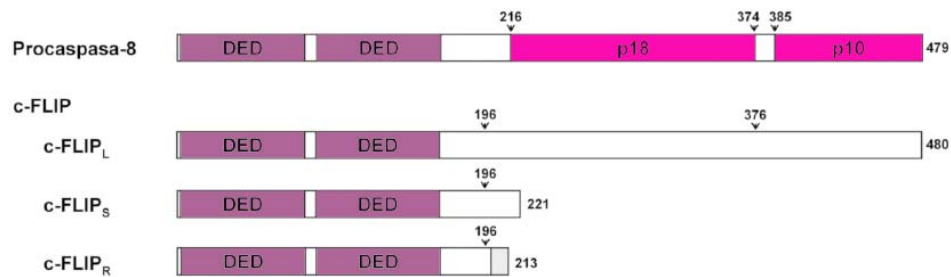
Todas las proteínas de esta familia poseen un dominio BIR (*Bacilovirus IAP Repeat*), responsable de su función inhibidora de caspasas. Además, algunas de ellas poseen un dominio RING (*Really Interesting New Gene*), con capacidad ubiquitin ligasa, responsable de su autoubiquitinación y ubiquitinación de sus sustratos. El dominio CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) les confiere capacidad de interacción proteína-proteína, pero aún no se ha descrito su función en estas proteínas. El dominio UBA (*Ubiquitin-Associated domain*) es responsable de su unión a cadenas de poliubiquitina. El dominio UBC (*Ubiquitin-Conjugation domain*) le confiere actividad conjugadora de ubiquitina E2 a BRUCE. NAIP contiene un dominio NATCH (*Domain found in NAIP*) de unión a nucleótidos y un dominio LRR (*Leucin-Rich Repeat*) sensor de patógenos. NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*), XIAP (*X-linked IAP*), c-IAP1 (*cellular IAP1*), c-IAP2 (*cellular IAP2*), Ts-IAP (*Testis-specific IAP*). Adaptada de [Eckelman et al., 2006].

Recientemente se ha descrito un dominio UBA (*Ubiquitin-Associated domain*) en XIAP, c-IAP1, c-IAP2 y Ts-IAP, responsable de la unión de estas proteínas a cadenas de poliubiquitina [Blankenship et al., 2009; Gyrd-Hansen et al., 2008].

#### 2.4.2. FLIP

FLIP se indentificó por primera vez en herpesvirus y en el poxvirus MCV (v-FLIP) [Bertin et al., 1997; Hu et al., 1997a; Thome et al., 1997] como proteína inhibidora de la señalización de apoptosis de caspasa-8 (también llamada FLICE). Hasta hoy se conocen seis isoformas virales de la proteína FLIP (v-FLIP) y tres isoformas humanas citosólicas (c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub>, y c-FLIP<sub>R</sub>) (figura 7), a pesar de que se han detectado 13 transcritos distintos

de mRNA que codifican c-FLIP [Djerbi et al., 2001; Golks et al., 2005; Hu et al., 1997b; Irmiler et al., 1997].



**Figura 7: Comparación entre los dominios de procaspasa-8 y FLIP.**

Todas las isoformas humanas de FLIP contienen dos dominios DED (Death Efector Domain), igual que las caspasas -8 y -10, lo que les confiere capacidad para ser reclutadas en el DISC (Death Inducing Signaling Complex), impidiendo la formación del homodímero de caspasa-8. FLIP<sub>L</sub> es la isoforma más parecida a la caspasa-8, pero carece de los residuos catalíticos. FLIP, FLICE Inhibitory Protein. Adaptada de [Yang, 2008].

Todas las isoformas de c-FLIP contienen dos dominios DED en el extremo N-terminal, igual que las caspasas -8 y -10, que les permite ser reclutados a través de FADD en el complejo de muerte de Fas y TRAIL, impidiendo de esta forma la formación del homodímero de caspasa-8. c-FLIP<sub>L</sub> es la isoforma estructuralmente más parecida a la caspasa-8, ya que además de los dos dominios DED, posee un dominio parecido a la caspasa en el extremo C-terminal, pero sin el residuo catalítico de cisteína propio de las caspasas, por lo que es catalíticamente inactivo [Rasper et al., 1998].

Aunque son proteínas antiapoptóticas, se ha descrito que la expresión de c-FLIP<sub>L</sub> a ciertos niveles no muy altos es capaz de activar a la caspasa-8 [Chang et al., 2002].

### 3. Rutas de apoptosis.

Existen dos rutas canónicas de activación de la apoptosis, la ruta intrínseca o mitocondrial y la ruta extrínseca o de los receptores de muerte (figura 8). Ambas rutas coinciden en la formación de un complejo inductor de muerte en el que se activa una caspasa iniciadora por proximidad.

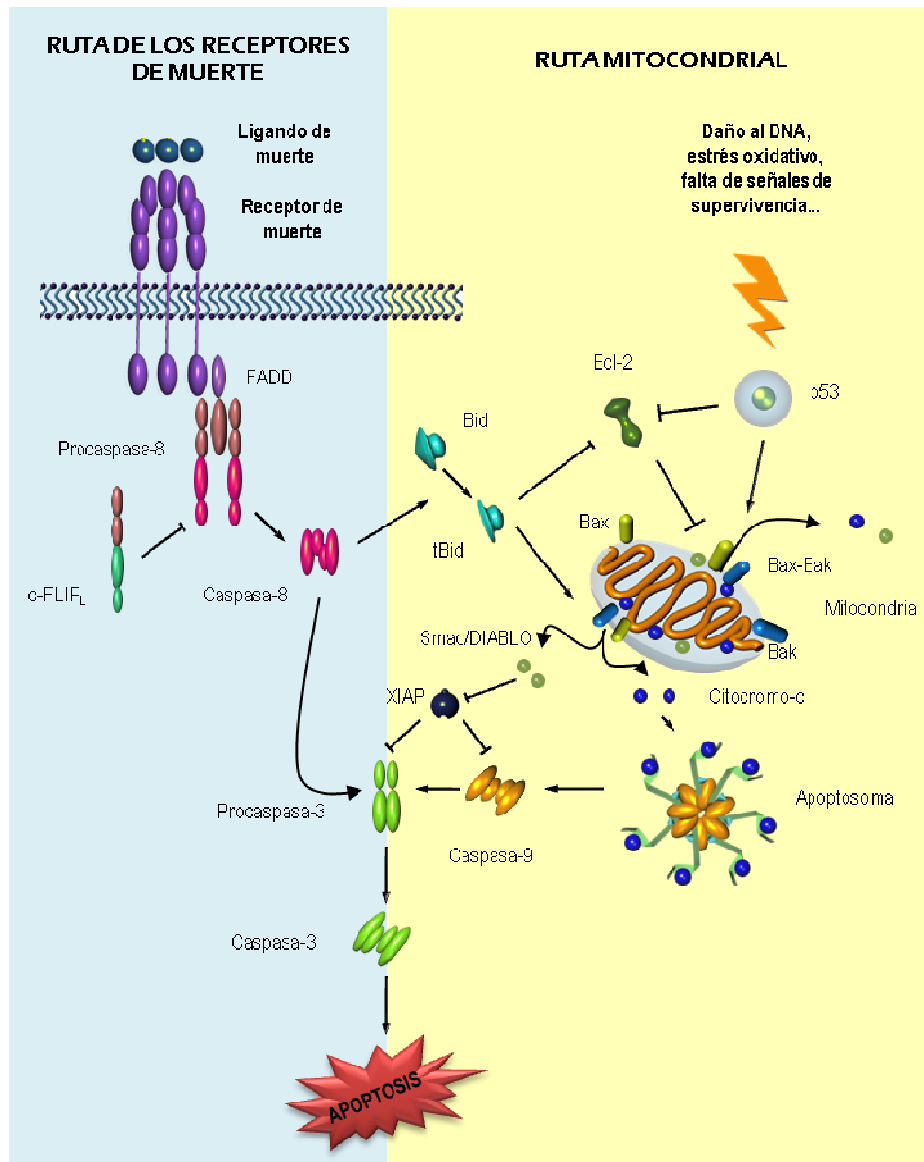


Figura 8: Esquema de las rutas intrínseca y extrínseca de apoptosis.



A parte de estas dos rutas, existen otros mecanismos de inducción de apoptosis, entre los que se encuentran la apoptosis activada por estrés del retículo endoplásmico (ER, *Endoplasmic Reticulum*) [Paschen and Mengesdorf, 2005], la activada por granzimas en células T y NK (*Natural Killer*) [Ko et al., 2007], y la apoptosis inducida por los cuerpos nucleares o PODs (*PML Oncogenic Domains*), los cuales contienen proteínas que pueden inducir apoptosis, como Par4, Daaz y Zip [Salomoni and Pandolfi, 2002].

El estrés en el ER puede deberse al estrés oxidativo, a una desregulación de la homeostasis del calcio en el lumen del ER o a la acumulación de proteínas mal plegadas, lo cual desencadena la UPR (*Unfolded Protein Response*). Se ha descrito que la UPR puede mediar apoptosis, aunque los mecanismos de esta inducción no se conocen totalmente [Paschen and Mengesdorf, 2005]. Por un lado, durante la UPR se induce CHOP, factor de transcripción capaz de inhibir la expresión de Bcl-2 [McCullough et al., 2001] e inducir TRAIL-R2 [Yamaguchi and Wang, 2004]. La UPR también puede inducir apoptosis mediante la activación de la caspasa-12 [Nakagawa et al., 2000], la cual puede activar la caspasa-9 independientemente del apoptosoma [Morishima et al., 2002]. Se ha observado que la caspasa-4 puede ocupar el papel de la caspasa-12 en la inducción de apoptosis por la UPR en células humanas [Hitomi et al., 2004]. Por último, la UPR puede inducir la activación de la vía mitocondrial de apoptosis a través del corte de Bid mediante la activación de la caspasa-2 [Upton et al., 2008].

Por lo tanto, recientemente se ha propuesto esta vía como la tercera vía de activación de la apoptosis [Burke, 2008], aunque son necesarios más estudios para describir totalmente la ruta o rutas implicadas en esta vía.

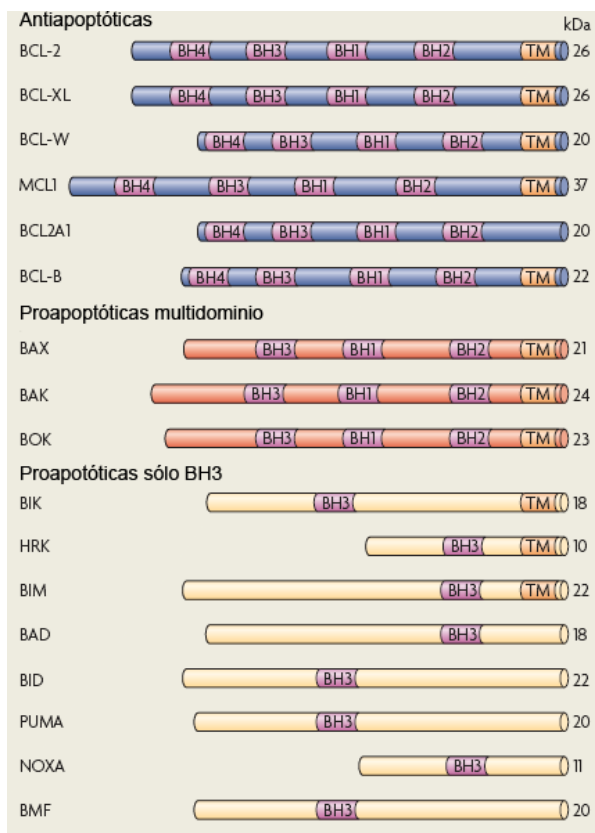
### 3.1. Ruta intrínseca.

La vía intrínseca o mitocondrial puede activarse debido a la ausencia de señalización de factores de crecimiento, a estrés oxidativo o a un daño en el DNA provocado por toxinas o radiación [Fulda and Debatin, 2006]. Durante esta ruta tiene lugar una permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) que permite la salida al citoplasma de ciertas moléculas

almacenadas en el espacio intermembranal, las cuales inducen la activación de las caspasas iniciadoras y favorecen la activación de las caspasas efectoras.

### 3.1.1. Familia Bcl-2.

La vía intrínseca está controlada por la familia de proteínas Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*), la cual está formada por miembros antiapoptóticos (como Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1 y Bcl-B) y proapoptóticos (como Bid, Bim, Noxa, Puma, Bad, Bax y Bak). Se caracterizan por contener, al menos, un dominio BH (*Bcl-2 Homology*), necesario para la interacción heterodimérica entre miembros de esta familia [Chittenden et al., 1995].



**Figura 9:** Clasificación estructural y funcional de las proteínas de la familia Bcl-2.

TM, Dominio Transmembrana; BH, *Bcl-2 Homology*. Adaptado de [Taylor et al., 2008]

La gran parte de los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 posee cuatro dominios BH (BH1-4) (figura 9). Los dominios BH1-3 son los responsables de formar una cavidad hidrofóbica que interacciona con el

dominio BH3 de otra proteína de la familia Bcl-2, mientras que el dominio BH4 participa en la estabilización de dicha estructura [Petros et al., 2001].

Los miembros proapoptóticos pueden dividirse en dos subgrupos: los multidominio (BH1-3) y los sólo BH3 (BH3-only) (figura 9).

Entre los miembros proapoptóticos multidominios se encuentran Bax y Bak, cuya oligomerización en la membrana externa mitocondrial tras un estímulo apoptótico formará un poro por el que saldrán moléculas desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol [Wang, 2001]. Mientras que Bak se encuentra siempre insertada en la membrana mitocondrial en una conformación inactiva [Wei et al., 2000], Bax se encuentra mayoritariamente en el citosol, siendo translocada a la mitocondria durante su proceso de activación [Hsu et al., 1997; Wolter et al., 1997]. Para que Bax se active es necesario que sufra un cambio conformacional que expone al exterior su fracción N-terminal, escondida en la conformación inactiva [Yethon et al., 2003].

Las proteínas sólo BH3, como su mismo nombre indica, sólo poseen el dominio BH3. Pueden ser inducidas por numerosos estímulos, ya sea mediante regulación transcripcional o post-traduccional. Por ejemplo, la transcripción de Puma y Noxa es activada por p53 tras un daño al DNA [Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000]; Bim se libera de su reclutamiento en el citoesqueleto tras ciertos estímulos de muerte [Puthalakath et al., 1999]; Bid se procesa y activa por la caspasa-8 tras estímulos externos de muerte [Li et al., 1998] y Bad se activa por defosforilación [Zha et al., 1996].

Existen dos modelos de activación de las proteínas Bax y Bak: directo e indirecto. El modelo indirecto implica que las proteínas sólo BH3 interaccionan con las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, liberando así a Bax y Bak de su interacción con ellas, permitiendo su activación, traslocación de Bax a la mitocondria y oligomerización con Bak [Willis et al., 2007].

El modelo directo supone una subclasificación de las proteínas sólo BH3 en sensibilizadoras y activadoras. Las proteínas sensibilizadoras (como Noxa, Puma y Bad) interaccionan con las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, inhibiéndolas e impidiendo su interacción con Bax y Bak, mientras que las proteínas activadoras (Bid y Bim), además de

interaccionar con las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, interaccionan con Bax y Bak en la membrana externa mitocondrial, provocando el cambio conformacional necesario para su activación [Letai et al., 2002; Lovell et al., 2008].

### 3.1.2. Permeabilización de la membrana mitocondrial.

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa provocada por la formación del poro dependiente de Bax y Bak libera al citosol moléculas como el citocromo C, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, implicadas en la activación de la caspasa-9, iniciadora de la cascada apoptótica intrínseca, o AIF y DNAsaG, las cuales son capaces de inducir apoptosis independiente de caspasas [Green and Evan, 2002; Wang, 2001].

El citocromo C liberado al citosol se une a la proteína APAF-1, permitiendo su asociación con una molécula de dATP. Esto permite su oligomerización, formándose así el Apoptosoma, un complejo inductor de muerte en el que se reclutará y activará la caspasa-9 por proximidad, mediante un cambio conformacional. La caspasa-9 activada procesará a las caspasas efectoras, como por ejemplo la caspasa-3, las cuales serán las responsables de la mayor parte de las proteólisis que tienen lugar durante la ejecución de la apoptosis.

Smac/DIABLO es una proteína mitocondrial proapoptótica antagonista de las proteínas IAPs, como XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 [Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000]. Por lo tanto, al liberarse al citoplasma, las moléculas Smac/DIABLO inhiben a las IAPs, impidiendo que éstas se unan a las caspasas -3, -7 y -9 y bloqueen su activación. Además, se han observado funciones proapoptóticas de Smac/DIABLO independientes de IAPs y caspasas, aunque el mecanismo aún no se ha descrito [Roberts et al., 2001].

HtrA2/Omi es una serín proteasa que inhibe a las IAPs de una manera análoga a Smac/DIABLO [Hegde et al., 2002; Suzuki et al., 2001], aunque también puede inducir apoptosis de una forma independiente de caspasas, debido a su función serín proteasa [Verhagen et al., 2002].

AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) es una flavoproteína localizada en el espacio intermembrana mitocondrial que, tras un estímulo proapoptótico,

se trasloca a la membrana nuclear, provocando la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina sin necesidad de la activación de caspasas [Susin et al., 2000; Susin et al., 1999].

La DNAsaG es una endonucleasa que, al ser liberada de la mitocondria, se trasloca al núcleo, donde está involucrada en la fragmentación del DNA independientemente de la activación de caspasas [Li et al., 2001].

### 3.2. Ruta extrínseca.

La ruta extrínseca o de los receptores de muerte, como su propio nombre indica, es la ruta apoptótica activada por los receptores de muerte, un subgrupo de proteínas de membrana proapoptóticas pertenecientes a la superfamilia de receptores de TNF (*TNFRs, Tumor Necrosis Factor Receptors*); una familia de receptores relacionados con fenómenos de proliferación, diferenciación y apoptosis [Bhardwaj and Aggarwal, 2003].

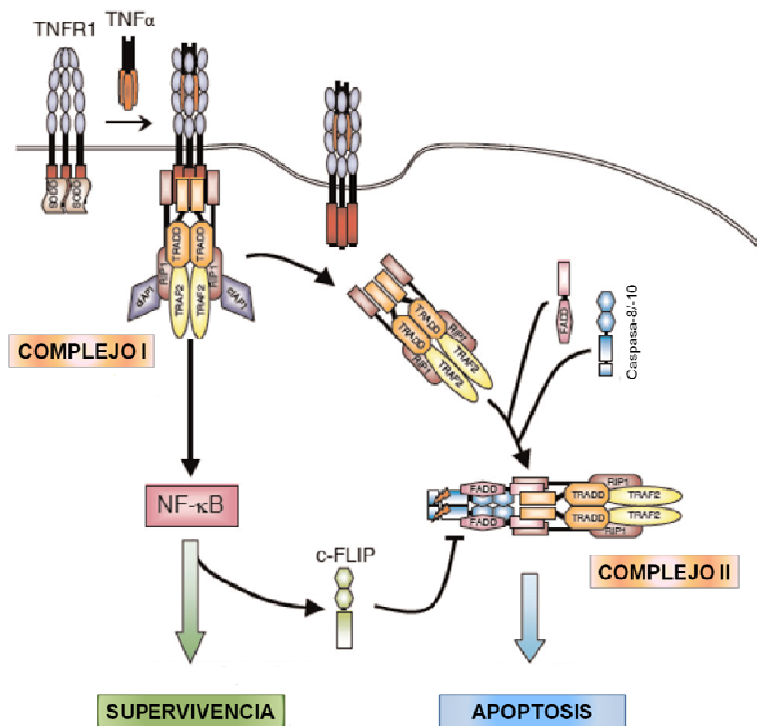
Los receptores de muerte son proteínas transmembrana tipo-I, es decir, con un solo dominio transmembrana, con el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular. El extremo N-terminal posee de dos a cuatro dominios extracelulares ricos en cisteínas (CRD, *Cystein-Rich Domain*), implicados en la unión con su ligando. En el extremo intracelular poseen un dominio de muerte (DD), de unos 80 aminoácidos, esencial en la señalización de apoptosis, que sirve para reclutar proteínas adaptadoras como TRADD o FADD [Ashkenazi and Dixit, 1998].

Los receptores se activan por homotrimerización [Banner et al., 1993], lo cual viene dado por la interacción con sus ligandos específicos de la superfamilia de TNF, que también forman heterotrímeros. Estos ligandos son proteínas de membrana tipo-II, es decir, que tienen el extremo C-terminal en el espacio extracelular. Este extremo posee un dominio de homología a TNF (THD, *TNF-homology Domain*) por el que se une a su receptor [Bodmer et al., 2002]. Se encuentran, principalmente, anclados a la membrana celular de células inmunitarias o secretados en la matriz extracelular.

Se han descrito numerosos receptores de muerte, siendo los más estudiados los receptores de TNF $\alpha$ , de FasL y de TRAIL.

### 3.2.1. Receptores de TNF $\alpha$ .

El factor de necrosis tumoral alfa, TNF $\alpha$ , es una proteína homotrimérica de unos 157 aminoácidos. Se sintetiza como una proteína transmembrana y se libera en su forma soluble por medio de una proteasa dependiente de zinc, que también se encuentra anclada a la membrana, denominada TNF $\alpha$  convertasa (TACE, también denominada ADAM17) [Black et al., 1997].



**Figura 10:** Señalización de TNF $\alpha$ .

La unión del TNF $\alpha$  al receptor TNFR1 resulta en la formación de un primer complejo (complejo I) en la superficie celular que induce la expresión de NF- $\kappa$ B, el cual activa la transcripción de genes relacionados con la supervivencia celular; y un segundo complejo intracitoplásmico capaz de activar la ruta extrínseca de apoptosis. TNFR, *TNF Receptor*; SODD, *Silencer of Death Domains*; TRADD, *TNF Receptor-Associated Death Domain*; RIP1, *Receptor-Interacting Protein kinase 1*; cIAP1, *cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1*; TRAF2, *TNF Receptor-Associated Factor 2*; FADD, *Fas-Associated Death Domain*. Adaptada de [Kimberley et al., 2007].

Existen dos tipos de receptores para TNF $\alpha$ , el receptor de tipo 1 (TNFR1) y el receptor de tipo 2 (TNFR2), los cuales sólo comparten un 28% de la homología, principalmente en la porción extracelular. De hecho, la principal diferencia entre estos dos receptores es que el TNFR2 no presenta el DD, aunque sigue siendo capaz de iniciar la muerte celular estimulando al TNFR1 [Vandenabeele et al., 1995]. El TNFR1 se une preferentemente al TNF soluble mientras que el TNFR2 tiene una mayor afinidad hacia el TNF de membrana. Los dos receptores pueden activar las vías de transducción de señales de NF $\kappa$ B o de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) [Campbell et al., 2003].

La distribución de estos receptores depende del tipo celular. Así, mientras que el TNFR1 se expresa constitutivamente en la mayoría de tipos celulares, la expresión del TNFR2 está más restringida a algunos tipos celulares (principalmente células del sistema inmune).

La interacción entre el TNF $\alpha$  y el TNFR1 provoca la trimerización del receptor y la liberación de la proteína inhibidora SODD (*Silencer of Death Domains*) del dominio intracelular de TNFR1 [Smith et al., 1994]. Esto permite el reclutamiento de la proteína adaptadora TRADD (*TNFR-Associated Death Domain*), que sirve de plataforma a otras proteínas adaptadoras.

En el año 2003, se propuso un modelo unificado que integraba las distintas vías de señalización conocidas de TNFR1, el cual proponía la formación de dos complejos distintos [Micheau and Tschopp, 2003] (figura 10). El complejo I se formaría inmediatamente después de la estimulación del TNFR1, que comprendería la unión de TRADD a los dominios de muerte (DD) del receptor, seguida de RIP1 (*Receptor-Interacting Protein kinase 1*), que también contiene un DD [Ashkenazi and Dixit, 1998]. Este complejo de señalización se requiere para la unión de TRAF2/5 (*TNFR-Associated Factor 2/5*) y de c-IAP1. El ensamblaje de este complejo se daría en los *lipid rafts* [Legler et al., 2003] y activaría la señalización por NF- $\kappa$ B mediante el reclutamiento del complejo IKK [Hsu et al., 1996] y la activación de JNK por la vía de TRAF2 [Chen and Goeddel, 2002; Liu et al., 1996]. Este proceso da lugar a la supervivencia de la célula [Baud and Karin, 2001; Varfolomeev and Ashkenazi, 2004;

Wajant et al., 2003]. La ruta de activación de NF- $\kappa$ B por TNF se describe con más detalle en el apartado 6.3.3.

Sin embargo, la ruta de señalización proapoptótica de TNF $\alpha$  requiere la formación del segundo complejo. Este complejo II, encargado de promover apoptosis, se forma en el citoplasma por disociación de TRADD, TRAF2 y RIP1 del receptor TNFR1. A los DD libres de este complejo se asocia la proteína adaptadora FADD (*Fas-associated death domain*), que recluta a la procaspasa-8 y procaspasa-10, las cuales serán activadas por proximidad en este complejo II.

Si la activación de NF- $\kappa$ B por el complejo I es lo suficientemente elevada, el aumento en la expresión de FLIP<sub>L</sub>, inducido por NF- $\kappa$ B, inhibirá la activación de las caspasas -8 y -10 en el segundo complejo [Micheau and Tschopp, 2003]. Así, la supervivencia o muerte celular, tras la estimulación de TNFR1, vendrá determinada por el balance entre las rutas activadas por cada uno de los dos complejos.

Recientemente se ha descrito la formación de un complejo II alternativo, que tiene lugar en ausencia de c-IAPs. En este caso RIP1 se desubiquitina y se libera del receptor, formando un complejo con FADD y caspasa-8. Este complejo no se inhibe por FLIP, por lo que causa apoptosis incluso cuando existe activación de NF- $\kappa$ B [Wang et al., 2008].

TNF fue la primera citoquina utilizada en humanos en la terapia contra el cáncer. Sin embargo, debido a que sus diferentes rutas de señalización pueden llevar tanto a la apoptosis como a la supervivencia de la célula, además de tener efectos inflamatorios, su papel en el tratamiento antitumoral es controvertido [Bertazza and Mocellin, 2008].

### 3.2.2. Receptores de FasL

El receptor de FasL (Fas Ligando), conocido como Fas, CD95 o APO-1, puede encontrarse anclado a membrana, como proteína de membrana tipo I, con dominios ricos en cisteínas (CRDs) en su región extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de muerte (DD), o como proteína soluble, generada por splicing alternativo, que carece de dominio de muerte, por lo que tiene un papel antiapoptótico [Cheng et al., 1994].



La unión de FasL a su receptor de membrana produce una rápida formación del complejo inductor de muerte (DISC, *Death Inducing Signaling Complex*) a través de los dominios de muerte [Medema et al., 1997]. Este complejo está formado por Fas, la proteína adaptadora FADD y la caspasa-8 o -10. FADD, que posee un dominio DD y un dominio efector de muerte (DED) se une al receptor a través de una interacción DD-DD y recluta a la procaspasa-8 o -10 a través de una interacción DED-DED [Ashkenazi and Dixit, 1998]. Una vez que se agregan dos o más moléculas de procaspasa-8, ésta se activa por proximidad, lo cual induce su autoproteólisis. Esta activación puede inhibirse por unión de FLIP al complejo, el cual, como se ha descrito anteriormente, inhibe la activación de las caspasas -8 y -10 impidiendo su homodimerización y posterior procesamiento.

Aunque la principal función de Fas es inducir muerte celular, también transmite señales de supervivencia y proliferación dependiendo del contexto [Siegel et al., 2000]. Este fenómeno está relacionado con la activación de NF- $\kappa$ B, mediada por FADD, caspasa-8 y RIP1 [Kreuz et al., 2004]. Además, Fas induce la activación de JNK, aunque la función de JNK en la apoptosis o supervivencia inducida por Fas aún no está clara, ya que FasL es capaz de inducir proliferación e invasividad en células cancerígenas mediante la activación de NF- $\kappa$ B y las vías MAPK (ERK1/2, p38, JNK1/2) [Barnhart et al., 2004]. Esta dualidad ha hecho que el uso de FasL en la terapia antitumoral sea controvertido [Peter et al., 2007].

Recientemente se ha descrito, mediante un estudio 'in vitro', que la inducción de apoptosis o supervivencia por parte de la activación de Fas, viene dada por dos pasos de activación de la caspasa-8 en el DISC [Hughes et al., 2009]. En este trabajo describen cómo la caspasa-8 se recluta en el DISC en un primer paso, activándose levemente por proximidad. Si se autoproteoliza, se activa totalmente, iniciando así los procesos implicados en la apoptosis. Sin embargo, si no se autoproteoliza, la caspasa-8 se mantiene en una forma poco activa anclada al receptor y señala para supervivencia.

### 3.2.3. *Receptores de TRAIL.*

TRAIL fue descubierto en 1995 y 1996 por dos grupos independientes como una proteína que inducía apoptosis preferentemente en células

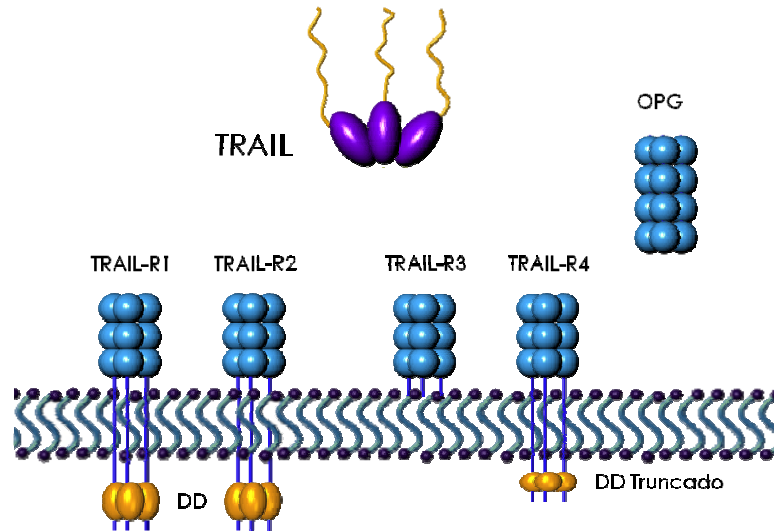
tumorales. Se le denominó ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL, *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) y Apo2L, debido a su homología con otros miembros de la familia de TNF, sobre todo a FasL/Apo1L [Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995].

En humanos, TRAIL es una proteína transmembrana tipo II de 33 KDa con 281 aminoácidos. Consta de un dominio N-terminal intracitoplásmico pequeño, y un dominio C-terminal extracelular largo de unión al receptor. Su dominio extracelular se puede cortar proteolíticamente, liberándose una molécula soluble de 20 KDa. Tanto la forma transmembrana como la soluble son capaces de inducir apoptosis tras su unión con el receptor [Kelley and Ashkenazi, 2004; Mariani and Krammer, 1998]. Mediante estudios de cristalografía, se ha determinado que TRAIL es una molécula homotrimérica estabilizada por un átomo de zinc interno que coordina tres residuos de cisteína, cada uno de ellos en la posición 230 de cada subunidad del ligando [Hymowitz et al., 2000].

Se expresa en la mayor parte de las células del sistema inmune donde juega un papel en el mantenimiento de la homeostasis y eliminación de células transformadas viral y oncogénicamente [Hayakawa et al., 2004; Janssen et al., 2005; Smyth et al., 2003].

En humanos se han descrito cinco receptores de TRAIL: TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) y OPG (Osteoprotegerina) (figura 11).

Los receptores TRAIL-R1 [Pan et al., 1997b] y TRAIL-R2 [Pan et al., 1997a; Screaton et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997; Wu et al., 1997] son los receptores proapoptóticos de TRAIL. Son proteínas transmembrana tipo I, con el extremo N-terminal extracelular rico en cisteínas y un dominio de muerte en el extremo C-terminal intracitoplásmico, el cual les confiere la capacidad de reclutar las moléculas implicadas en la formación del complejo inductor de muerte, DISC. El estrés del retículo endoplásmico, a través del factor de transcripción CHOP [Yamaguchi and Wang, 2004], o el daño al DNA, a través de p53 [Wu et al., 1997], pueden inducir la expresión de TRAIL-R2, favoreciendo así la señalización de TRAIL.



**Figura 11:** Receptores de TRAIL.

Los receptores proapoptóticos TRAIL-R1 y TRAIL-R2, también conocidos como DR4 y DR5, poseen un dominio de muerte (DD) en la región intracitoplasmática. Los receptores señuelo o decoy son TRAIL-R3 y TRAIL-R4, conocidos también como DcR1 y DcR2, no poseen DD (TRAIL-R3) o poseen un DD truncado, por lo que no señalizan apoptosis. La osteoprotegerina (OPG) es un receptor soluble de TRAIL.

Los receptores TRAIL-R3 y TRAIL-R4, llamados receptores señuelo o 'decoy' no traducen su unión a ligando en la activación de la apoptosis. Esto se debe a que, aunque poseen un extremo N-terminal homólogo a TRAIL-R1 y TRAIL-R2, capaz de unirse a TRAIL, carecen de dominio de muerte (en el caso de TRAIL-R3) o tienen un dominio de muerte truncado (en el caso de TRAIL-R4), incapaz de señalizar para apoptosis.

Se ha observado que la sobreexpresión de estos receptores puede inhibir la apoptosis inducida por TRAIL mediante el secuestro del ligando, pero aún se desconoce si los niveles basales de estos receptores tienen esta misma función [Kimberley and Screaton, 2004].

TRAIL-R4, por otro lado, es capaz de activar NF- $\kappa$ B, induciendo una respuesta antiapoptótica [Degli-Esposti et al., 1997]. Además se ha observado que la sobreexpresión de TRAIL-R4 puede inducir la formación de heterotrímeros TRAIL-R2/TRAIL-R4 no funcionales de forma independiente de ligando [Clancy et al., 2005] o inducidos por TRAIL [Merino et al., 2006].

El último receptor de TRAIL es la osteoprotegerina (OPG) [Emery et al., 1998], una proteína soluble capaz de unirse al ligando del receptor activador de NF- $\kappa$ B (RANKL, *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand*). Es el único receptor de TRAIL soluble, teniendo por lo tanto capacidad de secuestrarlo, inhibiendo la apoptosis. Sin embargo, es el receptor de TRAIL que se une con menos afinidad a su ligando, por lo que su función con respecto a TRAIL no está muy clara, aunque juega un papel antiinflamatorio en la biología vascular [Corallini et al., 2008].

La señalización proapoptótica de TRAIL a través de los receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2 ha sido extensamente estudiada. La unión de TRAIL a estos receptores induce su trimerización y la formación del complejo inductor de muerte, DISC, similar al que se forma tras la interacción Fas/FasL. Este complejo está formado por la proteína adaptadora FADD, que interacciona con los receptores de TRAIL a través de los dominios de muerte, mediante una interacción DD-DD. FADD es la responsable del reclutamiento en el DISC de las procaspasas -8 o -10 a través de su dominio DED. Las caspasas iniciadoras -8 y -10 son activadas por proximidad en el DISC. La activación total de estas caspasas resulta de su autoprosesamiento en este complejo.

Esta activación puede ser inhibida por c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub> y c-FLIP<sub>R</sub>, que, como se ha descrito previamente, posee dos dominios DED por los que se une a FADD impidiendo la homodimerización y activación de la caspasa-8 [Rasper et al., 1998].

Además de la inducción de apoptosis, TRAIL puede señalar para supervivencia y proliferación a través de la activación de la NF- $\kappa$ B, JNK y Akt [Kimberley and Screaton, 2004]. Así, se ha descrito la formación de un segundo complejo, análogo al descrito en la ruta del TNF $\alpha$  [Jin and El-Deiry, 2006; Varfolomeev et al., 2005] (figura 12). Este complejo citoplásmico secundario conserva los componentes del DISC, FADD y caspasa-8 y -10, pero recluta otras proteínas como TRADD, RIP1, TRAF2 y Nemo/IKK $\gamma$ , lo que conlleva la activación de JNK, implicado en la expresión de genes de proliferación a través del factor c-Jun (AP-1), y a la liberación de NF- $\kappa$ B a través de IKK. Así NF- $\kappa$ B queda libre para traslocarse al núcleo y ejercer su función, regulando la transcripción de numerosos

genes antiapoptóticos como c-FLIP, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 e IAPs [Kreuz et al., 2001].

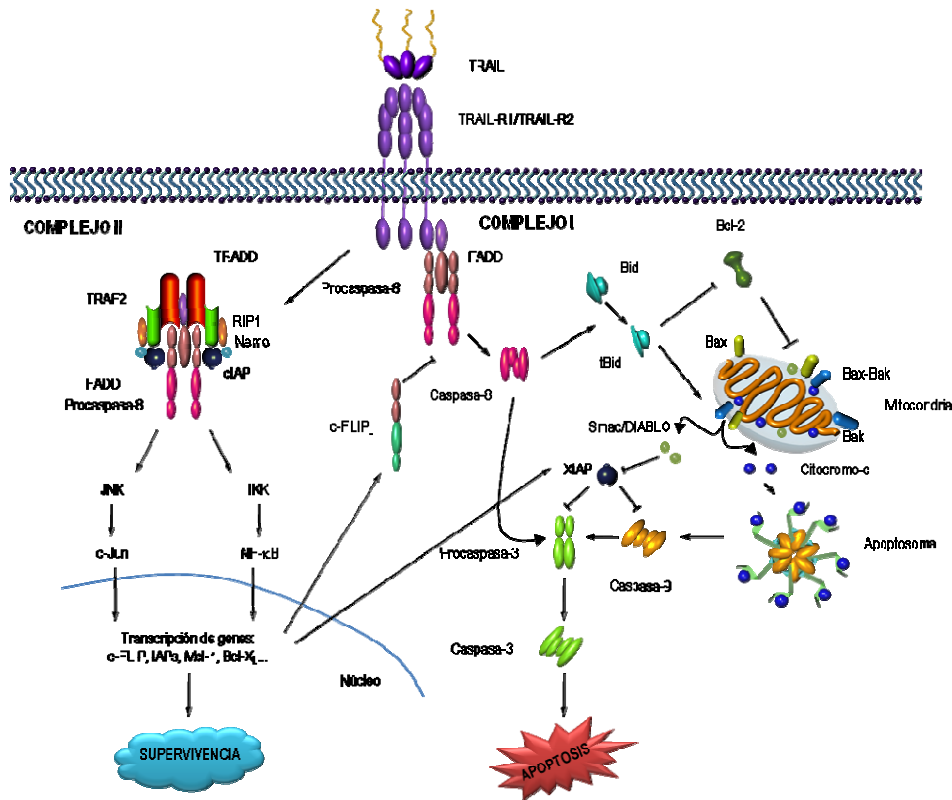


Figura 12: Señalización de apoptosis y supervivencia inducida por TRAIL.

Además, TRAIL puede activar la ruta PI3K (phosphoinositol-3-kinase)/Akt, implicada en metabolismo de nutrientes, crecimiento celular, apoptosis y supervivencia [Secchiero et al., 2003]. La activación de la ruta PI3K/Akt puede activar a la diana de rapamicina (mTOR), que, entre otras muchas cosas, puede aumentar la traducción de cFLIP [Panner et al., 2005].

El balance entre las rutas de apoptosis y supervivencia inducidas por TRAIL marcará el destino de la célula diana. Así, en células cancerígenas que tienen la vía de apoptosis inhibida, TRAIL puede promover proliferación e invasividad a través de la vía NF-κB [Ishimura et al., 2006; Trauzold et al., 2006]. Este hecho ha de tenerse en cuenta durante el

desarrollo de terapias antitumorales basadas en la activación de los receptores de TRAIL.

### *3.3. Interconexión entre ambas rutas.*

La activación de la caspasa-8 a través de la estimulación de cualquiera de los receptores de muerte descritos anteriormente puede activar directamente a las caspasas efectoras -3, -6 y -7, responsables de proteolizar la mayor parte de los sustratos durante la apoptosis. Si la activación de las caspasas efectoras por la caspasa-8 es suficiente para que tenga lugar la muerte celular, la célula se denomina de tipo I, ya que la ruta extrínseca es suficiente para que tenga lugar la apoptosis. Si el reclutamiento de complejos de muerte en la superficie celular no es suficiente, o los niveles de IAPs son elevados, el tipo celular se denomina tipo II, y necesita de la activación de la ruta intrínseca, con la consiguiente liberación de Smac/DIABLO, para que tenga lugar la apoptosis.

La caspasa-8 activada por la vía extrínseca es capaz de activar la ruta mitocondrial mediante el procesamiento de la proteína sólo BH3 proapoptótica Bid, de la familia Bcl-2 [Li et al., 1998]. Una vez procesada, tBid inhibe a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 uniéndose a ellas y permite así la oligomerización de Bax y Bak. Además, tBid también favorece esta unión anclándose a la membrana mitocondrial externa [Lovell et al., 2008]. La oligomerización de Bax y Bak induce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, activándose así la ruta intrínseca, previamente descrita.

La activación de la caspasa-3 por esta ruta es capaz de activar a la caspasa-8, produciendo así una retroalimentación de la ruta, incrementando su señalización de muerte celular [Yang et al., 2006].

### *4. TRAIL en la terapia antitumoral.*

Una de las características de las células cancerígenas es su habilidad para evadir la activación de los mecanismos que inducen apoptosis [Hanahan and Weinberg, 2000]. De este modo, muchas de las terapias antitumorales convencionales se basan en la inducción de apoptosis, como es el caso de la quimioterapia y la radioterapia [Kaufmann and Vaux, 2003; Mollinedo and Gajate, 2003]. Sin embargo, estas terapias,

aparte de ser parcialmente tóxicas para el resto de células del organismo, no siempre son capaces de erradicar las células tumorales. Esto es debido, precisamente, a la capacidad adquirida de las células tumorales de bloquear los mecanismos proapoptóticos.

Así, uno de los genes más frecuentemente mutado en cáncer es p53. Dicha mutación les confiere resistencia frente a las terapias convencionales [Hollstein et al., 1994; Igney and Krammer, 2002; Lee and Bernstein, 1995], que normalmente basan su eficacia en la activación de la vía intrínseca de apoptosis a través de un daño al DNA [Pommier et al., 2004].

Por lo tanto, la activación de la vía extrínseca en estas células podría mejorar los resultados de las terapias antitumorales. En concreto, se ha observado que la activación de los receptores de TRAIL proapoptóticos mediante TRAIL recombinante humano soluble o mediante anticuerpos agonistas selectivos para TRAIL-R2 y TRAIL-R1, puede inducir apoptosis en células tumorales con una toxicidad mínima sobre las células normales [Ashkenazi et al., 1999; Chuntharapai et al., 2001; Ichikawa et al., 2001; Lawrence et al., 2001]. Una posible explicación sería la mayor expresión de receptores de TRAIL proapoptóticos en células tumorales. Sin embargo esta teoría es muy discutida, ya que estos receptores proapoptóticos no se sobreexpresan en todas las células tumorales analizadas [Daniels et al., 2005].

En principio, los anticuerpos frente a los receptores proapoptóticos de TRAIL son más efectivos que el TRAIL recombinante, debido a que tienen una vida media más larga en el organismo y a que no pueden ser inhibidos por receptores señuelo. El desarrollo de más anticuerpos frente a TRAIL-R2 que frente a TRAIL-R1 se debe a las observaciones iniciales de que TRAIL-R2 se expresa más en células tumorales que TRAIL-R1 [Ashkenazi, 2002], y que su señalización parece ser más potente que la inducida por TRAIL-R1 [Kelley et al., 2005]. Sin embargo, no sólo influyen los niveles de expresión de ambos receptores, sino cuál de ellos es funcionalmente competente en cada tipo celular. Así, en líneas celulares de cáncer de mama y colon, aunque ambos se sobreexpresan por igual, TRAIL-R2 es el responsable de la señalización apoptótica [Kelley et al., 2005], mientras que en leucemia linfocítica crónica (CLL, *Chronic*

*Lymphocytic Leukaemia*), la señalización de TRAIL-R1 es la que induce mayores niveles de apoptosis [MacFarlane et al., 2005].

En estudios preclínicos sobre heteroinjertos en ratón se ha observado que anticuerpos frente a TRAIL-R2 pueden no sólo inducir apoptosis en las células tumorales, sino inducir el desarrollo de linfocitos T citotóxicos (CTLs, *Cytotoxic T Lymphocytes*) específicos del tumor debido a su acumulación en las membranas de las células tumorales resistentes a TRAIL [Clynes et al., 1998; Clynes et al., 2000; Takeda et al., 2004b]. Por lo tanto, el uso de los receptores de TRAIL como diana en la terapia anticancerígena no sólo implica la inducción directa de apoptosis, sino la activación de una respuesta inmune frente al tumor.

Sin embargo, debido a la existencia de numerosas células tumorales resistentes a TRAIL, el uso de TRAIL recombinante o anticuerpos frente a los receptores de TRAIL, en combinación con otros agentes anticancerígenos, es mucho más efectivo como terapia antitumoral.

Así, tratamientos quimio o radioterapéuticos, terapias anticancerígenas comunes, pueden sinergizar con la señalización de los receptores de TRAIL, induciendo apoptosis en células tumorales, aunque los mecanismos de sensibilización a TRAIL aún no están totalmente definidos. Así, algunas de estas terapias antitumorales pueden sensibilizar a la apoptosis inducida por TRAIL mediante un aumento en la expresión de los receptores TRAIL-R2 [Shankar et al., 2005; Shankar et al., 2004], la regulación negativa de los niveles de FLIP [El-Zawahry et al., 2005] o la localización de los receptores de TRAIL en los *lipid rafts* [Dumitru et al., 2007].

Sin embargo, la combinación de estas terapias tiene ciertos efectos hepatocitotóxicos [Koschny et al., 2007; Meurette et al., 2006], por lo que se requiere un estudio preclínico más profundo de estas combinaciones antes de ser usadas en estudios clínicos.

Además de las terapias antitumorales comunes, la activación de la señalización apoptótica de TRAIL se puede combinar con agentes que la favorezcan de algún modo. Por ejemplo, el uso de inhibidores de la ruta NF- $\kappa$ B sensibiliza a diferentes células tumorales a TRAIL. Esto se debe a que la inhibición directa o indirecta de esta ruta implica un descenso en



los niveles de FLIP, IAPs y proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, proteínas implicadas en la señalización de supervivencia de NF- $\kappa$ B [Chawla-Sarkar et al., 2003; Khanbolooki et al., 2006; Kim et al., 2005; Romagnoli et al., 2007; Roue et al., 2007].

Agonista de TRAIL-R	Cotratamiento	Fase	Tipo Tumoral
Mapatumumab (HGS-ETR1)	Sorafenib	I/II	HCC
	Bortezomib	II	MM
	Carboplatino	II	NSCLC
Lexatumumab (HGS-ETR1)	-	I	Sólido/Linfoma
AMG-655 (anti-TRAIL-R2)	Doxorrubicina	Ib/II	Sarcoma
	Gemcitabine	Ib/II	Páncreas
	FOLFOX6	Ib/II	CRC
	Carboplatino	Ib/II	NSCLC
	Panitumumab	Ib/II	CRC
CS-1008 (anti-TRAIL-R2)	-	I	Sólido/Linfoma
	Gemcitabine	II	Páncreas
Apomab (anti-TRAIL-R2)	Cetuximab	Ib	CRC
	Rituximab	II	NHL
	-	II	Condrosarcoma
	Carboplatino	II	NSCLC
AMG-951 (rhAPO2/TRAIL)	Carboplatino	II	NSCLC
APO2/TRAIL	Cetuximab	I	CRC
	Rituximab	Ib/II	NHL bajo grado

**Tabla 1:** Esquema de las fases de estudio en ensayos clínicos en los que se encuentra TRAIL.

HCC, Carcinoma Hepatocelular (hepatocellular carcinoma); NHL, Linfoma no-Hodgkin (non-Hodgkin's lymphoma); NSCLC, Cáncer de pulmón de células no pequeñas (non-small cell lung cancer); MM, Mieloma Múltiple (Multiple myeloma); CRC: Carcinoma colorrectal (colorectal cancer). Adaptada de [Newsom-Davis et al., 2009].

También se ha estudiado la activación de los receptores de TRAIL en combinación con inhibidores de deacetilasas de histonas (HDACi, *Histone Deacetylase inhibitors*), la cual puede provocar sobreexpresión de receptores de TRAIL [Guo et al., 2004; Rosato et al., 2003; Zhang et al., 2003], aumentar los niveles de caspasas, Bax y Bak [Lindemann et al., 2007] e inhibir la expresión de FLIP o XIAP [Bolden et al., 2006].

La inhibición de FLIP e IAPs es otra de las opciones para sensibilizar a las células tumorales a la activación de los receptores de TRAIL. Se han desarrollado algunos inhibidores de IAPs que, usados en combinación con TRAIL, favorecen la muerte de células tumorales [Bockbrader et al.,

2005; Karikari et al., 2007; Li et al., 2004]. Sin embargo aún no se han desarrollado inhibidores específicos de FLIP [Safa et al., 2008].

Debido a la capacidad de TRAIL de activar la ruta PI3K/Akt, implicada en la supervivencia y proliferación de células tumorales resistentes a TRAIL [Morel et al., 2005], el uso de inhibidores de esta ruta para sensibilizar a la apoptosis señalizada por los receptores de TRAIL es muy prometedora. Existen diferentes vías de inhibición de esta ruta, desde la inhibición de los receptores tirosín quinasas, la inhibición específica de PI3K, Akt, o de su diana más importante, mTOR. Todas estas aproximaciones sensibilizan a las células tumorales a la apoptosis activada por los receptores de TRAIL [Bortul et al., 2003; Bremer et al., 2005; Martelli et al., 2003; Panner et al., 2005; Thakkar et al., 2001], por lo que el diseño y desarrollo de inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR constituye un campo de investigación muy atractivo en terapia antitumoral [McCubrey et al., 2008].

Debido a estos prometedores estudios preclínicos, se han iniciado estudios clínicos en pacientes de cáncer para comprobar la inocuidad, farmacocinética y actividad antitumoral de TRAIL recombinante humano soluble (comercializado como AMG-951 por Gententech y Amgen), anticuerpos frente a TRAIL-R1, como mapatumumab (desarrollado por HGS (Human Genome Sciences)), y anticuerpos frente a TRAIL-R2, como lexatumumab (desarrollado por HGS), AMG-655 (desarrollado por Amgen) y apomab (desarrollado por Gententech); solos o en combinación con otras terapias antitumorales (tabla 1).

## 5. Metabolismo de las células tumorales.

### 5.1. Glucólisis aeróbica.

El cáncer es esencialmente una enfermedad en la que las células crecen y proliferan de una forma no controlada. En los años 20 se sostenía la teoría de que la causa principal del cáncer era un defecto en el metabolismo energético; como un mayor uso de la glucólisis, incluso en condiciones aeróbicas, en detrimento de la fosforilación oxidativa mitocondrial (respiración o consumo aeróbico de la glucosa). Este desbalance entre las fases glucolítica y oxidativa del metabolismo de la glucosa se denomina efecto Warburg [Warburg, 1956].

La glucólisis es el uso anaeróbico de la glucosa para la obtención de dos moléculas de ATP, mientras que de la respiración aeróbica se obtienen 36 moléculas de ATP en total (figura 13). Pero la glucólisis aporta energía más rápidamente que la fosforilación oxidativa [Guppy et al., 1993]. Además, produce metabolitos intermedios para la síntesis de macromoléculas, tales como azúcares de ribosa para la síntesis de nucleótidos, citrato y glicerol para la síntesis de lípidos, aminoácidos no esenciales y NADPH a través de la vía de oxidación de pentosas fosfato. El ciclo de los ácidos tricarbóxicos mitocondrial (ciclo TCA; *tricarboxylic acid cycle*) pasa a un segundo plano en las células tumorales, sustituyendo su función energética por la de compartimento de biosíntesis de precursores intermedios necesarios en la alta demanda biosintética que existe durante la proliferación.

En los últimos 30 años, la revolución de la biología molecular ha señalado hacia las alteraciones genéticas, tales como la activación de oncogenes o la pérdida de genes supresores de tumores, como la causa principal del desarrollo tumoral; desplazando a la teoría del efecto Warburg. Así, en el año 2000, Douglas Hanahan y Robert Weinberg postularon las seis marcas características que definían el cáncer: la autosuficiencia en señalización del crecimiento, la insensibilidad a señales antiproliferativas, la evasión de la apoptosis, el potencial replicativo ilimitado, la angiogénesis sostenida y la capacidad invasiva y metastática [Hanahan and Weinberg, 2000].

El hecho de que las alteraciones metabólicas existentes en las células tumorales sean causa o consecuencia de la malignidad de las mismas sigue siendo un tema controvertido y sujeto a discusión hoy en día, ya que la mayor parte de las alteraciones genéticas responsables de tumorigenicidad están relacionadas con las alteraciones en el metabolismo energético [Altenberg and Greulich, 2004; Vogelstein and Kinzler, 2004]. Además, desde mediados de los 90s, se utiliza en clínica la tomografía de emisión de positrones (*PET: Positron Emission Tomography*) de la F<sup>18</sup>-fluorodeoxiglucosa (F(18)-FDG), para detectar y monitorizar el desarrollo de tumores en humanos [Gambhir, 2002; Gatenby and Gillies, 2007]. La F(18)-FDG es un análogo de la glucosa que se acumula mayoritariamente en las masas tumorales, debido al mayor requerimiento de ingesta de glucosa de estas células en comparación con las no tumorales. Por lo tanto, el metabolismo mayoritariamente glucolítico parece ser potencialmente la séptima marca característica del cáncer [Garber, 2006; Tennant et al., 2009; Yeung et al., 2008].

### *5.2. Regulación del metabolismo tumoral por factores de transcripción.*

El flujo de glucosa a través de la vía glucolítica está regulado por tres factores de transcripción Myc, HIF-1 y p53 [Yeung et al., 2008].

#### *5.2.1. Myc.*

La familia de oncogenes myc (c-myc, L-myc, s-myc y N-myc) se encuentra amplificada en un alto porcentaje de tumores de humanos y codifica factores de transcripción implicados en la regulación del crecimiento y ciclo celular. En células normales, c-Myc se requiere para superar el punto de control entre las fases G1 y S del ciclo celular [Adhikary and Eilers, 2005]. Por lo tanto, la sobreexpresión de este factor de transcripción en células tumorales implica una pérdida de control del crecimiento de las mismas. Entre las dianas moleculares inducidas por c-Myc se encuentran el transportador de glucosa 1 (GLUT1), varias enzimas glucolíticas, [Osthus et al., 2000] y la lactato deshidrogenasa A (LDH-A) [Shim et al., 1997], que convierte el piruvato en lactato, proceso esencial en la desregulación metabólica de las células tumorales [Fantin et al., 2006] (figura 13).

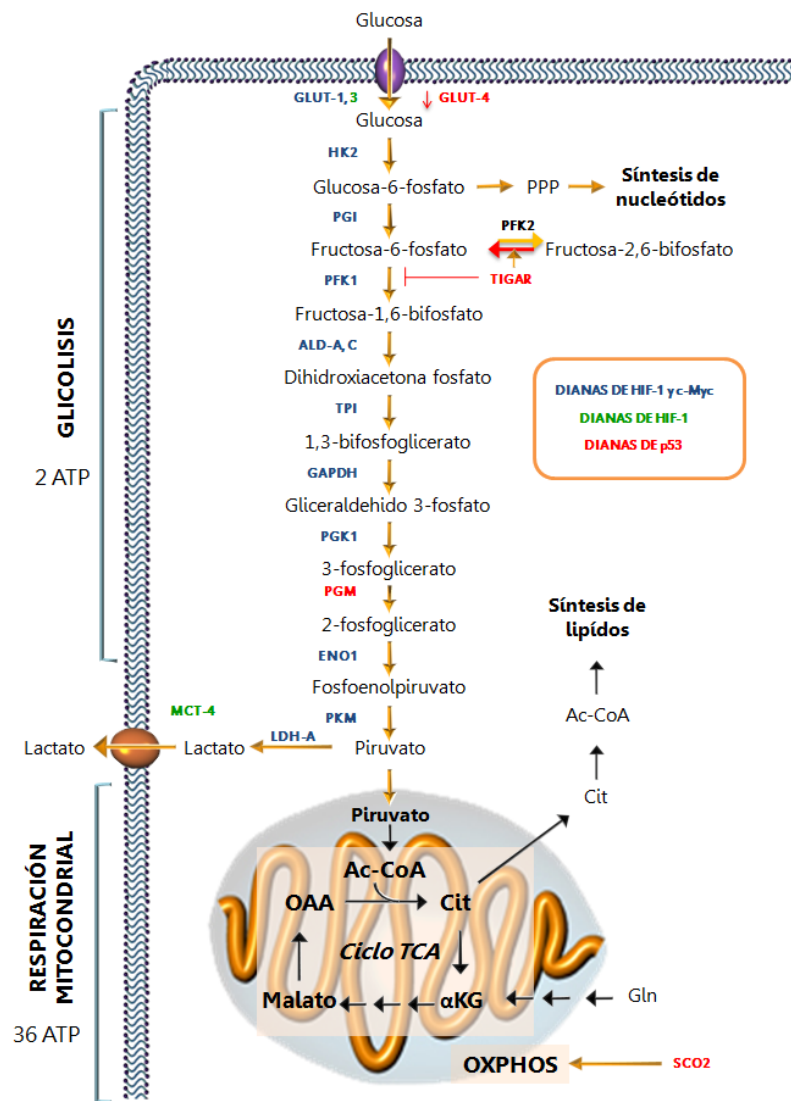


Figura 13: Glucólisis y respiración mitocondrial: control por Myc, Hif-1 y p53.

GLUT-1/3/4, Transportadores de glucosa-1/3/4 (*Glucose transporters-1/3/4*); HK2, Hexoquinasa 2 (*Hexokinase 2*); PGI, glucosafosfato isomerasa (*Phosphoglucose isomerase*); PFK1/2, Fosfofructo quinasa 1/2 (*Phosphofructo kinase 1/2*); ALD-A/C, Aldolasa-A/C (*Aldolase-A/C*); TPI, Triosafosfato isomerasa (*Triose phosphate isomerase*); GAPDH, Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*); PGK1, Fosfoglicerato quinasa 1 (*Phosphoglycerate kinase 1*); PGM, Fosfoglicerato mutasa (*Phosphoglycerate mutase*); ENO1, Enolasa 1 (*Enolase 1*); PK-M, Piruvato quinasa M (*Pyruvate kinase-M*); LDH-A, Lactato deshidrogenasa-A (*Lactate Dehydrogenase-A*); MCT-4, Transportador de monocarboxilato-4 (*Monocarboxylate transporter-4*); Ac-CoA, Acetil-coenzimaA (*Acetyl-coenzymeA*); Cit, Citrato (*Citrate*);  $\alpha$ KG,  $\alpha$ -cetoglutarato ( *$\alpha$ -ketoglutarate*); OAA, Ácido oxalacético (*Oxaloacetic Acid*); TCA, Ácidos tricarbóxicos (*Tricarboxylic acids*); Gln, Glutamina (*Glutamine*); OXPHOS, Fosforilación mitocondrial oxidativa (*Mitochondrial oxidative phosphorylation*); SCO2, Síntesis de la citocromo C oxidasa 2 (*Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2*); TIGAR, Regulador de apoptosis y glucólisis inducido por TP53 (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*); PPP, Ruta de las pentosas fosfato (*Pentose phosphate pathway*).

### 5.2.2. HIF-1.

El factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) es un factor transcripcional activado en situaciones de anoxia (ausencia de oxígeno) o hipoxia (bajas concentraciones de oxígeno), condiciones muy habituales en el interior de las masas tumorales. Consta de dos subunidades,  $\alpha$ 1, inducible, y  $\beta$ 1, constitutivamente expresada. En condiciones de normoxia (concentraciones normales de oxígeno), la subunidad  $\alpha$ 1 es muy lábil, y se degrada a la misma velocidad a la que se sintetiza [Wang et al., 1995]. Sin embargo, en condiciones de hipoxia o anoxia, esta subunidad se estabiliza y dimeriza con la subunidad  $\beta$ 1, siendo capaz así de activar la transcripción de sus genes diana, entre los cuales se encuentra GLUT1, la mayoría de las enzimas glucolíticas y la LDH-A [Semenza, 2000].

### 5.2.3. p53.

p53 es un gen supresor de tumores que se encuentra frecuentemente mutado o delecionado en células tumorales [Royds and Iacopetta, 2006]. Codifica el factor de transcripción p53, responsable del control del ciclo y viabilidad celular bajo situaciones de estrés. Además, p53 también está implicado en la regulación del metabolismo energético y los procesos biosintéticos celulares. En concreto, p53 reprime la síntesis de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 [Schwartzberg-Bar-Yoseph et al., 2004] e induce la síntesis del factor de transcripción TIGAR (*TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*), homólogo de la subunidad bifosfatasa de la PFK-2 (fosfofructoquinasa 2), que reduce los niveles de fructosa-2,6-bifosfato, un fuerte activador alostérico de la PFK-1, disminuyendo así el flujo glucolítico [Bensaad et al., 2006].

Por otro lado, p53 induce la síntesis de SCO2 (*Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2*), una chaperona necesaria para el ensamblaje del complejo COX (*Cytochrome c Oxidase*) IV con la cadena transportadora de electrones mitocondrial [Matoba et al., 2006]. La inhibición de la síntesis de SCO2 supone un bloqueo de la producción energética mitocondrial, que revierte la inhibición que la respiración mitocondrial ejerce sobre el flujo glucolítico, lo que se conoce como efecto Pasteur en levaduras y efecto Crabtree en mamíferos [Crabtree, 1928]; compensándose así la producción de ATP (figura 13).

Además del metabolismo energético, p53 ejerce un control sobre la biosíntesis de macromoléculas, inhibiendo mTOR, ya sea a través de la activación de AMPK [Budanov and Karin, 2008], responsable de su inhibición, o a través del bloqueo de su ruta de activación PI3K/Akt induciendo PTEN, induciendo la subunidad AMPK $\beta$  o regulando los niveles de TSC2/Tuberina (*Tuberous Sclerosis Protein 2*), proteína supresora de tumores implicada en su regulación [Feng et al., 2007].

Por lo tanto, la mutación o pérdida de p53 que ocurre en multitud de células tumorales, colabora con el aumento del flujo glucolítico en detrimento de la fosforilación oxidativa, y participa en el mantenimiento de la maquinaria biosintética activa.

### *5.3. mTOR, el centro de regulación del crecimiento celular.*

#### *5.3.1. Estructura.*

mTOR es una serina/treonina quinasa altamente conservada en la naturaleza responsable del crecimiento y supervivencia celular. Puede encontrarse formando parte de dos complejos: mTORC1 y mTORC2. mTORC1 está compuesto por mTOR, mLST8, Raptor y PRAS40 y es sensible a la Rapamicina [Brown et al., 1994]. Este complejo es el más estudiado, ya que integra el control de la traducción de proteínas, transcripción genética, biogénesis de ribosomas, ingesta de nutrientes y autofagia. El complejo mTORC2 está compuesto por mTOR, mLST8, Rictor y Sin1, bastante menos sensible a la Rapamicina que mTORC1 [Sarbasov et al., 2006]. mTORC2 está implicado en el ensamblaje y organización de los filamentos de actina bajo señales mitóticas [Jacinto et al., 2004; Sarbasov et al., 2004], además de ser capaz de activar Akt, una de las quinasas activadoras de mTOR [Sarbasov et al., 2005].

#### *5.3.2. Función.*

Entre las múltiples funciones de mTORC1 se encuentran la traducción de proteínas, transcripción génica, biogénesis de ribosomas, ingesta de nutrientes y la autofagia. Los sustratos de mTORC1 mejor estudiados son 4EBP1 y S6K (*p70 ribosomal S6 Kinase*), responsables de la regulación traduccional ejercida por esta quinasa.

4EBP1 (*eIF4E Binding Protein 1*) es una proteína que se une al factor de iniciación eIF4E, inhibiéndolo. La fosforilación de 4EBP1 mediada por mTOR le impide la unión a eIF4E, quedando éste libre para poder unirse a otro factor de iniciación de la traducción, eIF4G, y poder iniciar así la traducción de RNAs mensajeros [Mamane et al., 2006].

S6K es una quinasa responsable de la fosforilación de la proteína S6 del ribosoma 40S, implicada en la traducción de mRNAs con dominio 5'-TOP, los cuales codifican proteínas tales como factores implicados en la iniciación de la traducción o proteínas ribosómicas. Sin embargo, la fosforilación de la proteína S6 por la S6K parece no ser necesaria para la traducción de estas proteínas [Pende et al., 2004; Ruvinsky et al., 2005]. S6K debe contribuir de una forma distinta al control de la traducción ejercido por mTOR. Así, en los últimos años se ha descrito la implicación de S6K en la activación de otros factores iniciadores de la traducción, como eIF3, eIF4B y eIF4G (revisado en [Mamane et al., 2006]).

Además de la traducción, mTOR está implicado en la regulación de otros procesos celulares muy importantes para la supervivencia celular en condiciones desfavorables para la célula, como por ejemplo la autofagia. Aunque en levaduras se ha descrito que TOR regula la autofagia inhibiendo la proteína ATG1, el mecanismo de inhibición de la autofagia por mTOR en mamíferos aún no ha sido descrito, ya que ATG1 no tiene ortólogo en mamíferos (revisado en [Pattingre et al., 2008]).

### 5.3.3. Regulación

mTORC1 se encuentra regulado positivamente por la ruta PI3K/Akt, cuya sobreactivación es muy frecuente en cáncer [Luo et al., 2003]. PI3K se recluta en la cara interna de la membrana plasmática tras la activación de los receptores con actividad tirosín quinasa (RTKs, Receptor Tyrosine Kinases), mediada por insulina, hormonas y factores de crecimiento. Este reclutamiento conlleva la fosforilación del lípido de membrana fosfatidil inositol-4,5-fosfato (PIP<sub>2</sub>), dando lugar a la acumulación de PIP<sub>3</sub> (fosfatidil inositol-3,4,5-fosfato). Esta acumulación de PIP<sub>3</sub> provoca el reclutamiento de PDK1 (proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol) y Akt en la cara interna de la membrana citosólica, lo que conlleva a la activación de Akt mediada por la fosforilación de sus residuos T308 por la PDK1 [Walker et al., 1998], y S473 por mTORC2 [Sarbasov et al., 2005]. Además, la



acumulación de PIP<sub>3</sub> inhibe a la fosfatasa PTEN. La mutación del gen supresor de tumores PTEN, junto con mutaciones activadoras de la subunidad quinasa de PI3K, son las principales causas de la desregulación de la ruta PI3K/Akt en tumores [Bader et al., 2005].

Una vez activada, Akt fosforila a TSC2 en los residuos S939 y T1462, inhibiéndolo [Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002]. TSC2 forma un complejo heterodimérico con TSC1 con actividad GAP (proteína

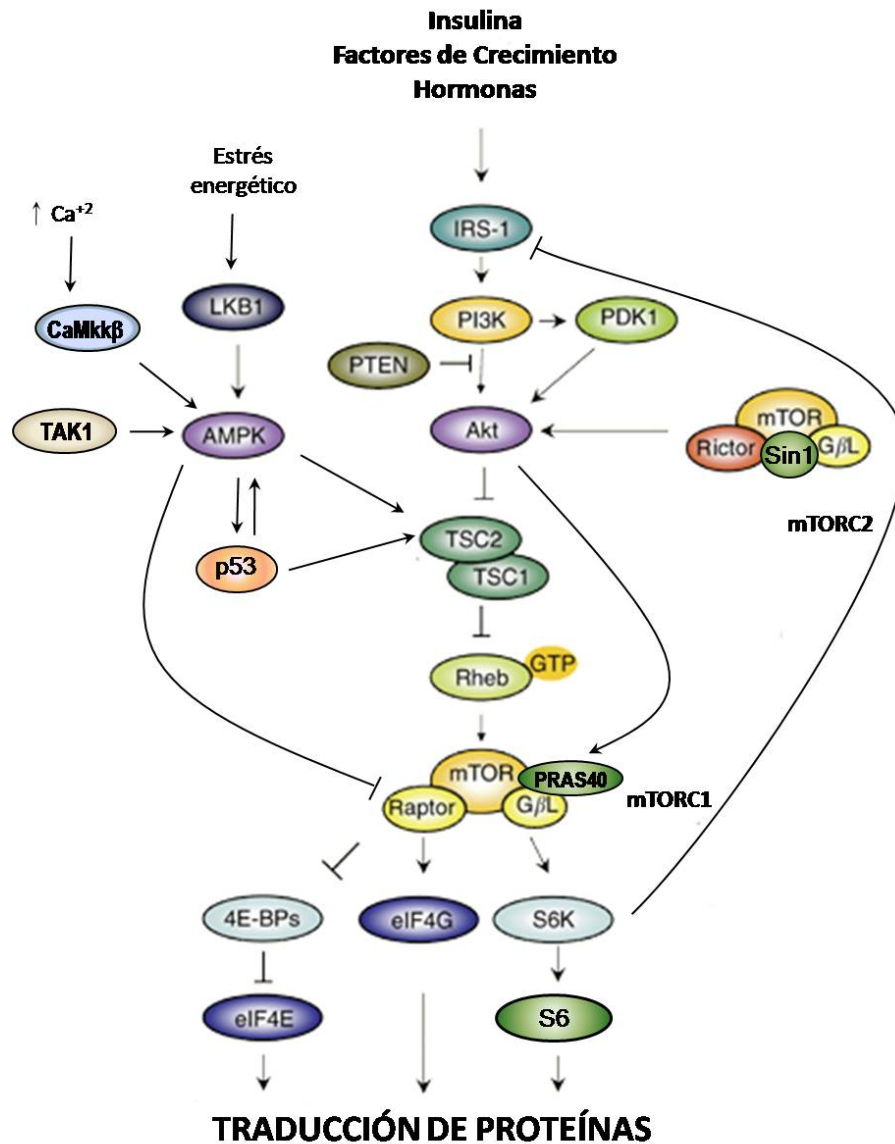


Figura 14: Regulación de mTOR por Akt y AMPK. Adaptada de [Hartford and Ratain, 2007]

activadora de GTPasa) capaz de inhibir a la proteína GTPasa Rheb por disociación de la molécula de GTP. Así, la fosforilación de TSC2 por Akt provoca una disociación del complejo TSC1/TSC2, lo cual desreprime la GTPasa Rheb, que activa mTORC1 (figura 14). La mutación del gen supresor de tumores TSC2 es propia de la esclerosis tuberosa, causa de los tumores llamados hamartomas [Crino et al., 2006].

Akt también es capaz de activar a mTORC1 directamente, mediante la fosforilación de la subunidad PRAS40 de dicho complejo, atenuando su efecto represor sobre la actividad quinasa de mTOR [Sancak et al., 2007; Vander Haar et al., 2007].

La activación de mTOR puede resultar en su retroinhibición mediante la activación de la S6K. Esta quinasa es capaz de fosforilar a IRS (Insulin Receptor Substrate), inhibiéndola. Esta proteína es necesaria para el reclutamiento de PI3K en la membrana plasmática, por lo que su inhibición impide la activación de la ruta PI3K/Akt [Harrington et al., 2004; Shah et al., 2004; Um et al., 2004].

En contraposición a la vía PI3K/Akt, se encuentra la vía de AMPK, inhibidora de mTOR. AMPK es capaz de fosforilar a TSC2 en los residuos S1227 y S1345, responsables de su activación, lo que conlleva a la inhibición de mTOR [Inoki et al., 2003; Kimura et al., 2003]. La fosforilación en S1345 es necesaria para una posterior fosforilación de TSC2 en los residuos S1341 y S1337 por la GSK3 $\beta$ , lo cual conlleva a la activación máxima de TSC2 [Inoki et al., 2006].

Recientemente se ha descrito que AMPK es capaz de fosforilar 'in vitro' los residuos S722 y S792 de la proteína Raptor del complejo mTORC1, inhibiendo así mTOR directa e independientemente de TSC2 [Gwinn et al., 2008].

Además, la activación de AMPK en ciertos contextos implica la activación de p53 [Jones et al., 2005], el cual, como ya se ha descrito anteriormente, es capaz de inhibir mTOR a través de diferentes mecanismos (ver sección 5.2.3) (figura 14).

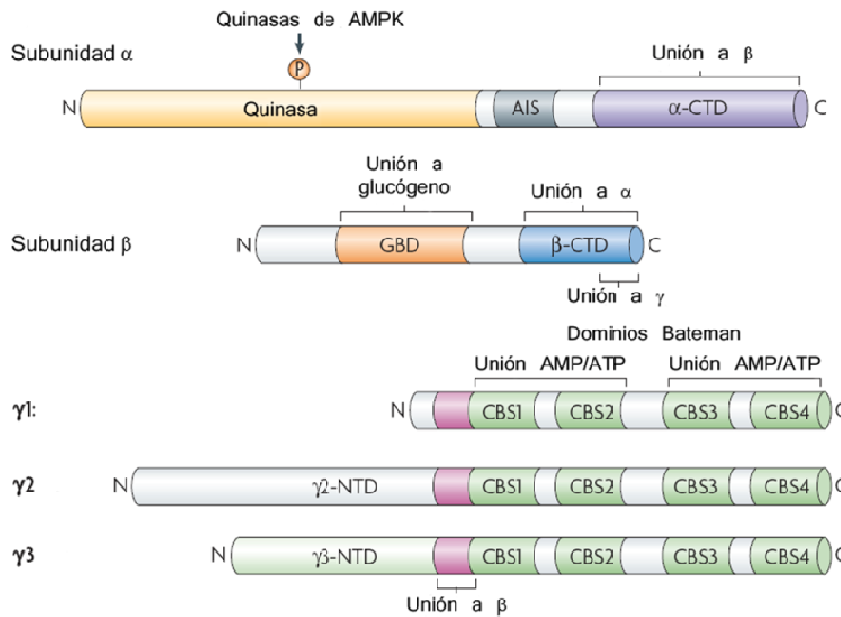
## 6. AMPK: sensor del estado energético celular.

### 6.1. Introducción

AMPK es el sensor del estado energético celular, ya que se activa por cualquier estrés que cause un cambio en el cociente AMP/ATP intracelular, como la hipoxia, la privación de nutrientes y el ejercicio [Hardie, 2007]. En 1973 dos grupos de investigación detectaron, por un lado, la inhibición de la HMGCoA Reductasa (HMGCR) [Beg et al., 1973], y por otro, de la Acetil-CoA Carboxilasa (ACC) [Carlson and Kim, 1973], en presencia de MgATP, coincidiendo ambos en que estos hechos eran debidos a la actividad de una quinasa. Sin embargo, hasta 1987 no se descubrió que ambas enzimas estaban siendo fosforiladas por la misma proteína quinasa [Carling et al., 1987], a la cual se denominó AMPK (*AMP-activated protein kinase*) [Sim and Hardie, 1988].

### 6.2. Estructura

AMPK es una proteína quinasa heterotrimérica, formada por dos subunidades reguladoras ( $\beta$  y  $\gamma$ ), y una subunidad catalítica ( $\alpha$ ); de cada una de las cuales existen distintas isoformas codificadas por dos o tres genes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  y  $\gamma 3$ ), que además son sometidas a splicing alternativo [Cheung et al., 2000] (figura 14). Así, existen 12 combinaciones posibles para la formación del complejo AMPK, y, aunque la expresión de las distintas isoformas de AMPK es dependiente del tejido y tipo celular [Cheung et al., 2000; Stapleton et al., 1996; Thornton et al., 1998; Woods et al., 1996b], la predominante es  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$  en la mayoría de los casos. Existen algunas diferencias en su función, de tal forma que su composición  $\alpha\gamma$  puede variar su sensibilidad a AMP [Cheung et al., 2000]. Además, los complejos de AMPK $\alpha 2$  parecen estar enriquecidos en el núcleo, mientras que los AMPK $\alpha 1$  se encuentran exclusivamente en el citosol [Ai et al., 2002; da Silva Xavier et al., 2000; Salt et al., 1998; Turnley et al., 1999].



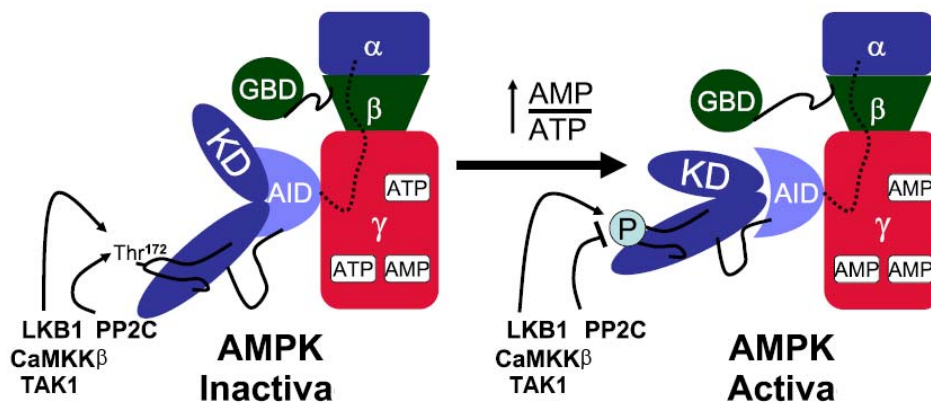
**Figura 14: Dominios de las subunidades de AMPK.**

AIS, Secuencia autoinhibitoria (Autoinhibitory Sequence); CTD, Dominio C-terminal (C-terminal domain); NTD, Dominio N-terminal (N-terminal domain); GBD, Dominio de unión a glucógeno (Glycogen binding domain); CBS, Cristationina- $\beta$ -sintasa (cristathionine- $\beta$ -sintase). Adaptada de [Hardie, 2007].

Las subunidades reguladoras  $\beta$ 1 (270 aa) y  $\beta$ 2 (272 aa) son las proteínas estructurales de AMPK. Poseen un dominio C-terminal que interacciona con  $\alpha$  y  $\gamma$  estabilizando el complejo [Iseli et al., 2005]. Además, poseen en su interior una secuencia de unión a glucógeno (GBD, glycogen binding domain), la cual media la interacción de glucógeno con AMPK [Hudson et al., 2003; Polekhina et al., 2003]. Aunque se sabía que el glucógeno era capaz de inhibir la activación de AMPK en determinadas circunstancias [Wojtaszewski et al., 2002], sólo recientemente se ha demostrado la implicación de dicho dominio GBD en la regulación de AMPK por glucógeno [McBride et al., 2009].

Las subunidades reguladoras  $\gamma$ 1 (331 aa),  $\gamma$ 2 (569 aa) y  $\gamma$ 3 (489 aa) poseen un dominio N-terminal de longitud variable. Aunque las consecuencias de esta diferencia en los complejos AMPK no están muy claras, la distinta longitud de estas subunidades puede proporcionar una compartimentación específica de AMPK en ciertos casos [Lang et al., 2000; Yu et al., 2004]. La subunidad  $\gamma$ 2, por otra parte, posee sitios de fosforilación 'in vivo' no presentes en las otras dos isoformas [Villen et al.,

2007], lo que podría indicar una regulación diferencial de esta isoforma. Además, poseen cuatro repeticiones en tándem de la secuencia CBS (crystathionine- $\beta$ -synthase). El primero en describir estas secuencias CBS fue Bateman [Bateman, 1997]. Al determinarse que se encontraban invariablemente en número par, y que formaba estructuras funcionales como dímeros, se denominó dominio Bateman a la estructura formada por dos tándems CBS [Kemp, 2004]. Estos dominios son los responsables de la regulación de AMPK por AMP [Scott et al., 2004]. Existen cuatro sitios de unión de AMP a la subunidad gamma, dos en cada dominio Bateman. Sin embargo, sólo tres de ellos son ocupados por AMP en mamíferos. Dos de esos sitios de unión con AMP son lábiles, intercambiando AMP y ATP, por lo que son los responsables de las propiedades detectoras de energía propias de AMPK. El tercer sitio de unión con AMP no es intercambiable, la interacción del AMP con la proteína es muy fuerte, por lo que no se intercambia con ATP [Xiao et al., 2007].



**Figura 15:** Modelo estructural de activación de AMPK.

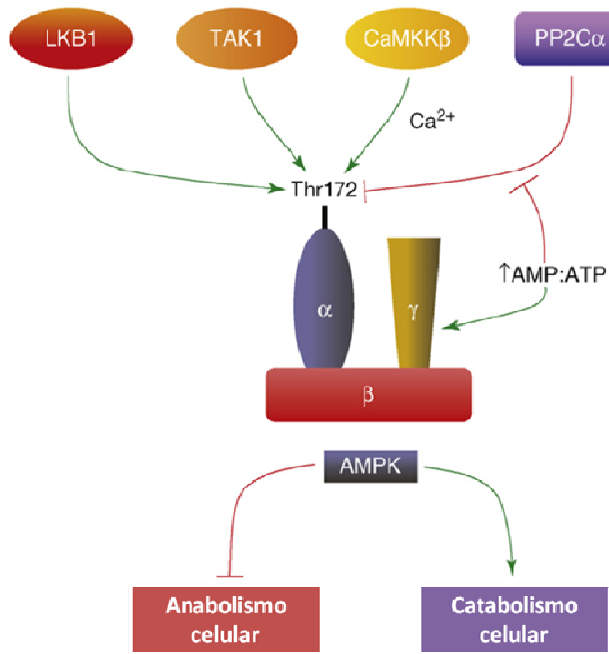
En la conformación inactiva de AMPK el dominio autoinhibitorio (AID, *Autoinhibitory domain*) de la subunidad  $\alpha$  mantiene el dominio C-terminal en una conformación abierta, de forma que tanto las quinazas de AMPK como la proteína fosfatasa 2C (PP2C) pueden acceder al residuo Thr172. Cuando se intercambian las moléculas de ATP por AMP en la subunidad  $\gamma$ , AMPK adquiere una conformación activa, en la que el residuo de Thr172 ya no es accesible por la PP2C. KD, Dominio quinasa (*Kinase domain*); GBD, Dominio de unión a glucógeno (*Glycogen binding domain*). Adaptada de [Young, 2009].

Las subunidades  $\alpha 1$  (550 aa) y  $\alpha 2$  (552 aa) poseen un dominio catalítico N-terminal, en el que se encuentra el residuo Thr172, cuya fosforilación es responsable de la activación de AMPK por otras quinasas [Crute et al., 1998; Hawley et al., 1996; Stein et al., 2000]. Justo a continuación, en dirección C-terminal se encuentra un dominio de autoinhibición (AID), que comprende los residuos del 313 al 335 [Crute et al., 1998; Pang et al., 2007]. Este dominio mantiene el dominio catalítico en una conformación abierta e inactiva, con el residuo Thr172 accesible a las quinasas de AMPK y a la proteína fosfatasa 2C (PP2C), responsable de su defosforilación. Cuando se incrementa la unión de AMP a la subunidad  $\gamma$ , el dominio AID libera al dominio catalítico de la conformación abierta, permitiendo que ésta adopte una conformación más cerrada y activa, que permite la interacción de las quinasas de AMPK con el residuo Thr172, pero no la interacción de la PP2C, lo que conlleva a la activación del complejo AMPK [Chen et al., 2009; Young, 2009] (figura 15).

El resto del dominio C-terminal está implicado en la interacción con las dos subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\gamma$  [Crute et al., 1998].

### 6.3. Regulación

AMPK puede activarse alostéricamente por unión de AMP a la subunidad reguladora  $\gamma$  [Scott et al., 2004]. Pero la actividad máxima de AMPK depende la fosforilación del residuo Thr172 en el dominio catalítico de AMPK $\alpha$  [Hawley et al., 1996]. Hasta hoy se conocen tres quinasas de AMPK: LKB1, CaMkk $\beta$  (*Calcium/calmodulin-dependent kinase kinase  $\beta$* ) y TAK1 (*Transforming growth factor  $\beta$ -Activated Kinase*) (figura 16).



**Figura 16:** Mecanismos de regulación de AMPK.

Adaptada de [Lage et al., 2008].

### 6.3.1. LKB1.

LKB1 se identificó por primera vez como el gen mutado en el síndrome de Peutz-Jeghers (PJS, *Peutz-Jeghers Syndrome*) [Hemminki et al., 1998; Jenne et al., 1998]. También se encuentra comúnmente mutado en tumores de pulmón [Ji et al., 2007; Sanchez-Cespedes et al., 2002] y carcinomas cervicales [Wingo et al., 2009]. Forma un heterotrímero con las subunidades reguladoras STE20-related adaptor (STRAD) y MO25, necesarias para su actividad quinasa [Alessi et al., 2006]. En un principio se pensaba que la unión de AMP a la subunidad  $\gamma$  de AMPK inducía la fosforilación de AMPK por LKB1 [Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004; Woods et al., 2003], sin embargo LKB1 está constitutivamente activa, y la unión de AMP lo que hace es impedir la defosforilación de AMPK por la PP2C, aumentando así el estado fosforilado de AMPK [Sanders et al., 2007b].

### 6.3.2. CaMKK $\beta$ .

CaMkk $\beta$  es una quinasa dependiente de calcio que activa AMPK en respuesta a señales que incrementan la concentración intracelular de

iones de calcio [Hawley et al., 2005; Hurley et al., 2005; Woods et al., 2005].

### 6.3.3. TAK1.

TAK1 ha sido la última quinasa de AMPK descrita hasta el momento [Momcilovic et al., 2006]. Es miembro de la familia de quinasas quinasas quinasas activadas por mitógeno (MAPKKK, *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*) identificado como mediador de la señalización del TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) en células de mamífero por encima de p38 y JNK [Yamaguchi et al., 1995].

TAK1 participa en la vía canónica de activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B tras la estimulación los receptores de citoquinas, como TNFR, IL-1R (*Interleukin-1 Receptor*) y TLRs (*Toll-Like Receptors*) [Wang et al., 2001].

Todos estos estímulos convergen en la activación de un complejo formado por TAK1 y las subunidades reguladoras de TAK1: TAB1 y TAB2 (*TAK1-binding proteins*). TAB2 y TAB3 parecen tener funciones redundantes en la activación de TAK1 por citoquinas [Ishitani et al., 2003; Kanayama et al., 2004; Sanjo et al., 2003], mientras que TAB1 sólo tiene función en la activación de TAK1 inducida por estrés osmótico, sin afectar a las señalización de TAK1 por citoquinas inflamatorias [Inagaki et al., 2008].

TAK1 se autofosforila y activa cuando TAB2 (o TAB3) se encuentra unida a una cadena de poliubiquitina-K63 (ubiquinas unidas por el residuo de lisina 63, que señalizan activación) [Xia et al., 2009]. TAK1 fosforila la subunidad IKK $\beta$  de la quinasa IKK, lo cual la activa y permite que ésta fosforile I $\kappa$ B $\alpha$ , represor de NF- $\kappa$ B en el citosol. La fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  por IKK induce su ubiquitinación en K48 (ubiquitina unida por el residuo de lisina 48), lo cual señala para su degradación. El dímero de NF- $\kappa$ B liberado puede así pasar al núcleo e inducir la transcripción de genes, muchos de ellos relacionados con su propia retroinhibición (revisado en [Skaug et al., 2009]).



En concreto, NF- $\kappa$ B puede inducir la expresión de CYLD y A20, deubiquitinasas responsables de la degradación de la cadena de poliubiquitina-K63 implicada en la activación de TAK1 e IKK [Brummelkamp et al., 2003; Kovalenko et al., 2003; Krikos et al., 1992; Lee et al., 2000; Trompouki et al., 2003], lo cual representa un control por parte de NF- $\kappa$ B de la respuesta inflamatoria frente a estos estímulos.

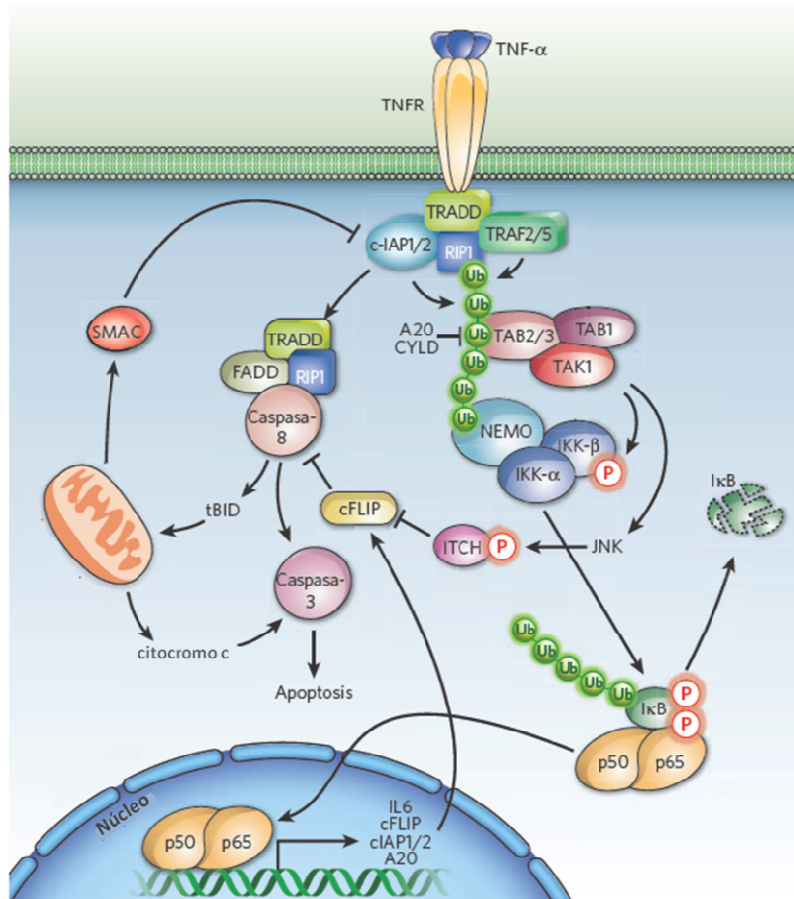


Figura 17: Modelo de activación de TAK1 por TNF $\alpha$ .

Adaptada de [Bhoj and Chen, 2009].

En lo que concierne al mecanismo de activación de TAK1, tanto TNF como IL-1 inducen el reclutamiento de factores de unión del receptor de TNF (TRAFs) en sus respectivos receptores [Chung et al., 2002]. Estas proteínas, a excepción de TRAF1 (TRAF2-7) son ubiquitín ligasas, debido a que tienen un dominio RING en el extremo N-terminal [Deng et al., 2000].

En el caso de IL-1R y TLRs, cuando llega un estímulo es TRAF6 la ubiquitín ligasa que se une al receptor [Cao et al., 1996]. Esta unión permite que se active y cree una cadena de poliubiquitina-K63, la cual unirá TAB2 y NEMO/IKK $\gamma$  (subunidad reguladora de IKK). Por lo tanto, la cadena de ubiquitina sirve de anclaje para que TAK1 se autofosforile y, a su vez, active a IKK por proximidad.

En el caso de TNFR, las proteínas que se reclutan son TRAF2 o TRAF5, las cuales parecen ser funcionalmente redundantes [Tada et al., 2001]. También se recluta RIP1, requerido para la activación de IKK ya que TRAF2 (o TRAF5) ejerce su función ubiquitín ligasa sobre él. Así, la cadena de poliubiquitina K63 sobre RIP1 sirve de anclaje para el reclutamiento de TAK1 e IKK, lo que propicia la activación de la ruta [Ea et al., 2006; Kanayama et al., 2004; Wu et al., 2006] (figura 17).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que TRAIL es capaz de activar AMPK a través de TAK1 en células epiteliales de mama [Herrero-Martin et al., 2009]. Para que se dé esta activación es necesaria la proteína TAB2, lo cual indica que la formación de cadenas de poliubiquitina K63 probablemente sea necesaria en este modelo. En estos momentos se está llevando a cabo una investigación más profunda de las proteínas implicadas en la activación de TAK1 por TRAIL.

#### *6.4. Función*

Bajo un estrés energético, que provoca un aumento del ratio AMP/ATP intracelular, la función principal de AMPK como sensor del estado energético es inhibir las rutas anabólicas que consumen energía e inducir vías catabólicas que producen ATP para restaurar así los niveles energéticos celulares. Los principales mecanismos por los que AMPK realiza esta función son:

#### *6.4.1. ACC y HMGCR: inhibición de la síntesis de ácidos grasos y colesterol.*

AMPK se describió inicialmente como quinasa de estas dos enzimas implicadas en el metabolismo lipídico [Carling et al., 1987]. Mediante la fosforilación de la HMGCR (Hidroximetil glutarato coA reductasa), AMPK inhibe la síntesis de colesterol, mientras que con la fosforilación de ACC, inhibe la síntesis de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, primer paso en la síntesis de ácidos grasos. Además, el malonil-CoA es el principal inhibidor alostérico de la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT1), enzima responsable de la importación de ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria para ser degradados. Por lo tanto, la fosforilación de ACC (Acetil coA carboxilasa) no sólo inhibe la síntesis de ácidos grasos, sino que propicia su oxidación. Esto, junto con la inhibición de la síntesis de colesterol, contribuye a la recuperación de los niveles energéticos.

#### *6.4.2. mTOR: inhibición de la síntesis proteica.*

Como ya se ha descrito en el apartado 5.3.3., AMPK regula negativamente mTOR, mediante la fosforilación de TSC2 [Inoki et al., 2003; Kimura et al., 2003] y RAPTOR [Gwinn et al., 2008]. Además puede inhibir mTOR indirectamente, mediante la activación de p53 [Jones et al., 2005], que a su vez activa la inhibición de mTOR mediante dos mecanismos distintos: mediante la inducción de las Sestrinas 1 y 2, que favorecen la fosforilación de TSC2 por AMPK [Budanov and Karin, 2008]; e induciendo la síntesis de la subunidad AMPK $\beta$ 1, del inhibidor de la ruta PI3K/Akt, PTEN, y de TSC2 [Feng et al., 2007].

Además de regular la iniciación de la síntesis proteica a través de la inhibición de mTOR, AMPK también impide la traducción de proteínas inhibiendo al factor de elongación eEF2 [Horman et al., 2002] mediante la fosforilación de su quinasa [Browne et al., 2004].

#### *6.4.3. p53: control del ciclo celular.*

AMPK es capaz de fosforilar a p53 en su serina 15 [Imamura et al., 2001], activando así la vía p53/p21 de control del ciclo celular, que induce una parada en la fase G1 [Jones et al., 2005]. Además, como ya se ha

descrito en el apartado 5.3.3., la activación de p53 coopera con AMPK en la inhibición de mTOR.

## 7. Activadores de AMPK.

Además del estrés energético en sí, se han descrito numerosos agentes activadores de AMPK más o menos directos. Los más importantes son:

### 7.1. Biguanidinas: Metformina y Fenformina.

La Metformina es un activador de AMPK comúnmente usado en el tratamiento de la diabetes tipo II, ya que provoca una disminución de la gluconeogénesis hepática [Hundal et al., 2000]. La Metformina y su análogo más potente, la Fenformina, inhiben el complejo I de la cadena respiratoria de electrones mitocondrial [Owen et al., 2000]; por lo que se pensaba que el mecanismo de activación de AMPK era a través de un aumento del ratio AMP/ATP. Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles energéticos celulares tras estos tratamientos [Fryer et al., 2002; Hawley et al., 2002].

Recientemente se ha descrito el mecanismo de activación de AMPK por Metformina [Xie et al., 2008a]. En este trabajo se observó que la inhibición de la cadena transportadora de electrones resultaba en la generación de especies reactivas de nitrógeno (ONOO<sup>-</sup>), que activaban a la PKC $\xi$ , responsable de la fosforilación de LKB1 en el residuo S428 [Xie et al., 2006b], requerida para la traslocación de LKB1 del núcleo al citoplasma, lo que activaría a AMPK. La Fenformina, a pesar de activar más potentemente a AMPK que la Metformina [Dykens et al., 2008], no se usa en clínica debido a que su uso prolongado provoca acidosis láctica [Owen et al., 2000].

### 7.2. 2DG: 2-Deoxiglucosa.

La 2DG es un análogo de la glucosa no hidroxilable, por lo que inhibe la glucólisis, aumentando así los niveles de AMP intracelulares, lo cual activa AMPK. Debido al gran flujo glucolítico propio de las células tumorales, en contraposición con las células normales, la 2DG podría tener valor terapéutico en pacientes de cáncer. Hoy en día se están llevando a cabo pruebas clínicas en fase I con 2DG para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos [Kurtoglu and Lampidis, 2009].

### 7.3. AICAR: 5-Aminoimidazol-4-carboxamida 1- $\beta$ -D-ribofuranóxido.

El AICAR es el activador de AMPK más usado. Se introduce en la célula y la adenosina quinasa lo convierte en ZMP, un mimético de AMP [Corton et al., 1995] que actúa sobre AMPK prácticamente igual que el AMP [Day et al., 2007]. De este modo activa a AMPK tanto alostéricamente, como induciendo su fosforilación por las quinasas de AMPK. Sin embargo, debido a su capacidad de mimetizar a AMP, AICAR activa otras quinasas dependientes de AMP, como FBPasa (fructosa-1,6-bisfosfatasa) y la GPPasa (glucógeno fosforilasa) [Longnus et al., 2003; Vincent et al., 1991], lo que hace que no sea un activador específico de AMPK.

El AICAR, también conocido como acadesina, está siendo objeto de estudios clínicos en el tratamiento de lesiones isquémicas y, más concretamente, de leucemia linfocítica crónica (CLL) (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00559624?term=acadesine&rank=2>), ya que se ha descrito que el AICAR puede inducir apoptosis o inhibir el crecimiento de células tumorales [Campas et al., 2003; Rattan et al., 2005].

### 7.4. A-769662.

Este compuesto es una tienopiridona obtenida recientemente en los laboratorios Abbott [Cool et al., 2006]. Se definió como una pequeña molécula que activaba directamente a AMPK sin afectar significativamente a otras quinasas [Goransson et al., 2007]. Activa alostéricamente a AMPK mediante un mecanismo distinto al de AMP, ya que se une al extremo N-terminal de la subunidad  $\beta$ 1 de AMPK [Sanders et al., 2007a; Scott et al., 2008; Treebak et al., 2009].

En algunos estudios posteriores a su descripción se ha observado que el compuesto A-769662 puede tener efectos independientes de AMPK, es decir, no ser totalmente específico de esta quinasa. Así, se ha descrito que puede inhibir la actividad del proteasoma 26S [Moreno et al., 2008], disminuir la producción de glucosa en hepatocitos [Scott et al., 2008] y activar el consumo de glucosa en células de músculo esquelético de ratón mediante la activación de la ruta PI3K/Akt [Treebak et al., 2009], independientemente de AMPK.

### 7.5. *PTI.*

Este compuesto es el activador de AMPK más recientemente descrito [Pang et al., 2008]. Es una tiazolidina capaz de activar la subunidad catalítica  $\alpha$  de AMPK en ausencia de las dos subunidades reguladoras,  $\beta$  y  $\gamma$ , ya que antagoniza el complejo autoinhibitorio AID de la subunidad catalítica, permitiendo que sea fosforilable por las quinasas de AMPK.

### 8. *AMPK y Cáncer.*

Debido a la gran incidencia de desregulación en la vía PI3K/Akt, o de mutaciones en los genes supresores de tumores p53 y LKB1 en cáncer, la vía mTOR se encuentra comúnmente hiperactivada en estas células, lo que les proporciona vía libre para su proliferación descontrolada. Siendo AMPK la principal vía de inhibición de mTOR, los agentes activadores de AMPK han sido diana de multitud de estudios anticancerígenos.

Así, se ha observado que tanto la Metformina como el AICAR inhiben el crecimiento de células tumorales en cultivo [Rattan et al., 2005; Zakikhani et al., 2006; Zakikhani et al., 2008] y que suprimen el crecimiento de heteroinjertos de células tumorales humanas en ratones [Algire et al., 2008; Buzzai et al., 2007; Swinnen et al., 2005]. Además se ha demostrado que el tratamiento con Metformina suprime la aparición de tumores en ratones transgénicos y otros roedores [Anisimov et al., 2005; Schneider et al., 2001].

Incluso, la Fenformina y el A-769662, que activan más potentemente AMPK que la Metformina, inhiben con mayor eficacia el desarrollo de linfomas en ratones PTEN<sup>+/-</sup> [Huang et al., 2008], que tienen mTORC1 sobreactivado.

Dado el alto número de pacientes con diabetes tipo II que toman Metformina diariamente (más de 100 millones), se realizó un estudio de la incidencia de cáncer en estos pacientes. Así, los primeros estudios mostraban que los pacientes diabéticos que habían estado tomando Metformina mostraban una reducción estadísticamente significativa del desarrollo de tumores comparados con los pacientes diabéticos que tomaban otro tipo de medicación [Bowker et al., 2006; Evans et al., 2005].

En lo que concierne al cáncer de mama, la hiperactivación de mTOR en estas células suele deberse a la sobreexpresión o sobreestimulación de los receptores de factores de crecimiento epidérmicos (EGFRs, Epidermal Growth Factor Receptors), los receptores de estrógenos (ERs, Estrogen Receptors), los receptores de insulina (IRs, Insulin Receptors) o los receptores de factores de crecimiento parecidos a la insulina de tipo 1 (IGF1Rs, Insulin-like Growth Factor Receptor 1) [Mita et al., 2003]. Se ha observado que los tumores de mama invasivos que tienen mTOR sobreestimulado tienen tres veces más riesgo de recurrencia y mortandad [Bose et al., 2006]. Ya que se ha descrito que la Metformina es capaz de suprimir la sobreexpresión de HER2 en células tumorales de mama humanas a través de la inhibición de mTOR y la S6K [Vazquez-Martin et al., 2009], la inhibición de mTOR, a través de la activación de AMPK, podría aportar avances en la terapia antitumoral del cáncer de mama.

En esta línea, se ha observado que la Metformina mejora la respuesta a los tratamientos anticancerígenos en pacientes diabéticos con cáncer de mama [Jiralerspong et al., 2009]; y en estos momentos se está realizando una prueba clínica en fase III a gran escala del tratamiento con Metformina en pacientes con cáncer de mama, diabéticos o no [Goodwin et al., 2009].





## IV. OBJETIVOS



Dada la alta incidencia de hiperactivación de mTOR en células tumorales de mama y el alto porcentaje de ellas que son resistentes a TRAIL, junto con datos previos de nuestro grupo de investigación que mostraban que la limitación de glucosa en el medio extracelular sensibilizaba a las células tumorales a TRAIL [Munoz-Pinedo et al., 2003]; nos preguntamos si AMPK jugaba un papel en la resistencia de estas células y si su activación, directa o indirecta, podría sensibilizarlas a la apoptosis inducida por TRAIL. Así pues, los objetivos de este trabajo fueron:

1. Determinar si la activación de AMPK sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama.
  - 1.1. Estudiar la sensibilización a TRAIL por activadores directos o indirectos de AMPK
  - 1.2. Estudiar los mecanismos implicados en dicha sensibilización
2. Estudiar la posible implicación de la actividad AMPK basal en la sensibilidad o resistencia a TRAIL en células tumorales de mama.
3. Describir el mecanismo de activación de AMPK por TRAIL tanto en células tumorales como en células epiteliales no tumorales de mama.



## V. MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. MATERIALES

### 1.1. Cultivos celulares.

Las células MCF10A son células epiteliales derivadas de tejido mamario humano normal [Pauley et al., 1993]. Las células MCF10A-EcoR expresan un receptor ecotrópico (EcoR) y fueron suministradas por la Dra. Joan Brugge y el Dr. David Lynch (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) [Debnath et al., 2003]. Se cultivaron en medio DMEM F12 (1:1) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS), 10 µg/mL de insulina, 20 ng/mL de factor de crecimiento epidermal (EGF), 100 ng/mL de toxina colérica, 500 ng/mL de hidrocortisona, 100 µg/mL de estreptomina y 500 U de penicilina. Las células MCF10A-GFP-LC3 se crearon mediante infecciones retrovirales como se ha descrito previamente [Herrero-Martin et al., 2009]. Las células MCF10A-FLIP<sub>L</sub> fueron creadas mediante infecciones retrovirales en nuestro laboratorio de forma similar a las MCF10A-GFP-LC3.

Las líneas celulares humanas de cáncer de mama MDA-MB231 [Cailleau et al., 1974], MDA-MB231-FLIP<sub>L</sub> [Ortiz-Ferron et al., 2008] y MCF7 [Soule et al., 1973]; y la línea celular humana de cáncer de cuello uterino HeLa [Scherer et al., 1953], se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomina y 500 U de penicilina.

Las líneas celulares humanas de cáncer de mama MDA-MB435s [Cailleau et al., 1978], MDA-MB468 [Cailleau et al., 1978] y BT474 [Lasfargues et al., 1978] se cultivaron en medio DMEM igualmente suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomina y 500 U de penicilina. Las MDA-MB-435s fueron además suplementadas con 10 µg/ml de insulina.

Todas las células fueron mantenidas en un incubador humidificado a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire.

### *1.2. Reactivos.*

Los medios RPMI 1640, DMEM y DMEM F12 (1:1), así como el EGF, la Hidrocortisona, la Insulina, el Suero Bovino Fetal (FBS), la L-glutamina y los antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El medio RPMI sin glucosa se obtuvo de Gibco (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA).

El TRAIL recombinante con cola de histidinas así como el TRAIL biotinilado recombinante (bTRAIL) fueron producidos en nuestro laboratorio como se describe más adelante.

El 5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribósido (AICAR) se obtuvo de Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada). La Rapamicina, la Fenformina, la Cicloheximida (CHX), los inhibidores de enzimas lisosomales: Pepstatina A y E64d, y el inhibidor del proteasoma: MG-132 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El compuesto A-769662 fue amablemente suministrado por el Dr. David Carling (Cellular Stress Group, Hammersmith Hospital, London, UK). La L-Glucosa se obtuvo de MERCK (Darmstadt, Alemania). La mezcla de inhibidores de proteasas fue proporcionada por Roche Applied Science, (Mannheim, Alemania). El inhibidor general de caspasas benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp-(OMe) fluorometil cetona (z-VAD-fmk) fue proporcionado por Bachem, AG (Bachem, Bubendorf, Suiza). El inhibidor de la JNK: SP600125 se obtuvo de Calbiochem Novabiochem GmbH (Band Soden, Alemania).

### *1.3. Anticuerpos.*

Los anticuerpos primarios utilizados para el análisis de proteínas incluyen:

- Anticuerpos monoclonales de ratón:

Beclina-1 (clon 20), Ras, FADD, XIAP y RIP1 (BD Transduction Laboratories; New Jersey, USA), GAPDH, LKB1, c-Myc (9E10) y Bax (Santa Cruz Biotechnology; CA, USA), P-p70S6K (Cell Signaling Technology; Inc, Danvers, MA, USA), Tubulina, FLAG-M2 (Sigma-Aldrich; St. Louise, MO, USA), FLIP NF6 (Alexis; San Diego, CA, USA), PARP y Citocromo C



(Pharmingen; San Diego, CA, USA), LC3 (NanoTools, Teningen, Alemania), y Bcl-2 (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

- Anticuerpos policlonales de conejo:

p70S6K (# 9202), AMPK (#2603), p-AMPK (#2535), p-ACC (#3661), p-TAK1 (#4508), TAK-1 (#4505), p-JNK (#9251), Caspasa-3 (#9661) y Caspasa-9 (#9501) (Cell Signaling Technology; Inc, Danvers, MA, USA), TRAF2 (C20) y TRAF6 (H274) (Santa Cruz Biotechnology; CA, USA), COX IV (Abcam; Cambridge, UK), Bid (donación del Dr. X. Wang, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, USA) y caspasa-8 (cedido por el Dr. Gerald Cohen, Universidad de Leicester, UK).

- Anticuerpos policlonales de cabra:

TAB2 (K20) y TRAF-5 (C19) (Santa Cruz Biotechnology; CA, USA) y TRAIL-R2 (R&D Systems; MN, USA).

El anticuerpo monoclonal de ratón frente al recetor de TRAIL DR5, (TRAIL-R2) utilizado para citometría de flujo se obtuvo de Abcam (Cambridge, UK).

Los anticuerpos de oveja frente a las subunidades AMPK $\alpha$ 1 y AMPK $\alpha$ 2 [Woods et al., 1996b]; y el anticuerpo de conejo frente a la subunidad AMPK $\beta$  (sip2) [Woods et al., 1996a], utilizados para inmunoprecipitar AMPK, fueron amablemente cedidos por el Dr. David Carling (Cellular Stress Group, Hammersmith Hospital, London, UK). El anticuerpo monoclonal de ratón frente a caspasa-8 (1C12) utilizado para inmunoprecipitar dicha proteína, fue obtenido de Cell Signaling Technology (Inc, Danvers, MA, USA).

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa HRP o FITC eran de DAKO (Glostrup, Dinamarca). El reactivo quimioluminiscente ECL era de Millipore (Billerica, MA, USA).

#### *1.4. RNAs de interferencia.*

Los siRNA de interferencia utilizados corresponden a las secuencias de cDNA humano para las siguientes proteínas se obtuvieron de Sigma-Proligo (Woodlands, TX, USA):

AMPK $\alpha$ 1#1 (5'-UGCCUACCAUCUCAUAAUAtt-3');

AMPK $\alpha$ 1#2 (5'-CCUCAAGCUUUUCAGGCAUtt-3');

LKB1 (5'-CUGGUGGAUGUGUUUACAtt-3');

CaMKK $\beta$  (5'-GGAUCUGAUCAAAGGCAUctt-3');

TAK-1 (5'- UGGCUUAUCUUACACUGGAtt-3');

Caspasa-8 (5'-GGAGCUGCUCUCCGAAUUt-3');

FLIP (5'-GGGACCUUCUGGAUUAUUUt-3') (reconoce a las dos isoformas, FLIPL y FLIPS);

Bid (5'-GAAGACAUCAUCCGAAUAtt-3');

Bcl2 (5'-GCAUGCGGCCUCUGUUUGAtt-3');

TRAIL-R2 (5'-GACCCUUGUGCUCGUUGUctt-3');

TAB2 (sc-41049; Santa Cruz Biotechnology; CA, USA);

RIP1 (5'-CCACUAGUCUGACGGAUAAAtt-3');

TRAF2#1 (5'-GUGUCGAGUCCCUUGCAGAtt-3');

TRAF2#2 (5'-UCUGCAAGGGACUCGACACtt-3');

TRAF5 (5'-CCAAGAACGCCUACAUUAAtt-3')

TRAF6 (5'-AAGGAGAAACCUUGUUGAUUt-3')

Control siRNA (5'-CUUUGGGUGAUCUACGUUAtt-3')

### 1.5. Cebadores para RT-PCR.

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

TRAIL-R2: 5'-GCCTCATGGACAATGAGATAAAGGTGGCT-3' (sentido) y 5'-CCAAATCTCAAAGTACGCACAAACGG-3' (antisentido) (Fragmento de 502 pb).

CaMKK $\beta$ : 5'-AGACCAGGCCCGTTTCTACT-3' (sentido) y 5'-GAAGATCTTGCGGGTCTCAG-3' (antisentido) (Fragmento de 241 pb).

TAB2: 5'-CTGACTTGAGCAGTGGGTGA-3' (sentido) y 5'-AACGTAAGGGCTTTGGGTCT-3' (antisentido) (Fragmento de 714 pb).

FLIP<sub>L</sub>: 5'-AATTCAAGGCTCAGAAGCGA-3' (sentido) y 5'-GGCAGAAACTCTGCTGTTC-3' (antisentido) (Fragmento de 230 pb).

FLIP<sub>S</sub>: 5'-ATGTCTGCTGAAGTCATCCAT-3' (sentido) y 5'-TCACATGGAACAATTTCCAAG-3' (antisentido) (Fragmento de 667 pb).

Actina: 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3' (sentido) y 5'-CATGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3' (antisentido). (Fragmento de 661 pb).

### 1.6. Construcciones adenovirales.

Los adenovirus recombinantes conteniendo el cDNA codificante para las siguientes construcciones fueron muy amablemente cedidos por el Dr. David Carling (Cellular Stress Group, Hammersmith Hospital, London, UK):

GFP: secuencia que codifica para la proteína fluorescente verde GFP, usada como control de eficiencia de infección.

AMPK $\alpha$ 1-CA: secuencia que codifica para los aminoácidos 1-312 de AMPK $\alpha$ 1, con una mutación de la treonina 172 a ácido aspártico que la convierte en constitutivamente activa; marcada con myc-tag [Stein et al., 2000; Woods et al., 2000].

AMPK $\alpha$ 1-DN: secuencia que codifica para AMPK $\alpha$ 1, con una mutación del ácido aspártico 157 a alanina que la convierte en inactiva; marcada con myc-tag [Stein et al., 2000; Woods et al., 2000].

AMPK $\gamma$ 1-R70Q/R298G: secuencia que codifica para la subunidad AMPK $\gamma$ 1, con dos mutaciones. La mutación de la arginina 70 a glutamina que convierte el trímero de AMPK en constitutivamente activo [Hamilton et al., 2001]; mientras que la mutación de la arginina 298 a glicina, la convierte en insensible a la activación por AMP [Sanders et al., 2007b].

AMPK $\gamma$ 2-R531G: secuencia que codifica para la subunidad AMPK $\gamma$ 2, con una mutación de la arginina 531 a glicina que convierte el trímero de AMPK en algo más activo que el que contiene la isoforma salvaje de esta subunidad, pero insensible a la activación por AMP [Daniel and Carling, 2002; Gollob et al., 2001].

CaMkk $\beta$ -WT: secuencia que codifica para CaMkk $\beta$  salvaje [Bright et al., 2008].

CaMkk $\beta$ -KD: secuencia que codifica para CaMkk $\beta$  con una mutación del aspártico 329 a alanina, lo que la convierte en catalíticamente inactiva [Woods et al., 2005].

Como control se usó un adenovirus vacío producido, al igual que el resto de los adenovirus utilizados, por Viraquest Inc (North Liberty, IA, USA).

### *1.7. Soluciones comunes.*

PBS 5X (pH 7.8): 170 mM NaCl (Sigma), 3 mM KCl (Merk), 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma), 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma).

TBS 10X (pH 7.6): 24.2 gr/L Tris Base (Roche), 80 gr/L NaCl (Sigma).

## 2. METODOLOGÍA

### *2.1. Cuantificación de la viabilidad celular por cristal violeta.*

La viabilidad celular se determinó por tinción con Cristal Violeta (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), mediante el cual se tiñen las células viables adheridas a la superficie de cultivo de las placas de 24 pocillos (1.88 cm<sup>2</sup>). Tras el tratamiento se retiró el medio de cultivo y se lavaron cuidadosamente los pocillos con PBS. A continuación se tiñeron las células adheridas a la placa con una solución de Cristal violeta (0,2% en etanol al 2%) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron los pocillos con agua y, una vez secos, se lisaron las células en una solución de SDS al 1%. La densidad óptica de cada pocillo se midió en el lector de placas Varioskan Flash (Termo Electron Corporation) a la longitud de onda de 590 nm.

### *2.2. Cuantificación de la viabilidad celular por SYTOX.*

La viabilidad celular se determinó por el método de SYTOX Green de Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), mediante el cual se tiñen los ácidos nucleicos cuando las células están permeabilizadas. Se recogieron las células con tripsina, se lavaron con PBS y a continuación se incubaron con 500 µl de una solución de SYTOX 1:10.000 en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar las células, se resuspendieron en PBS y la incorporación de SYTOX se cuantificó en el citómetro en el canal de fluorescencia FL1. La citometría fue realizada en un citómetro FACScalibur, utilizando el programa Cell Quest Pro de Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA) para analizar los datos.

### *2.3. Cuantificación de apoptosis.*

La apoptosis se cuantificó por citometría de flujo mediante la detección de células hipodiploides. Para ello, se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos (9,4 cm<sup>2</sup>) y, tras el tratamiento correspondiente, se recogieron con tripsina. Se fijaron y permeabilizaron

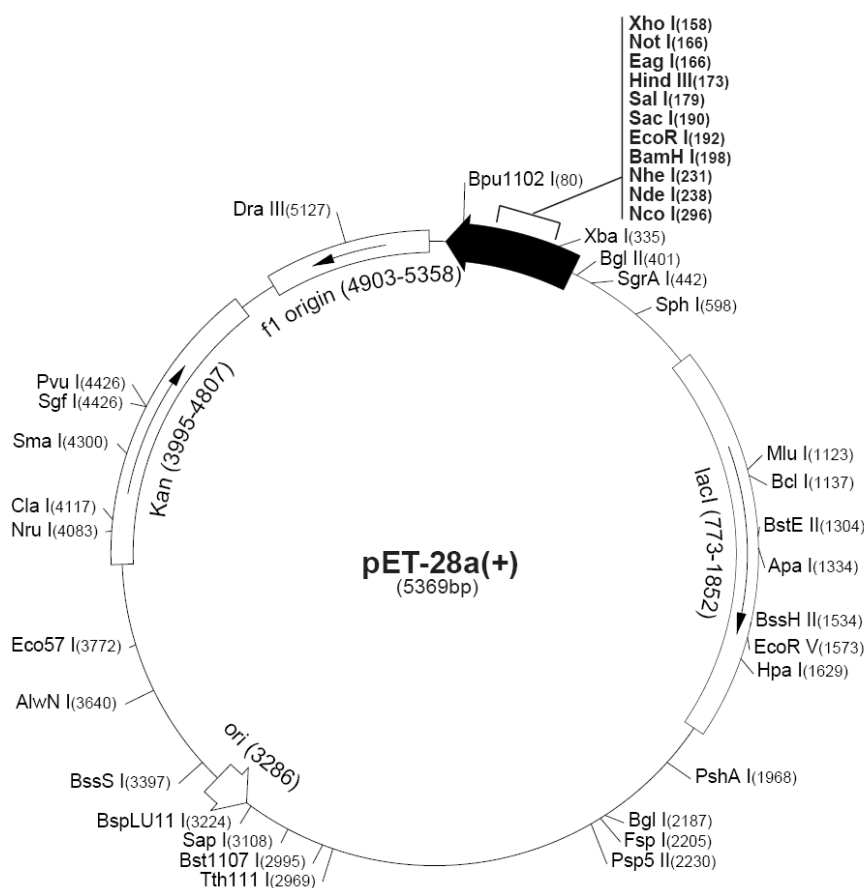
con 900  $\mu\text{l}$  de una solución de etanol frío al 70%, agitando en el vórtex y dejándolas 5 minutos en hielo. Después de lavar, se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de PBS y 250  $\mu\text{l}$  de Solución de Extracción de DNA (0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 M Ácido Cítrico en PBS; pH 7.8) y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. A continuación, y tras lavarlas, las células se resuspendieron en 250  $\mu\text{l}$  de Solución PI/RNAsa (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNAsa, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ioduro de Propidio (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) en PBS) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Las células apoptóticas se detectaron y cuantificaron en la población del ciclo celular en subG1, es decir, con menor contenido en DNA que las células del pico de G1. La citometría de flujo fue realizada en un citómetro FACScalibur, utilizando el programa Cell Quest Pro de Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA) para el análisis de los datos.

#### *2.4. Análisis de receptores de TRAIL en la superficie celular.*

Para detectar la expresión de receptores de TRAIL en la superficie de las células se sembraron  $3 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos y, tras el tratamiento correspondiente, se despegaron con un raspador en PBS. Una vez lavadas con PBS, se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de PBS. A continuación, se incubaron con 10  $\mu\text{l}$  de anticuerpo primario contra TRAIL-R2 (DR5) por cada  $10^6$  células a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con isotiocinato de fluoresceína (DAKO, Dinamarca) en una dilución 1:20 durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se volvieron a lavar con PBS y se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de PBS. La detección de los receptores de muerte se realizó con un citómetro FACScalibur analizando la población positiva para FL1, que es la longitud de onda a la que emite la fluoresceína (FITC), con el programa Cell Quest Pro de Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA).

### 2.5. Producción de TRAIL recombinante y TRAIL biotinilado recombinante (b-TRAIL).

El TRAIL recombinante con cola de histidinas así como el TRAIL biotinilado recombinante (bTRAIL) fueron producidos a partir de una construcción amablemente cedida por la Dra. Marion MacFarlane (MRC Toxicology Unit, University of Leicester, UK) que codifica para TRAIL recombinante (aminoácidos 95-281) insertada en BamHI/XhoI del vector pET-28b(+) con resistencia a Kanamicina y una cola de 6 histidinas para facilitar la purificación de la proteína [MacFarlane et al., 1997].



Mapa del plásmido pET-28a(+), cuya única diferencia con el mapa de pET-28b(+) es que pET-28b(+) es un vector de 5368 pares de bases debido a la sustracción de un par de bases tras la diana BamHI de la posición 198, lo que cambia la pauta de lectura.

Brevemente, se transformaron bacterias BL21 con 1-2  $\mu\text{g}$  de construcción por choque térmico y se crecieron en medio LB (Luria-Bertani) a una concentración de 20mM de glucosa y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Kanamicina. Cuando el precultivo alcanzó una densidad óptica óptima de 0.6-0.8 a la longitud de onda de 600nm se indujo la síntesis de TRAIL con 0.5  $\mu\text{M}$  del inductor del operón lac: IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido), obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Una vez transcurridas 3 h de inducción a T.A., las bacterias se recogieron y se lisaron, tras lavarse con PBS, en un Tampón de lisis conteniendo 30mM de Tris-HCl a pH 7.5, 150mM de NaCl, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas. Este lisado se incubó en un rotor circular durante 16 h a 4°C en una columna de sefarosa quelada con Niquel (Quelating Sepharose Fast Flow; GE Healthcare Bio-Sicences AB, Uppsala, Suiza), a la que se une la cola de histidina del TRAIL recombinante. Tras lavar 6 veces la columna con PBS frío, el TRAIL recombinante unido a ella se eluyó con una solución de EDTA a 100 mM en PBS. Las fracciones más purificadas se titularon realizando una dosis respuesta de las mismas con células HeLa, se alicuotaron y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

En el caso del TRAIL recombinante biotinilado, antes de eluir la proteína de la columna, ésta se incubó con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de reactivo de biotinización (Ácido D-Biotinil- $\epsilon$ -Aminocaproico N-Hidroxisuccinimida Éster; Roche, Mannheim, Alemania) durante 1 h a 4°C, tras lo cual se eluyó con una solución de EDTA a 150 mM en PBS.

### *2.6. Aislamiento del DISC de TRAIL.*

La precipitación del DISC fue realizada utilizando TRAIL biotinilado recombinante (bTRAIL), producido en nuestro laboratorio como se ha descrito anteriormente. Las células ( $20 \times 10^6$  células/punto) fueron incubadas con o sin tratamiento durante 16 h. Tras esta incubación, las células fueron tratadas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bTRAIL durante 15, 30 ó 60 minutos (según se indique). La formación del DISC se obtuvo eliminando el bTRAIL no pegado a las células mediante 3 lavados con PBS frío. Posteriormente, las células se lisaron en 3 ml de Tampón de Lisis del DISC (30mM de Tris-HCl a pH 7.5, 150mM de NaCl, glicerol al 10%, Tritón X-100



al 1%, Deoxicolato al 0.1% e inhibidores de proteasas) durante 30 minutos en hielo, seguido de una centrifugación de 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes, guardando una alícuota de 50µl como control interno (INPUT). Se midió la concentración de proteína y se añadió bTRAIL a los lisados controles. El DISC de TRAIL fue entonces precipitado con 30µl de bolitas de agarosa/estreptavidina (Sigma; St. Louis, MO, USA), incubando toda la noche a 4°C en un rotor circular. Los inmunoprecipitados se lavaron 6 veces con 500µl de tampón de lisis, y el DISC fue eluído con 30µl de Tampón de Carga 1X (50mM de Tris-HCl a pH 6,8, 100mM de DTT, SDS al 2%, Glicerol al 4% y Azul de Bromofenol al 0,04%). Las muestras fueron hervidas 5 minutos a 95°C, se centrifugaron y se recogió el sobrenadante. El análisis proteico del DISC se realizó mediante Western Blot.

### *2.7. Inmunoprecipitación de TAB2.*

Para inmunoprecipitar TAB2 se recogieron aproximadamente  $30 \times 10^6$  células por condición con rascador en PBS EDTA al 0.02%. Tras lavar las células con PBS, se lisaron en 1mL de Tampón de Lisis del DISC durante 30 minutos en hielo. Tras esta incubación, se centrifugaron los lisados a 13.000 rpm durante 10 minutos y se recogió la fracción soluble, guardando una alícuota de 50 µl como control interno (INPUT). Se midió la concentración de proteína y se incubó 1 mg de lisado con 2 µg de anticuerpo anti-TAB2 (K20) (Santa Cruz Biotechnology; CA, USA) ó con 2 µg de suero de cabra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a 4°C en un rotor giratorio durante 1,5 horas. Transcurrido este tiempo, se añadieron 40 µL de proteína G-Sepharosa 4B, y se incubaron durante 3 horas más en las mismas condiciones. A continuación, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 15 segundos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las bolitas de Proteína G-Sepharosa 4B 3 veces con 1 mL de Tampón de Lisis, tras lo cual se eluyó el inmunocomplejo de TAB2 con 50 µL de Tampón de Carga 2X. Las muestras fueron hervidas 10 minutos a 95°C, se centrifugaron y se recogió el sobrenadante. El análisis proteico del inmunocomplejo se realizó mediante Western Blot.

### *2.8. Inmunodetección de proteínas por Western Blot.*

Para detectar niveles de expresión de proteínas en extractos celulares totales, tras tratar a las células se despegaron con rascador en 30  $\mu$ l de Tampón de Carga 1X y se sonicaron. Para detectar proteínas fosforiladas, se aspiró el medio de la placa, se lavaron las células con 1 ml de PBS frío y a las células de la placa se le añadieron 30  $\mu$ l de Tampón de Lisis (50 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, Tritón X-100 al 1%, 10 mM de Glicerofosfato Sódico, 50 mM de NaF, 1 mM de Ortovanadato Sódico, 5mM de Pirofosfato Sódico, 27 mM de Sacarosa e inhibidores de proteasas) y se recogieron con raspador. Se dejaron 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 13000 rpm. Se recogió el sobrenadante, al que se le añadió Tampón de Carga 5X (250 mM de Tris-HCl a pH 6.8, 500 mM de DTT, SDS al 10%, Glicerol al 20% y Azul de Bromofenol al 0.2%).

Las proteínas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida (Acrilamida (Biorad; Hercules, CA, USA) , Tampón de Empaquetamiento 4X (pH 8.8, 1 mM de Tris-HCl y SDS al 0.4% ), Tampón de Separación 4X (pH 6.8, 500 mM de Tris-HCl y SDS al 0.4%), APS y Temed (Sigma; St. Louis, MO, USA)) al 7.5%, 10% o 12% dependiendo del tamaño de la proteína a detectar, para lo cual, las muestras fueron previamente hervidas durante 5 minutos a 95°C. El gel se corrió en un Tampón de Electroforesis 1X (pH 8.3, 25 mM Tris-HCl, Glicina 200 mM y SDS al 0.1%) a 160 V durante 1 h aproximadamente.

A continuación, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore; Billerica, MA, USA), previamente humedecida con Tampón de Transferencia (4.8 mM Tris-HCl, 3.9 mM Glicina, Glicerol al 3.7x10<sup>-3</sup>% y Metanol al 20%), mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans- Blot SD (BioRad; Hercules, CA, USA) a 50 mA por gel durante una hora.

La membrana se bloqueó con una solución de PBS 0.1% Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) con leche en polvo desnatada al 5% o de TBS 0.1% Tween-20 con BSA (Albúmina sérica bovina) (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 5% para la detección de proteínas fosforiladas durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Después se lavó con PBS-Tween o TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo correspondiente durante una

hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación. Se volvió a lavar 3 veces con PBS-Tween o TBS-Tween durante 5 minutos y finalmente se incubó durante otra hora con el anticuerpo secundario que correspondía, que lleva acoplado la peroxidasa del rábano picante (HRP). De nuevo se lavó tres veces durante 5 minutos cada vez con PBS-Tween o TBS-Tween. Finalmente, la membrana se incubó con el reactivo ECL (Millipore, Billerica, MA, USA) durante 5 minutos y se reveló mediante quimioluminiscencia.

### *2.9. Fraccionamiento celular.*

Para detectar la liberación de citocromo C de la mitocondria y la traslocación de Bax del citosol a la mitocondria tras un estímulo apoptótico, se separaron la fracción mitocondrial (membranosa) de la citosólica. Para ello se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en 30  $\mu$ l de Tampón de Lisis frío (80 mM de KCl, 250 mM de Sacarosa, 100  $\mu$ g/mL de Digitonina, 0.1 mM de PMSF (Fenilmetilsulfonil Fluoruro, Boehringer Ingelheim GmbH; Ingelheim, Alemania), 1mM de DTT e inhibidores de proteasas en PBS). Tras incubar en hielo durante 6 minutos, se centrifugaron 5 minutos a 10.000 rpm en frío y se recogió el sobrenadante (fracción citosólica). El precipitado (fracción mitocondrial y nuclear) se lavó con PBS y resuspendió en Tampón de Carga 1X. Se cargaron 50  $\mu$ g de la fracción citosólica y una cantidad proporcional de la fracción mitocondrial en geles de SDS-poliacrilamida tal y como se explica en el apartado 2.8.

### *2.10. Medida de la concentración de proteína.*

Con el fin de cuantificar la cantidad de proteína que se había obtenido tras recoger las células, se utilizaron los reactivos de BioRad (Hercules, CA, USA): Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent A, B y S. Para ello, se hizo una curva patrón con BSA desde 1  $\mu$ g/ $\mu$ l hasta 10  $\mu$ g/ $\mu$ l, sobre la cual se extrapolaron los valores obtenidos de las muestras y se obtuvo la concentración de proteína. En primer lugar, se añadieron 5  $\mu$ l de muestra (o una cantidad menor, pero siempre completando hasta 5  $\mu$ l con el

tampón de lisis en que estuviera diluida la muestra), a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con el fondo plano. En el caso del blanco, se añadieron 5 µl de tampón. A continuación, se añadieron 25 µl de la Solución A' (formada por 1 mL de Solución A y 20 µl de Solución S). Y se adicionaron 200 µl del Reactivo B. Se dejó incubando 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en el lector de microplacas Varioskan Flash (Termo Electron Corporation).

### *2.11. Transfección transitoria por DHARMAFECT para silenciamiento de proteínas.*

Para obtener el silenciamiento de alguna proteína de la célula, se transfectaron de forma transitoria con RNAs de interferencia (siRNAs: small interference RNA). Así pues, se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos en medio sin antibiótico. Al día siguiente, se le añadieron 2 ml de medio de transfección a cada pocillo y se incubó durante 24 ó 48 h según el oligo. Pasado este tiempo, se puso el tratamiento correspondiente a las células.

El medio de transfección se componía de 50 nM de oligo (excepto en los no tratados (NT)), Dharmafect (Dharmacon, Colorado, USA) y Optimem (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA). La preparación del medio constaba de dos pasos. En el primero se mezclaban durante 5 minutos a T.A. el Dharmafect con el Optimem. A continuación, se añadía esta mezcla a los oligos y se dejaba 20 minutos a temperatura ambiente. En ese tiempo, se lavaban los pocillos con Optimem y se les añadía 1.6 mL del mismo a cada uno. Tras los 20 minutos de incubación, se repartían 400 µl de la mezcla Dharmafect/Oligo/Optimem al pocillo correspondiente.

### *2.12. Infecciones adenovirales.*

Para la expresión en la línea celular tumoral de mama MDA-MB-231 de las construcciones indicadas en el apartado 1.6. *Construcciones Adenovirales*, se usaron adenovirus producidos por Viraquest Inc (North

Liberty, IA, USA), amablemente cedidos por el Dr. David Carling (Cellular Stress Group, Hammersmith Hospital, London, UK). En todos los casos, se sembraron  $2.85 \times 10^5$  células por placa, en placas de 35 mm de diámetro. La infección se llevó a cabo incubando las células durante 16 h con 100 PFU (*Plaque Forming Units*, Unidades de Formación de Placa) por célula, es decir, 100 MOI (*Multiplicity Of Infection*, Multiplicidad de Infección) de adenovirus en un volumen limitante de medio libre de suero conteniendo 10.8  $\mu\text{g/mL}$  de Factor de Coagulación X (Bioscience, Cambridge, UK), el cual facilita la infección de las células MDA-MB-231 por los adenovirus [Parker et al., 2007]. Pasadas 16 h, se suplementó el volumen de infección con 2 mL de medio completo y se incubó durante 8-24 h más, tras lo cual se trataron o recogieron las células, según el experimento.

### *2.13. Inmunoprecipitación de AMPK y medida de actividad AMPK 'in vitro'.*

Para inmunoprecipitar AMPK, endógena y/o sobreexpresada, las células se recogieron con rascador en Tampón de Lisis A frío (50 mM de HEPES a pH 7.4, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 50 mM de NaF, Tritón X-100 al 1%, 100 mM de NaCl e inhibidores de proteasas). Se dejaron 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 13000rpm. Se midió la concentración de proteína y se incubaron durante 16 h a 4°C 100  $\mu\text{g}$  de proteína con 10  $\mu\text{L}$  de Proteína G-Sepharosa 4B y 1 ó 2  $\mu\text{L}$  de anticuerpo frente AMPK $\alpha$ 1 o AMPK $\alpha$ 2 respectivamente por muestra; o con 10  $\mu\text{L}$  de Proteína A-Sepharosa 4B y 0.5  $\mu\text{L}$  de anticuerpo frente a AMPK $\beta$  por muestra, según se pretenda inmunoprecipitar los trímeros de AMPK $\alpha$ 1, AMPK $\alpha$ 2 o ambos (AMPK $\beta$ ). Estos anticuerpos fueron amablemente cedidos por el Dr. David Carling (Cellular Stress Group, Hammersmith Hospital, London, UK). Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 6.000 rpm durante 30 segundos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las bolitas 3 veces con 500  $\mu\text{L}$  de Tampón de Lisis A frío y otras 3 veces con 500  $\mu\text{L}$  de Tampón de Lisis A' (50 mM de HEPES a pH 7.4, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 50 mM de NaF, Tritón X-100 al 1%, Glicerol al 10% e inhibidores de proteasas).

La actividad de estos inmunocomplejos anclados a la resina se determinó por fosforilación radiactiva del péptido sintético SAMS,

amablemente cedido por el Dr. David Carling (Cellular Stress Group, Hammersmith Hospital, London, UK), cuya secuencia completa (HMRSAMSGHLHLVKRR) es una secuencia consenso de fosforilación por AMPK [Davies et al., 1989]. El ensayo de actividad se realizó incubando los inmunocomplejos en 25  $\mu$ L de Tampón de Ensayo conteniendo 10 mM de HEPES a pH 7.4, 0.2 mM de DTT, 0.2 mM de EDTA, 10 mM de NaF, Tritón X-100 al 0.2%, Glicerol al 0.2%, inhibidores de proteasas, 0.2 mM de péptido SAMS, 5 mM de  $MgCl_2$ , 0.2 mM de  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$  (radioactividad específica aproximada de 200 cpm/pmol) y 200  $\mu$ M de AMP, a no ser que se indique lo contrario. La incubación se llevó a cabo durante 20 minutos a 37°C en continua agitación dentro de una campana de metacrilato para evitar la exposición al fósforo radiactivo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la solución de incubación radiactiva se traspasó a un trozo de Papel Cromatográfico intercambiador de cationes p81 (Whatman, GE Healthcare, UK) de 4  $cm^2$ , al cual se unirá el péptido SAMS por tener una cola de alanina. Este papel p81 con el péptido unido se lavó tres veces con Ácido Fosfórico al 1% para eliminar el ATP radiactivo sobrante. A continuación se introdujeron los papeles en tubos de centelleo con 5 ml de Líquido de Centelleo y se midieron, adquiriendo los datos con el programa QuantaSmart, en un Contador de Centelleo.

Para la manipulación de material radiactivo se emplearon pantallas protectoras de metacrilato, así como ropa y guantes protectores. Los resultados se muestran como porcentaje de actividad con respecto a las muestras controles.

#### *2.14. Fosforilación del DISC de TRAIL 'in vitro'.*

Para determinar si algún componente del DISC de TRAIL fuese diana de la kinasa AMPK, el DISC se inmunoprecipitó tal y como se indica en el apartado 2.6. Una vez adherido el complejo a las bolitas de agarosa/estreptavidina y tras 6 lavados con 500  $\mu$ l de tampón de lisis, se incubó en presencia de AMPK recombinante [Neumann et al., 2003], activada 'in vitro' por CaMkk $\beta$  recombinante [Woods et al., 2005], 10 mM de HEPES a pH 7.4, 0.2 mM de DTT, 0.2 mM de EDTA, 10 mM de NaF, Tritón X-100 al 0.2%, Glicerol al 0.2%, inhibidores de proteasas, 200  $\mu$ M de AMP y 10  $\mu$ M de  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$  (radioactividad específica aproximada de 10000 cpm/pmol). La incubación se llevó a cabo durante 20 minutos a

37°C en continua agitación dentro de una campana de metacrilato. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los inmunoprecipitados en Tampón de Carga 1X. Tras hervir las muestras a 95°C durante 5 minutos, se corrieron en un gel de SDS-poliacrilamida, tal y como se indica en el apartado 2.8. Una vez corrido el gel, éste se tiñó con Coomassie Blue (0.25% de Coomassie Blue, 45% de Metanol y 10% de Ácido Acético Glacial) durante 16 h a T.A. Tras lavar abundantemente con agua, el gel se secó en un secador de geles durante 2 h a 65°C. A continuación, se expuso el gel sobre una película fotográfica durante el tiempo necesario, tras lo cual se reveló mediante quimioluminiscencia.

#### *2.15. RT-PCR (Transcripción reversa de RNA y amplificación de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)).*

El RNA total de las células se extrajo usando el sistema de aislamiento de RNA, TRIzol (Invitrogen; Eugene, Oregon, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Partiendo de 1µg de RNA total y utilizando un kit de Transcriptasa Reversa M-MLV (Gibco BRL 28025-013) se sintetizó el DNA complementario. De este DNA complementario se tomaron 2 µL para la amplificación del DNA por PCR.

Las condiciones de PCR para la amplificación de CaMkkβ fueron las siguientes: 10 min a 95°C, 35 ciclos de: 15 seg a 95°C, 30 seg a 55°C y 3 min a 72°C. De los productos amplificados se cargaron 10 µL en 2 µL Tampón de Carga 6X (New England Biolabs Inc.; Ipswich, MA, USA) en un gel al 1.5% de Agarosa (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) en Tampón TAE 1X (4.84 g/L de TRIS-BASE, 1 mM de EDTA y 1.1 mL de Ácido Acético Glacial) con 0.5 µg/mL de Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA).

Las condiciones de PCR para la amplificación de TAB2 fueron las siguientes: 2 min a 95°C, 35 ciclos de: 15 seg a 95°C, 1 min a 55°C y 45 seg a 72°C finalizando con 5 min a 72°C. Los productos amplificados se cargaron en un gel de Agarosa al 1%.

Las condiciones de PCR para la amplificación de TRAIL-R2 fueron las siguientes: 2 min a 94°C, 30 ciclos de: 30 seg a 94°C, 1 min a 64°C y 1 min a 72°C finalizando con 5 min a 72°C. Los productos amplificados se cargaron en un gel de Agarosa al 1%.

Las condiciones de PCR para la amplificación de FLIP<sub>L</sub> y FLIP<sub>S</sub> fueron las siguientes: 2 min a 94°C, 30 ciclos de: 40 seg a 94°C, a 40 seg 60°C y 40 seg a 72°C finalizando con 10 min a 72°C. Los productos amplificados se cargaron en un gel de Agarosa al 1%.

#### *2.16. Análisis estadístico.*

Se unieron experimentos independientes cuando se asumió un coeficiente de varianza idéntico. La significación estadística se evaluó mediante el análisis de T-Test (n= número de experimentos independientes). Un valor de p menor de 0.05 se consideró significativo.





## VI. RESULTADOS



## **CAPÍTULO 1: Activadores de AMPK sensibilizan a las células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.**

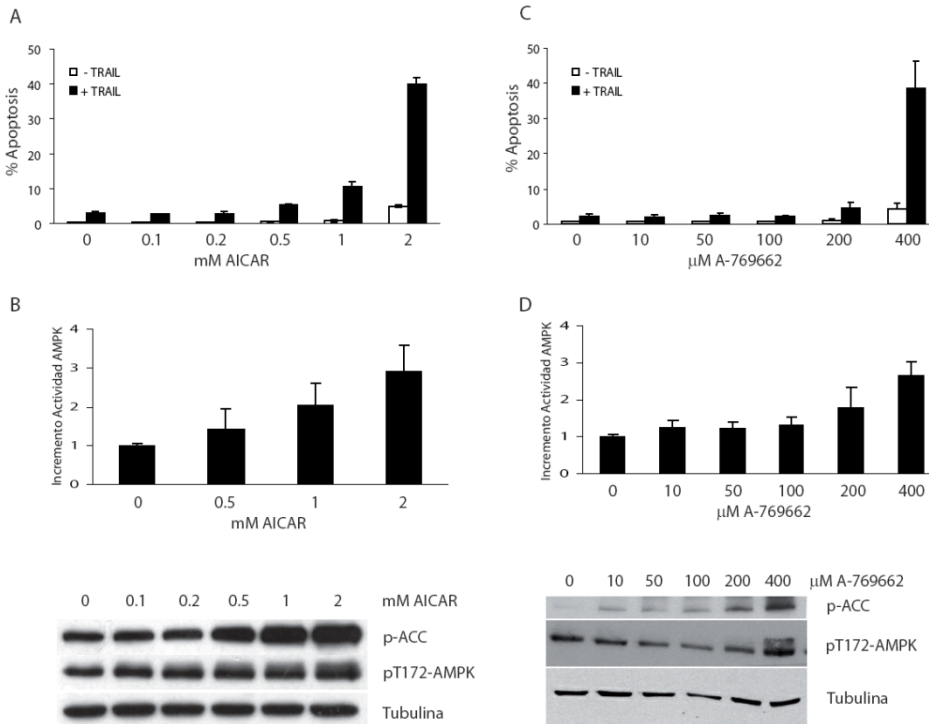
### *1. AICAR, A-679662, Fenformina y la limitación de glucosa sensibilizan a células tumorales a la apoptosis inducida por TRAIL.*

A pesar de que la función de AMPK en el metabolismo y mantenimiento de la homeostasis energética celular está muy estudiada, la implicación de AMPK en la proliferación y supervivencia celular no está tan bien definida y resulta controvertida. Existen estudios donde se ha propuesto a AMPK como una molécula antiapoptótica que protege a determinados tipos celulares de la muerte inducida por isquemia [Russell et al., 2004], hiperglicemia [Ido et al., 2002], ácidos grasos [Kim et al., 2008] y ceramida [Guenther et al., 2008]. Sin embargo, otros estudios proponen un papel de AMPK proapoptótico en determinados tipos de células tumorales, como por ejemplo que su activación por AICAR sensibiliza a células de adenocarcinoma de colon humano a la apoptosis inducida por TRAIL y TNF [Su et al., 2007].

Por otro lado, en trabajos anteriores del grupo se determinó la existencia de un control metabólico de la sensibilidad a la apoptosis [Munoz-Pinedo et al., 2004; Munoz-Pinedo et al., 2003]. En uno de estos trabajos se demostró la sensibilización de diversas células tumorales a la apoptosis mediada por TRAIL en condiciones de falta de glucosa en el medio extracelular, aunque está aún por determinar el mecanismo molecular de esta sensibilización [Munoz-Pinedo et al., 2003]. La privación de glucosa en estos estudios producía un descenso del estado energético celular, disminuyendo la concentración de ATP intracelular, por lo que era posible que AMPK, principal sensor del estado energético de la célula, estuviera implicada en esta sensibilización.

A partir de estos datos previos y con el objetivo de estudiar la posible implicación de AMPK en el control metabólico de la sensibilidad a TRAIL en células tumorales de mama, se testaron varios compuestos activadores de AMPK en la línea humana tumoral de mama MDA-MB231. En primer lugar, se pretrataron estas células con dosis crecientes de AICAR, el activador directo de AMPK de uso más extendido, antes de añadir TRAIL

al medio de cultivo (figura 1A). Puede observarse cómo estas células, las cuales son muy resistentes a TRAIL, tras dosis altas de AICAR (a partir de 1 mM y, sobre todo, tras un pretratamiento de 2 mM de AICAR) se sensibilizaban a la apoptosis inducida por TRAIL (cuantificada como porcentaje de células en la región sub-G1 por citometría de flujo).



**Figura 1: AICAR, A-769662, limitación de glucosa y Fenformina sensibilizan a la línea tumoral de mama MDA-MB-231 a la apoptosis inducida por TRAIL (I).**

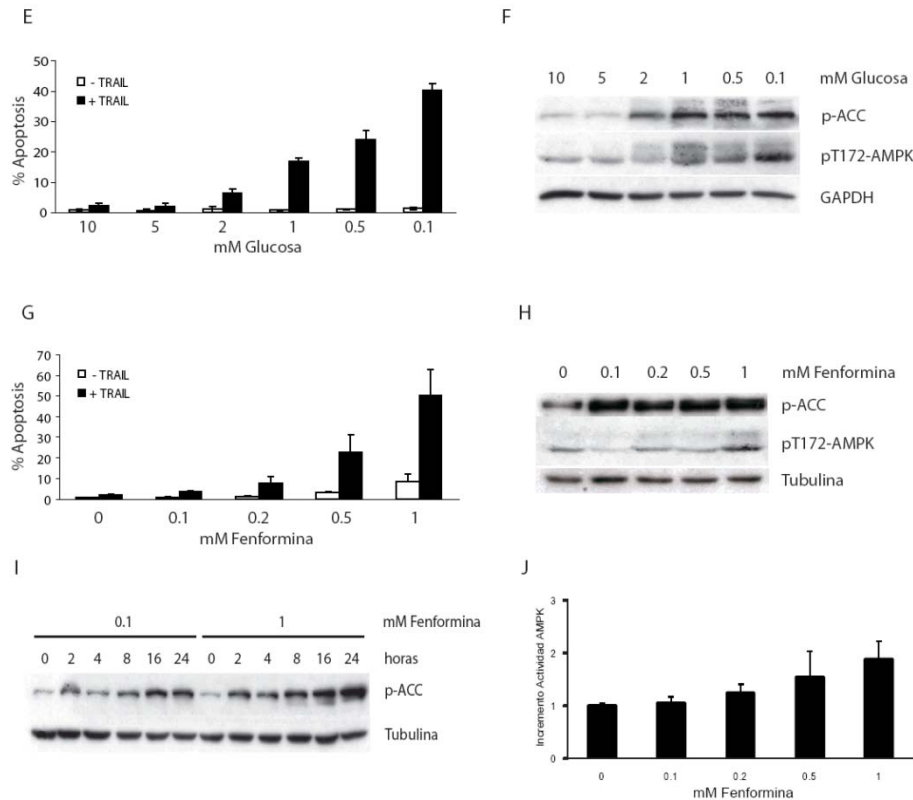
Las células MDA-MB231 fueron incubadas con las concentraciones indicadas de AICAR (A, B) o A-769662 (C, D) durante 8 horas antes de añadir TRAIL soluble recombinante (1  $\mu$ g/mL). La apoptosis se midió 16 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo tal como se describe en Materiales y Métodos (A, C). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes. Los niveles de p-ACC, p-AMPK y tubulina como control de carga se determinaron por Western Blot al final del periodo de pretratamiento (B, D). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes. La medida de actividad 'in vitro' de AMPK $\alpha$ 1 se midió tal como se describe en Materiales y Métodos (B, D). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes.

Al mismo tiempo, los niveles de activación de AMPK por estos tratamientos fueron cuantificados por dos métodos distintos. Por un lado, se analizaron por Western Blot los niveles de fosforilación tanto de AMPK

como de la Acetil-CoA Carboxilasa (ACC), principal sustrato de AMPK [Carling et al., 1987; Sim and Hardie, 1988], cuya fosforilación depende del estado de activación de AMPK. Por otro lado, se midió la actividad de AMPK 'in vitro' tal y como se describe en Materiales y Métodos. La línea celular MDA-MB231 apenas tenía actividad AMPK $\alpha$ 2 (datos no mostrados), por lo que esta medida de actividad 'in vitro' se hizo únicamente midiendo la actividad de complejos AMPK $\alpha$ 1 $\beta$  $\gamma$ . Con ambas aproximaciones se observó cómo las dosis de AICAR 1 y 2 mM eran las que activaban en mayor medida a AMPK (figura 1B), correlacionándose así los niveles de activación de dicha quinasa con el grado de sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL tras estos tratamientos. En este trabajo, las dosis de 1 y 2 mM fueron las elegidas para los consiguientes tratamientos en las células MDA-MB231 con AICAR debido a que conllevan a la activación de AMPK y sensibilización a TRAIL sin afectar a la viabilidad de las células.

A continuación se testó otro activador directo de AMPK: A-769662, una nueva molécula identificada recientemente y considerada como un activador específico para AMPK [Cool et al., 2006]. Tras un pretratamiento con este compuesto se observó que, al igual que AICAR, dosis altas del mismo (400  $\mu$ M) sensibilizaban a las células MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL (figura 1C). Del mismo modo, los niveles de activación de AMPK eran mayores bajo la dosis de 400  $\mu$ M de A-769662 (figura 1D), correlacionándose así una mayor activación de AMPK con la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL en estas células.

Con el fin de ampliar el espectro de estímulos activadores de AMPK, se mantuvieron las células MDA-MB231 en condiciones de baja concentración de glucosa extracelular y se observó el grado de sensibilización a TRAIL. Igual que en el caso de los activadores directos de AMPK, este estímulo sensibilizaba más a TRAIL cuanto mayor era la restricción de glucosa en el medio extracelular, observándose sensibilización a partir de 1 mM de glucosa (figura 1E). Se observó que, efectivamente, la activación de AMPK medida como niveles de fosforilación de ACC, era mayor cuanto menor era la concentración de glucosa en el medio de cultivo (figura 1F).



**Figura 1:** AICAR, A-769662, limitación de glucosa y Fenformina sensibilizan a la línea tumoral de mama MDA-MB-231 a la apoptosis inducida por TRAIL (II).

Las células MDA-MB231 fueron incubadas con las concentraciones indicadas de glucosa (E,F) o Fenformina (G, H, I) durante 16 horas antes de añadir TRAIL soluble recombinante (1 µg/mL). La apoptosis se midió 24 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (E, G). El histograma muestra los valores +/- DE de tres experimentos independientes. Los niveles de p-ACC, p-AMPK, tubulina y GAPDH como control de carga se determinaron por Western Blot al final del periodo de pretratamiento (F, H). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes. La medida de actividad 'in vitro' de AMPKα1 se midió tal como se describe en Materiales y Métodos (I). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes.

En la cinética de activación de AMPK, las células MDA-MB231 fueron tratadas durante los tiempos indicados con 0.1 y 1 mM de Fenformina; y los niveles de p-ACC y tubulina como control de carga se determinaron por Western Blot (I). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Otro de los estímulos utilizados fue Fenformina, un inhibidor de la cadena transportadora de electrones mitocondrial [Davidoff, 1971; Steiner and Williams, 1958], que provoca una disminución de los niveles de ATP intracelulares, activando así indirectamente a AMPK. Se observó que, del mismo modo que con el resto de estímulos utilizados, altas dosis de Fenformina, como 0.5 y 1 mM, sensibilizaban a la apoptosis inducida

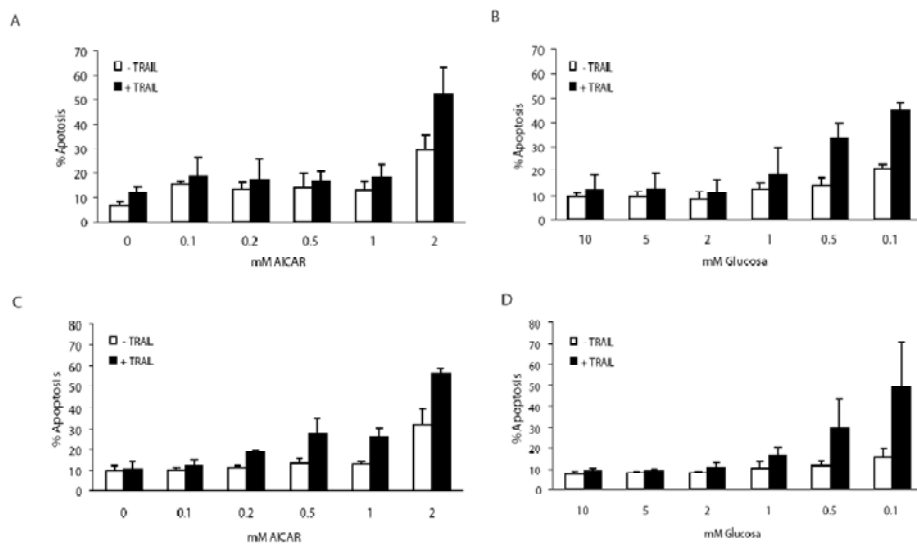
por TRAIL (figura 1G). A diferencia de los otros compuestos, tanto dosis de Fenformina sensibilizantes como no sensibilizantes a TRAIL activaban a AMPK en grados similares, atendiendo a los niveles de p-ACC (figura 1H). Para estudiar esta diferencia, se realizó una cinética de activación de AMPK por Fenformina usando dos dosis extremas, una muy baja que no sensibilizaba a TRAIL (0.1 mM) y otra alta (1 mM), la cual sí sensibilizaba claramente a la apoptosis inducida por TRAIL. Se obtuvieron como resultado dos cinéticas de activación de AMPK muy parecidas (figura 1I), con un pico inicial de activación de AMPK a las 2 horas y otro posterior de mayor intensidad a las 8-16 horas. La única diferencia se observaba a tiempos más largos (24 horas) en los que la dosis de 1 mM mantenía los niveles de p-ACC más elevados que la dosis de 0.1 mM. Cuando se realizó un ensayo de actividad AMPK 'in vitro' se observó que la activación de AMPK obtenida por Fenformina era bastante más débil que aquella obtenida con AICAR y A-679662, y sólo detectable por este método en dosis de 0.5 mM o superiores, las cuales eran las dosis que sensibilizaban a la apoptosis inducida por TRAIL (figura 1J).

Ya que ACC es el sustrato principal de AMPK y se fosforila rápidamente en cuanto existe una mínima activación de dicha quinasa, se supuso que, a pesar de observar un aumento en los niveles de p-ACC a dosis muy bajas de Fenformina, este aumento no era suficiente para ser detectado en un ensayo de actividad 'in vitro' y, por lo tanto, para sensibilizar a TRAIL, hasta que no se alcanzan dosis mayores de la misma. Estas dosis de 0.5 y 1 mM de Fenformina no activaban en tan alto grado a AMPK en comparación con AICAR o A-769662, lo cual no producía un gran aumento en los niveles de fosforilación de ACC con respecto a dosis menores.

A continuación, y con el fin de determinar si esta sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL por activadores de AMPK observada en las células MDA-MB231 se reproducía en otras líneas celulares, testamos dos de estos estímulos, AICAR y limitación de glucosa en el medio extracelular, en las líneas celulares tumorales de mama humanas BT474, MDA-MB435s y MCF7.

La línea celular BT474 es, al igual que la MDA-MB231, resistente a TRAIL (figura 2A y 2B); pero tras el tratamiento con una dosis de AICAR de

2 mM (figura 2A) o concentraciones de glucosa en el medio extracelular menores a 0.5 mM (figura 2B), se sensibilizaban a la apoptosis inducida por TRAIL.



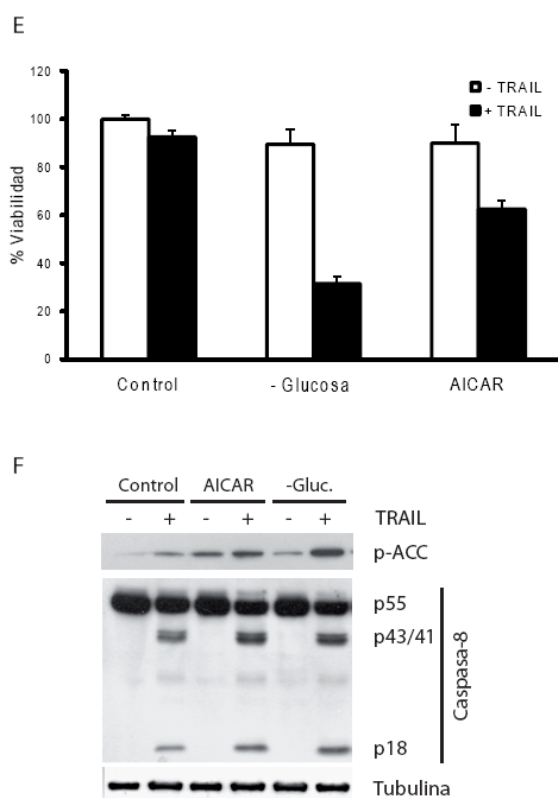
**Figura 2: AICAR y la limitación de glucosa sensibilizan a líneas humanas tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL (I).**

Las células BT474 fueron incubadas con las concentraciones indicadas de AICAR **(A)** o glucosa **(B)** durante 20 horas antes de añadir TRAIL soluble recombinante (250 ng/mL). La apoptosis se midió 24 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo **(A, B)**. Los histogramas muestran los valores  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las células MDA-MB435s fueron incubadas con las concentraciones indicadas de AICAR **(C)** o glucosa **(D)** durante 8 horas antes de añadir TRAIL soluble recombinante (25 ng/mL). La apoptosis se midió 16 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo **(C, D)**. Los histogramas muestran los valores  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

En el caso de la línea tumoral de mama MDA-MB435s, tras un pretratamiento de 8 horas con las concentraciones indicadas de AICAR o glucosa en el medio de cultivo, se incubó con una dosis baja de TRAIL (25 ng/mL) durante 16 horas, ya que esta línea celular, a diferencia de las líneas MDA-MB231 y BT474, es sensible a la apoptosis inducida por TRAIL. Como puede observarse (figura 2C y 2D), las células MDA-MB435s eran resistentes a una dosis de 25 ng/mL de TRAIL, pero se sensibilizaron a la apoptosis tras un pretratamiento con dosis de AICAR de 2 mM (figura 2C) o concentraciones menores a 0.5 mM de glucosa en el medio extracelular (figura 2D).



La línea humana tumoral de mama MCF7, al igual que la anterior, es sensible a la apoptosis inducida por TRAIL, por lo que, en el estudio de sensibilización por activadores de AMPK, se realizaron incubaciones de 50 ng/mL de TRAIL, dosis a las cuales la línea MCF7 es parcialmente resistente al tratamiento (figura 2E). En estas células, del mismo modo que en las líneas celulares MDA-MB231, BT474 y MDA-MB435s, se observó cómo tratamientos con AICAR o privación de glucosa en el medio de cultivo, producían un descenso en la viabilidad celular, cuantificada por tinción con Cristal Violeta, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En el caso de la línea MCF7 no se puede estimar el grado de apoptosis midiendo el porcentaje de población en sub-G1 por citometría de flujo, ya que esta línea celular es deficiente en la expresión de caspasa-3 [Janicke et al., 1998], última caspasa efectora de la cascada apoptótica. Por lo tanto, la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL en este tipo celular por estos activadores de AMPK se determinó complementando los datos de viabilidad (figura 2E) con la detección de un aumento en la fragmentación de caspasa-8 bajo estos tratamientos (figura 2F).



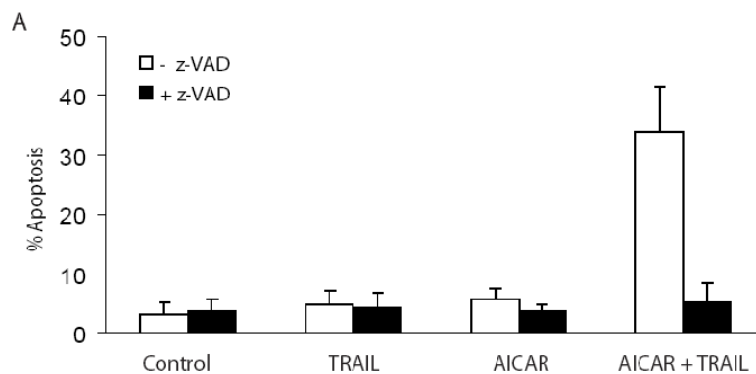
**Figura 2: AICAR y la limitación de glucosa sensibilizan a líneas humanas tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL (II).**

Las células MCF7 fueron incubadas con AICAR 1 mM o medio de cultivo libre en glucosa con o sin TRAIL soluble recombinante a una concentración de 50 ng/mL durante 16 horas. El porcentaje de viabilidad en el cultivo celular se obtuvo por tinción con Cristal Violeta tal como se describe en Materiales y Métodos (E). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes. Para detectar la fragmentación de caspasa-8, las células MCF7 fueron tratadas durante 4 horas con AICAR 1 mM o privación de glucosa en el medio extracelular con o sin TRAIL a 50 ng/mL. A continuación se recogieron las células en Tampón de Lisis y se analizaron los niveles de p-ACC, caspasa-8 y tubulina como control de carga por Western Blot (F). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

En conjunto, estos datos demuestran que diversos activadores de AMPK sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL en diferentes líneas humanas tumorales de mama, lo cual apunta hacia la existencia de un control metabólico de la sensibilidad a TRAIL en estos tipos celulares.

*2. La sensibilización a TRAIL inducida por AICAR requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial.*

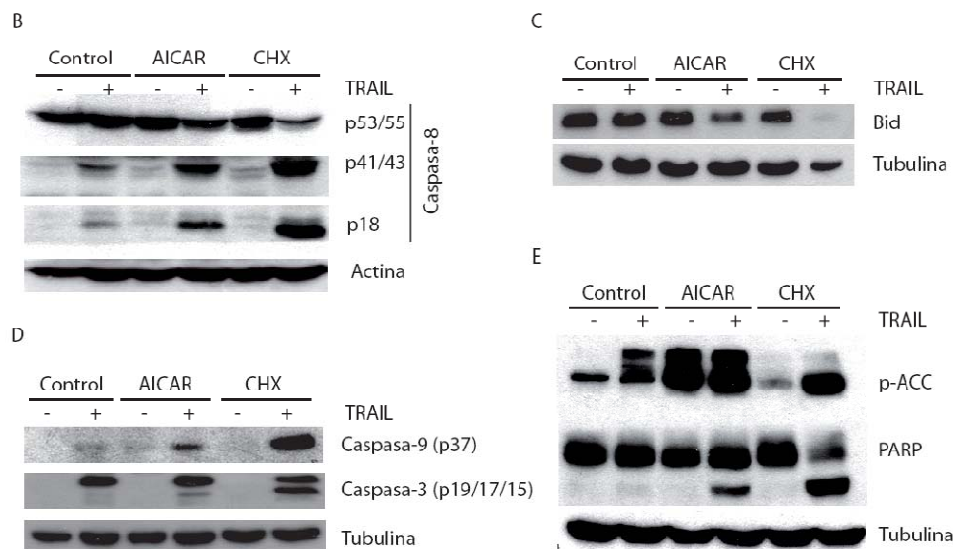
Con el fin de determinar el mecanismo subyacente a la sensibilización a TRAIL observada tras los tratamientos activadores de AMPK, se eligió como modelo de estudio el tratamiento de la línea tumoral de mama MDA-MB321 con AICAR. El primer paso fue demostrar que el mecanismo de muerte observado era apoptosis dependiente de caspasas. Para ello, se pretrataron las células con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk durante 1 hora, antes de sensibilizarlas a la apoptosis inducida por TRAIL con AICAR. Como resultado se obtuvo una inhibición completa de la sensibilización a TRAIL (figura 3A). Esto confirmaba la hipótesis de que la muerte observada tras estos tratamientos correspondía a un mecanismo de apoptosis dependiente de caspasas.



**Figura 3:** La sensibilización a TRAIL inducida por AICAR requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial (II).

Las células MDA-MB321 fueron incubadas con AICAR 2 mM durante 8 horas antes de la adición de TRAIL soluble recombinante (1  $\mu$ g/mL); 10  $\mu$ M de z-VAD-fmk fueron añadidos 1 hora antes del tratamiento. La apoptosis se midió 16 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (A). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes.

A continuación se analizó la ruta de activación de apoptosis inducida por TRAIL tras la sensibilización con AICAR. Así, las células se pretrataron durante 16 horas con AICAR 1 mM o durante 1 hora con 5  $\mu$ g/mL de Cicloheximida, inhibidor de la síntesis de proteínas, como control positivo de sensibilización a TRAIL, para posteriormente ser incubadas con 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 4 horas. El tiempo de tratamiento con TRAIL se redujo de 16 a 4 horas con el fin de observar la activación de la ruta apoptótica previa a la ejecución de la muerte celular en más del 50% del cultivo.



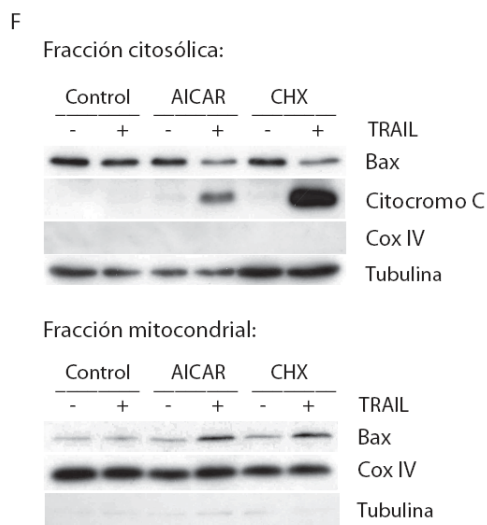
**Figura 3:** La sensibilización a TRAIL inducida por AICAR requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial (II).

Las células MDA-MB231 fueron incubadas con AICAR 1mM durante 16 horas o Cicloheximida (CHX) 5  $\mu$ g/mL durante 1 hora antes de la adición de TRAIL soluble recombinante (1  $\mu$ g/mL). Las células se recogieron en Tampón de Lisis 4 horas después de añadir TRAIL y los niveles de fragmentación de caspasa-8 (B), bid (C), caspasa-3 y caspasa-9 (D), PARP y p-ACC (E) se analizaron por Western Blot. Los niveles de tubulina y actina se usaron como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Bajo estas condiciones se observó la fragmentación y consecuente activación de la caspasa iniciadora, caspasa-8, al tratar con TRAIL las células MDA-MB231, previamente sensibilizadas con AICAR (figura 3B). Del mismo modo, se observó la fragmentación de la caspasa efectora,

caspasa-3 (figura 3D) y la fragmentación de PARP (figura 3E), indicativa de la ejecución de un mecanismo de muerte apoptótica. Al mismo tiempo se observó el procesamiento de bid (figura 3C), necesario para la activación de la ruta apoptótica mitocondrial por caspasa-8, y la activación de la caspasa iniciadora caspasa-9 (figura 3D), apuntando a la implicación de la vía mitocondrial apoptótica en el mecanismo de sensibilización a TRAIL. Además, se observó que TRAIL, por sí sólo, era capaz de inducir la activación de AMPK, reflejada en la fosforilación de su principal sustrato, ACC (figura 2F y 3E). Un estudio en profundidad de esta activación de AMPK por TRAIL y de los mecanismos subyacentes a la misma se describe más adelante en el Capítulo 3 de este trabajo de investigación.

Para demostrar la activación de la ruta apoptótica mitocondrial inducida por la sensibilización a TRAIL por AICAR en estas células, se procedió al análisis de la liberación de citocromo C mitocondrial al citosol en las condiciones sensibilizantes a TRAIL. Para ello, se realizó un ensayo de fraccionamiento celular donde se observó un aumento de citocromo C citosólico, al mismo tiempo que se observó una traslocación del bax citosólico a la fracción mitocondrial (figura 3F).



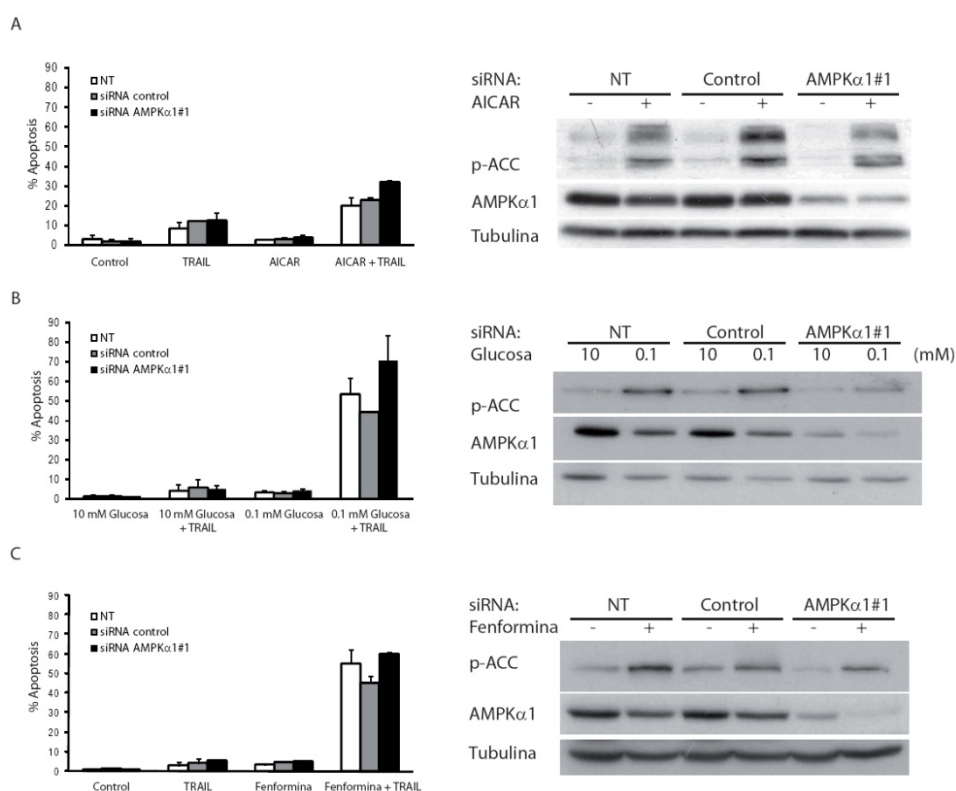
**Figura 3:** La sensibilización a TRAIL inducida por AICAR requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial (III).

Las células MDA-MB231 fueron incubadas con AICAR 2 mM durante 16 horas o CHX 5 µg/mL durante 1 hora antes de la adición de TRAIL soluble recombinante (1 µg/mL). Las células se recogieron mediante un ensayo de fraccionamiento celular 4 horas después de añadir TRAIL tal como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de citocromo C, bax, tubulina y cox IV como controles de carga se analizaron por Western Blot en ambas fracciones (F). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

En conjunto, los datos obtenidos demuestran que la sensibilización a TRAIL observada tras el tratamiento de las MDA-MB231 con AICAR está asociada con la activación de la vía apoptótica mitocondrial y concluye con una muerte apoptótica dependiente de actividad caspasa.

3. La sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL, observada tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con AICAR, A-769662, limitación de Glucosa y Fenformina, es independiente de la activación de AMPK.

El siguiente paso en el estudio de la sensibilización a TRAIL en células tumorales de mama por estímulos activadores de AMPK fue determinar la implicación de AMPK en esta sensibilización. Para ello, se disminuyeron los niveles de AMPK endógena usando un siRNA (RNA de interferencia) contra la subunidad catalítica AMPK $\alpha$ 1, tras lo cual se incubaron las células con AICAR 2 mM durante 16 horas antes de la adición de TRAIL al medio de cultivo (figura 4A, izquierda).



**Figura 4:** Una disminución en los niveles de AMPK $\alpha$ 1 por siRNA no reduce la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL tras el tratamiento con AICAR, limitación de Glucosa o Fenformina en las células tumorales de mama MDA-MB231.

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#1) durante 48 horas. Tras las 48 horas de la transfección las células se incubaron con AICAR 1 mM (**A**), 0.1 mM de Glucosa (**B**) o 1 mM de Fenformina (**C**) durante 16 horas antes de añadir 1  $\mu$ g/mL de TRAIL. Los niveles de p-ACC, AMPK $\alpha$ 1 y tubulina como control de carga fueron analizados por Western Blot (**A, B, C, derecha**). Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes. La apoptosis se midió 4 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (**A, B, C, izquierda**). Los histogramas muestran los valores +/- DE de dos experimentos independientes.

Contrariamente a lo esperado, no se obtuvo ninguna reducción de la sensibilización a TRAIL tras el pretratamiento con AICAR en las células en las que se había silenciado en parte la expresión de AMPK. Más aún, los niveles de sensibilización a TRAIL por AICAR eran mayores en las células con siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (figura 4A, columna negra) que en las no tratadas (NT) (figura 4A, columna blanca) o en las transfectadas con un siRNA control (figura 4A, columna gris). La disminución de los niveles de expresión de AMPK $\alpha$ 1, por otro lado, no eliminaban totalmente la fosforilación de ACC tras el tratamiento con AICAR (figura 4A, derecha); por lo que, posiblemente, el siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 no era suficientemente eficaz silenciando la proteína.

Para ampliar el estudio, se realizó el mismo experimento de silenciamiento de AMPK $\alpha$ 1 incubando las células con 0.1mM de Glucosa (figura 4B) o 1 mM de Fenformina (figura 4C). En ambos casos, no se obtuvo ninguna reducción en la sensibilización a TRAIL por estos estímulos al reducir parcialmente la expresión de AMPK (figuras 4B y 4C, izquierda, columnas negras). De nuevo, tras ambos tratamientos, se detectó activación de AMPK (figura 4B y 4C, derecha), a pesar del silenciamiento parcial de la expresión de AMPK $\alpha$ 1 tras la transfección con siRNA (figuras 4B y 4C, derecha).

Ya que con el silenciamiento de AMPK $\alpha$ 1 por siRNA no se obtuvo una disminución total en la expresión de AMPK ni diferencias en la sensibilización a TRAIL por estímulos activadores de AMPK, se abordó este estudio usando otras herramientas diferentes que proporcionasen resultados concluyentes.

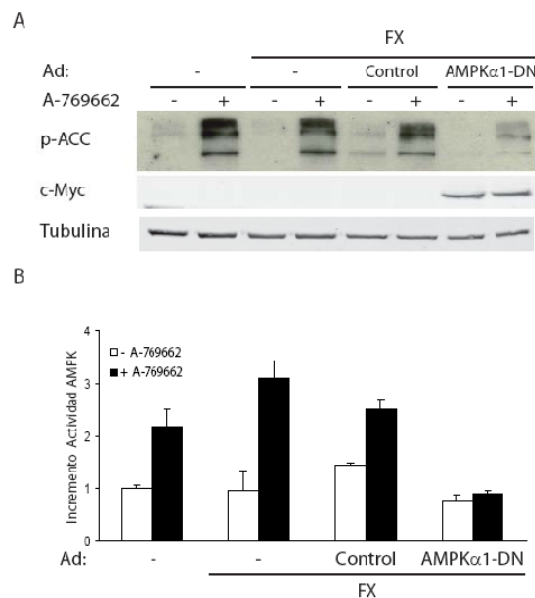
Para ello, en primer lugar, se trató de sobreexpresar en la línea tumoral de mama MDA-MB231 una subunidad AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1-DN) secuencia que codifica para AMPK $\alpha$ 1, con una mutación del ácido aspártico 157 a alanina que la convierte en dominante negativa, marcada con myc-tag [Stein et al., 2000; Woods et al., 2000]. Esta isoforma sobreexpresada compete con la isoforma AMPK $\alpha$ 1 endógena en la formación de la proteína trimérica AMPK, dando lugar a complejos proteicos inactivos (sin actividad quinasa).

Con esta herramienta se pretendía reducir más eficientemente la activación de AMPK, tanto basal como inducida, y determinar así la

implicación de esta quinasa en la sensibilización a TRAIL observada en este modelo celular tras diferentes tratamientos activadores de AMPK.

Dado que las células MDA-MB231 son muy difíciles de transfectar de manera eficiente, la sobreexpresión de esta construcción se obtuvo infectándolas con adenovirus recombinantes, amablemente cedidos por el Dr. David Carling (Cellular Stress Group, Hammersmith Hospital, London, UK). La infección se hizo en presencia del Factor de Coagulación X (FX), ya que facilita la infección de estas células por los adenovirus [Parker et al., 2007]. Utilizando este método, el porcentaje de infección en todos los experimentos osciló entre el 86 y el 100 % de células infectadas, utilizando como marcador un adenovirus conteniendo el DNA codificante para GFP y midiendo la población positiva para GFP por citometría de flujo.

Tal y como puede observarse en la figura 5A, la sobreexpresión en las células MDA-MB231 de esta isoforma inactiva (AMPK $\alpha$ 1-DN) redujo de forma significativa la activación de AMPK observada tras un tratamiento de 16 horas con A-769662 400  $\mu$ M; medida dicha activación como niveles de fosforilación de ACC por Western Blot. A diferencia de esto, la infección con adenovirus carentes de DNA codificante o el simple tratamiento durante 24 horas con Factor X no afectó en modo alguno a la activación de AMPK por el mismo tratamiento; lo cual apuntaba a que

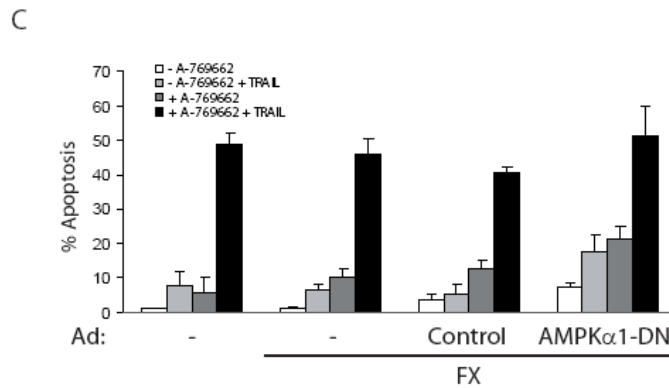


**Figura 5:** La inhibición de la actividad AMPK por un dominante negativo de AMPK $\alpha$ 1 no es suficiente para impedir la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL inducida por A-769662 en las células tumorales de mama MDA-MB231 (I).

**(A, B)** Las células MDA-MB231 se infectaron durante 24 horas con 100 PFU de adenovirus vacíos (Control) o con DNA codificante para una isoforma dominante negativa de AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1-DN), tal como se describe en Materiales y Métodos. Tras las 24 horas de infección, las células se incubaron con A-769662 (400  $\mu$ M) durante 16 horas tras lo cual se determinaron los niveles de p-ACC, c-Myc y tubulina como control de carga **(A)** y la actividad AMPK **(B)** tal como se describe en Materiales y Métodos. Los datos de p-ACC son representativos de tres experimentos independientes. Los histogramas muestran los valores  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

la isoforma AMPK $\alpha$ 1-DN competía con la isoforma AMPK $\alpha$ 1 endógena en la formación de complejos triméricos de AMPK, impidiendo su activación por diferentes estímulos. Se obtuvieron resultados similares midiendo la actividad AMPK 'in vitro' tras el tratamiento con A-769662 (figura 5B).

Sin embargo, a pesar de que la expresión de AMPK $\alpha$ 1-DN en las células MDA-MB231 reducía considerablemente la activación de AMPK por A-769662, la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL observada tras ese tratamiento no se vio reducida (figura 5C).



**Figura 5:** La inhibición de la actividad AMPK por un dominante negativo de AMPK $\alpha$ 1 no es suficiente para impedir la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL inducida por A-769662 en las células tumorales de mama MDA-MB231 (II).

(C) Las células MDA-MB231 se infectaron durante 24 horas con 100 PFU de adenovirus vacíos (Control) o con DNA codificante para una isoforma dominante negativa de AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1-DN), tal como se describe en Materiales y Métodos. Tras las 24 horas de infección, las células se incubaron con A-769662 como en A y B y luego se trataron con 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 24 horas. La apoptosis se midió como porcentaje de células en subG1. Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes.

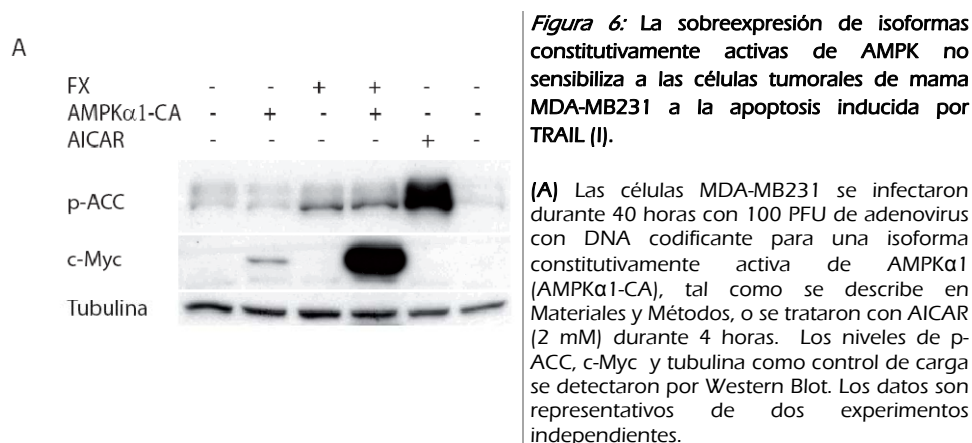
Este resultado apuntaba a que la activación de AMPK por los diferentes tratamientos usados en este trabajo era independiente de la sensibilización a TRAIL. Sin embargo, la sobreexpresión de AMPK $\alpha$ 1-DN, no eliminaba totalmente la activación de AMPK por estos estímulos, por lo que niveles muy bajos de actividad AMPK por encima del basal podrían ser suficientes para sensibilizar estas células a la apoptosis inducida por TRAIL.

Para abordar más directamente esta cuestión, se trató de sobreexpresar en la línea tumoral de mama MDA-MB231 una subunidad AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1-CA) con una mutación de la treonina 172 a ácido



aspártico, que la convierte en constitutivamente activa; marcada con myc-tag [Stein et al., 2000; Woods et al., 2000]. Se pretendía observar si la actividad AMPK por sí sola, independiente de estímulo, era suficiente para sensibilizar este modelo celular a la apoptosis inducida por TRAIL.

Como puede observarse en la figura 6A, la sobreexpresión de esta subunidad mutante de AMPK $\alpha$ 1 no se reflejó en un incremento de la actividad AMPK en este modelo celular, ya que no aumentaba los niveles de fosforilación de ACC más de lo que lo hacía el propio tratamiento con Factor X.



Por lo tanto, a continuación se optó por infectar la línea celular MDA-MB231 con adenovirus recombinantes que contenían las siguientes secuencias de DNA codificante:

1. AMPK $\gamma$ 1-R70Q/R298G: secuencia que codifica para la subunidad AMPK $\gamma$ 1, con dos mutaciones. La mutación de la arginina 70 a glutamina, convierte el trímero de AMPK en constitutivamente activo [Hamilton et al., 2001]; mientras que la mutación de la arginina 298 a glicina, la convierte en insensible a la activación por AMP [Sanders et al., 2007b].
2. AMPK $\gamma$ 2-R531G: secuencia que codifica para la subunidad AMPK $\gamma$ 2, con una mutación de la arginina 531 a glicina, que convierte el trímero de AMPK en algo más activo que el que contiene la isoforma salvaje de esta subunidad, pero insensible a la activación por AMP [Daniel and Carling, 2002; Gollob et al., 2001].

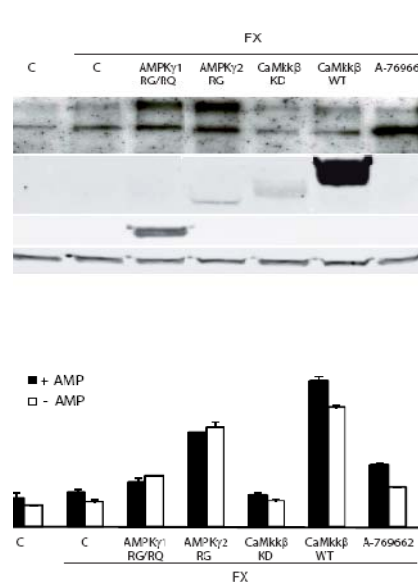
3. CaMkk $\beta$ -KD: secuencia que codifica para CaMkk $\beta$  con una mutación del aspártico 329 a alanina, lo que la convierte en catalíticamente inactiva [Woods et al., 2005].
4. CaMkk $\beta$ -WT: secuencia que codifica para CaMkk $\beta$  salvaje [Bright et al., 2008].

De esta forma, el objetivo era conseguir en nuestro modelo celular la sobreexpresión de proteína AMPK constitutivamente activa, sin necesidad de usar ningún estímulo externo como los tratamientos activadores de AMPK utilizados hasta este momento; o, en su defecto, activarla endógenamente con la sobreexpresión de una de sus quinasas principales, la CaMkk $\beta$  [Hawley et al., 2005; Woods et al., 2005].

Tal como puede observarse en la figura 6B, la sobreexpresión de AMPK $\gamma$ 1-RG/RQ y AMPK $\gamma$ 2-RG, tras 40 horas de infección con adenovirus recombinantes, fue suficiente para observar activación de AMPK. A continuación, para hacer un análisis más exhaustivo de la activación de AMPK por sobreexpresión de estas subunidades mutadas, se realizó un ensayo de actividad de la proteína AMPK 'in vitro', usando para precipitar un anticuerpo contra AMPK $\alpha$ 1 (figura 6C). Mediante este método fue posible observar diferencias entre la activación de AMPK ejercida por cada una de las subunidades  $\gamma$  mutantes y la activación observada tras un tratamiento de 16 horas de A-769662 a 400  $\mu$ M. En concreto, la activación de AMPK obtenida en células que sobreexpresaban AMPK $\gamma$ 2-RG fue mayor que la resultante del tratamiento con A-769662.

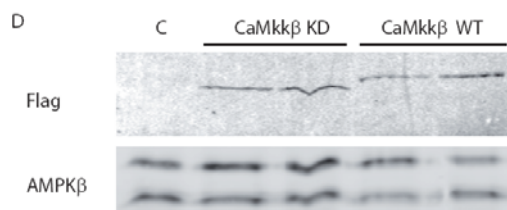
**Figura 6:** La sobreexpresión de isoformas constitutivamente activas de AMPK no sensibiliza a las células tumorales de mama MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL (II).

(B, C) Las células MDA-MB231 se infectaron durante 40 horas con 100 PFU de adenovirus con DNA codificante para una AMPK $\gamma$ 1-RG/RQ, AMPK $\gamma$ 2-RG, CaMkk $\beta$ -DN Y CaMkk $\beta$ -WT, tal como se describe en Materiales y Métodos, o se trataron durante 16 horas con A-769662 (400  $\mu$ M). Los niveles de p-ACC, Flag y tubulina como control de carga (B) y la actividad AMPK (C) tal como se describe en Materiales y Métodos. Los datos de p-ACC son representativos de dos experimentos independientes. Los histogramas muestran los valores  $\pm$  DE de dos experimentos independientes.



Sin embargo, mediante este mismo método (figura 6C), se observó una gran activación de AMPK tras la sobreexpresión de CaMkk $\beta$ -WT, a diferencia de los resultados obtenidos midiendo la activación de AMPK por Western Blot (figura 6B), en los que no se observó aumento en la fosforilación de AMPK por sobreexpresión de CaMkk $\beta$ -WT.

Esta aparente contradicción podría explicarse debido a que se detectó CaMkk $\beta$ -KD y WT en el inmunoprecipitado de AMPK (figura 6D). La

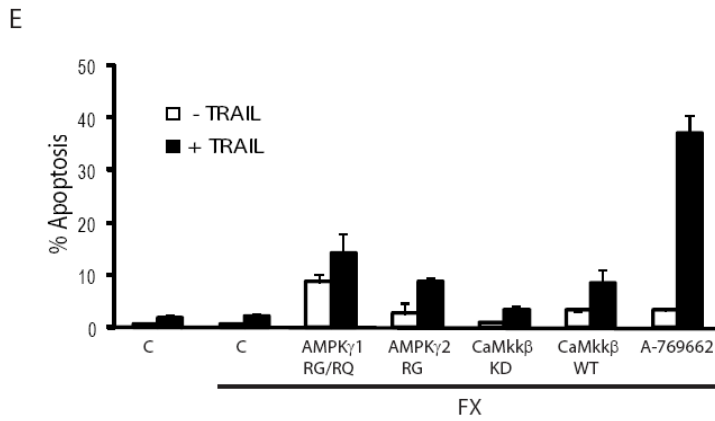


**Figura 6:** La sobreexpresión de isoformas constitutivamente activas de AMPK no sensibiliza a las células tumorales de mama MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL (III).

(D) Las células MDA-MB231 se infectaron durante 40 horas con 100 PFU de adenovirus con DNA codificante para CaMkk $\beta$ -DN Y CaMkk $\beta$ -WT, tras lo cual se inmunoprecipitó AMPK $\alpha$ 1 tal como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de c-Myc-CaMkk $\beta$  y AMPK $\beta$  como control de carga se analizaron por Western Blot. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

presencia de CaMkk $\beta$ -WT en este complejo podría determinar la activación de AMPK 'in vitro', en las condiciones de reacción durante el proceso de incubación del péptido SAMS con el inmunoprecipitado. Esta activación fue, en este caso, un artefacto metodológico, ya que dicha activación 'in vitro' (figura 6C) no se observaba 'in vivo' (figura 6B).

Por otro lado, AMPK $\gamma$ 2-RG activaba AMPK tanto o más que el activador directo de AMPK, A-769662 (figuras 6B y 6C), por lo que se consideró como mejor candidato para testar si su sobreexpresión en la línea celular MDA-MB231 sensibilizaba a TRAIL de una forma comparable a la sensibilización obtenida tras un pretratamiento con A-769662. En la figura 6E puede observarse cómo, a pesar de su actividad demostrada previamente, la sobreexpresión de AMPK $\gamma$ 2-RG no era suficiente para sensibilizar este modelo celular a la apoptosis inducida por TRAIL.



**Figura 6:** La sobreexpresión de isoformas constitutivamente activas de AMPK no sensibiliza a las células tumorales de mama MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL (IV).

(E) Las células MDA-MB231 se infectaron durante 40 horas como se describe en B y C, tras lo cual se trataron con 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 24 horas. La apoptosis se determinó como porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo. Los histogramas muestran los valores  $\pm$  DE de dos experimentos independientes.

Por lo tanto, como conclusión se obtuvo que la sensibilización a TRAIL observada en diferentes líneas tumorales de mama tras un pretratamiento con estímulos activadores de AMPK, como es el caso del AICAR, limitación de Glucosa, Fenformina y A-769662, es independiente de la activación de AMPK por estos estímulos. La actividad AMPK no es suficiente ni necesaria para la sensibilización a TRAIL por dichos estímulos.

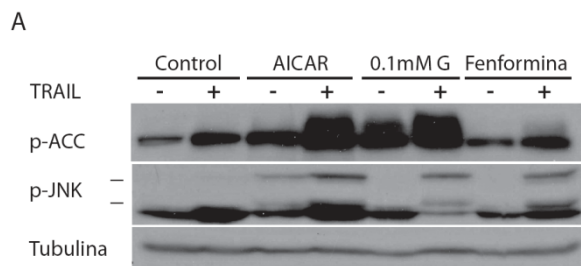
4. *La sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL, observada tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con activadores de AMPK es independiente de la activación de JNK.*

Con el fin de determinar los mecanismos implicados en la sensibilización de este tipo celular a la apoptosis inducida por TRAIL tras los diferentes tratamientos activadores de AMPK, se procedió a estudiar posibles rutas de sensibilización a TRAIL.

En bibliografía existen datos que apoyan la idea de que la activación de AMPK por distintos estímulos induce apoptosis en diferentes líneas celulares mediante la activación de JNK [Isakovic et al., 2007; Kefas et al., 2003; Meisse et al., 2002]. Sin embargo, en un estudio algo más reciente

se determinó que ciertos estímulos que activaban a AMPK, como era el caso del AICAR, la oligomicina, la metformina y la isquemia, también activaban TAK1, la cual es capaz de fosforilar y activar JNK [Xie et al., 2006a]. Basándose en estos datos, el siguiente paso en este estudio fue determinar si los estímulos activadores de AMPK podían estar activando JNK y sensibilizando a las células MDA-MB231 a TRAIL por esta vía de señalización.

Se detectó una activación de JNK al sensibilizar las células MDA-MB231 a TRAIL con AICAR, limitación de Glucosa y Fenformina (figura 7A). Así, tras un pretratamiento de 16 horas con estos estímulos y tan sólo



después de 2 horas de tratamiento con TRAIL, se observó un aumento en los niveles de p-JNK1 (banda inferior) y p-JNK2 (banda superior).

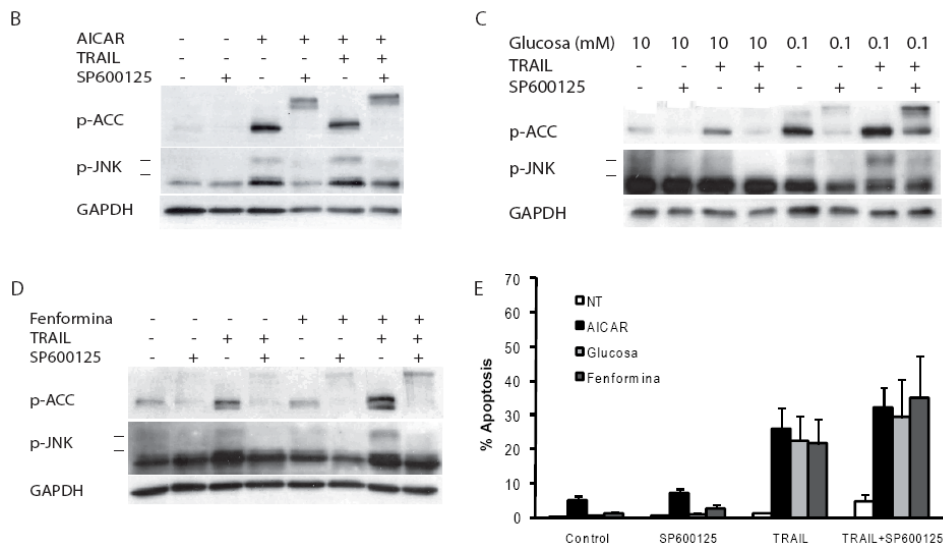
**Figura 7:** La activación de JNK producida por los tratamientos de AICAR, limitación de Glucosa o Fenformina y TRAIL no está implicada en la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL observada tras dichos tratamientos en las células tumorales de mama MDA-MB231 (I).

(A) Las células MDA-MB231 se incubaron con AICAR 1mM, 0.1mM de Glucosa o 1mM de Fenformina durante 16 horas antes de añadir 1µg/mL de TRAIL. Los niveles de p-ACC, p-JNK y Tubulina como control de carga fueron analizados por Western Blot 2 horas después de añadir TRAIL. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

A continuación, para determinar si la activación de JNK observada tras estos co-tratamientos estaba implicada en la sensibilización a la apoptosis inducida por los mismos en las células MDA-MB231, se utilizó el inhibidor de JNK, SP600125, el cual inhibe su actividad quinasa [Bennett et al., 2001].

En las figuras 7B, 7C y 7D puede observarse cómo con un pretratamiento de 1 hora con SP600125 (25 µM) se eliminó la activación de JNK tras los tratamientos con AICAR (figura 7B), limitación de Glucosa (figura 7C) y Fenformina (figura 7D) en combinación con TRAIL. Sin embargo, la sensibilización observada tras estos co-tratamientos no se vio afectada por la inhibición de JNK (figura 7E). Esto indicaba que la

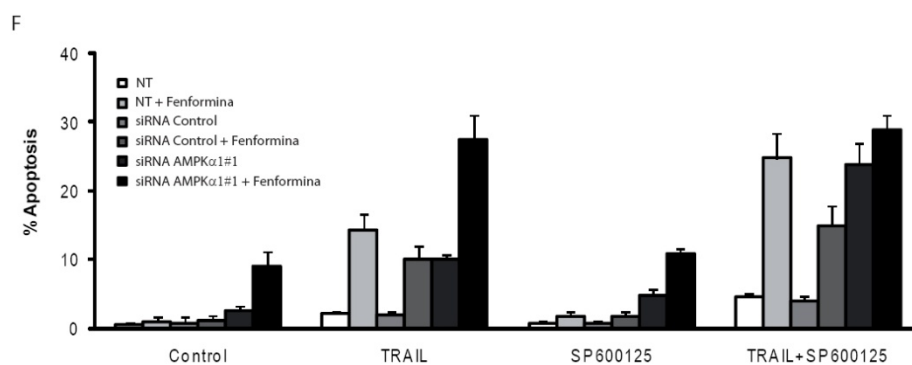
activación de JNK no estaba implicada en la sensibilización a TRAIL por estímulos activadores de AMPK.



**Figura 7:** La activación de JNK producida por los tratamientos de AICAR, limitación de Glucosa o Fenformina y TRAIL no está implicada en la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL observada tras dichos tratamientos en las células tumorales de mama MDA-MB231 (II).

Las células MDA-MB231 se incubaron con AICAR 1mM (B, E), 0.1mM de Glucosa (C, E) o 1mM de Fenformina (D, E) durante 16 horas antes de añadir 25 µM de SP600125 durante 1 hora, tras lo cual se trataron las células con 1µg/mL de TRAIL. Los niveles de p-ACC, p-JNK y GAPDH como control de carga (B, C, D) fueron analizados por Western Blot 2 horas después de añadir TRAIL. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes. La apoptosis se midió como porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo 6 horas después de añadir TRAIL (E). Los histogramas muestran los valores +/- DE de dos experimentos independientes.

No obstante, aún existía la probabilidad de que tanto la ruta de activación de JNK, como la de AMPK, estuviesen implicadas en la sensibilización a TRAIL, pero que fuesen rutas redundantes, llevándose a cabo la ejecución de la apoptosis siempre que una de ellas estuviera activa. Para descartar esta posibilidad, se llevaron a cabo experimentos en los que se realizaba al mismo tiempo un silenciamiento de AMPK con siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 y se inhibía JNK con el inhibidor SP600125 (figura 7E).



**Figura 7:** La activación de JNK producida por los tratamientos de AICAR, limitación de Glucosa o Fenformina y TRAIL no está implicada en la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL observada tras dichos tratamientos en las células tumorales de mama MDA-MB231 (III).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a AMPKα1 (AMPKα1#1) durante 48 horas (F). Tras las 48 horas de transfección se incubaron con 1 mM de Fenformina durante 16 horas antes de añadir 25 μM de SP600125 durante 1 hora. A continuación se trataron con 1 μg/mL de TRAIL. La apoptosis se midió como porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo 6 horas después de añadir TRAIL. Los histogramas muestran los valores +/- DE de dos experimentos independientes.

Los resultados obtenidos no sólo demostraron que ninguna de las rutas por separado, ni conjuntamente, eran necesarias para la sensibilización a TRAIL por activadores de AMPK, como la Fenformina; sino que la inhibición conjunta de las dos rutas sensibilizaba por sí misma a estas células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL (figura 7E).

Por lo tanto, ni la activación de JNK ni la de AMPK parecen estar implicadas en la sensibilización a TRAIL producida en la línea celular MDA-MB231 por estímulos activadores de AMPK.

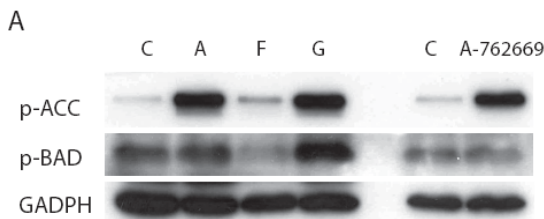
*5. El estado de fosforilación de bad no está implicado en la sensibilización a TRAIL inducida por los activadores de AMPK en las células MDA-MB231.*

Debido a que se había detectado sensibilización a TRAIL en células tumorales de mama tras el uso de activadores muy diferentes de AMPK, se decidió abarcar el estudio del compuesto A-769662. Esta pequeña molécula se describió como activador específico para AMPK [Cool et al., 2006], aunque recientemente se observó que podía tener otras dianas

moleculares diferentes a AMPK [Moreno et al., 2008; Scott et al., 2008], no siendo, por lo tanto, un activador totalmente específico de AMPK.

En concreto, en uno de estos trabajos de investigación, se realizó un ensayo de actividad a un conjunto de 76 quinasas, en el cual se observó que el compuesto A-769662 era capaz de inhibir la actividad de dos de ellas en más de un 75% [Goransson et al., 2007]. Estas quinasas eran PIM1 y PIM3, proteínas proto-oncogénicas con actividad serina/treonina quinasa, sobreexpresadas aberrantemente en ciertas células tumorales humanas, capaces de inhibir la apoptosis por fosforilación e inactivación de bad en la serina 112 [Aho et al., 2004; Li et al., 2006; Macdonald et al., 2006; Popivanova et al., 2007].

De esta forma surgió la hipótesis de que, si alguna de estas dos quinasas estuviera activa en el modelo celular MDA-MB231, el compuesto A-769662, así como el resto de activadores de AMPK utilizados en este estudio, podrían estar inhibiendo su actividad quinasa, reduciendo la fosforilación y, consecuentemente, la inhibición ejercida sobre bad, liberándola para que realizase su función proapoptótica.



**Figura 8:** El estado de fosforilación de bad no está implicado en la sensibilización a TRAIL por AICAR, limitación de Glucosa, Fenformina o A-769662 en las células tumorales de mama MDA-MB231.

(A) Las células MDA-MB231 se incubaron con AICAR 1 mM (A), 0.1 mM de Glucosa (G), 1 mM de Fenformina (F) o 400  $\mu$ M de A-769662 durante 16 horas. Los niveles de p-ACC, p-BAD y GAPDH como control de carga fueron analizados por Western Blot. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

Sin embargo, al estudiar los niveles de fosforilación de la proteína bad en el residuo serina 112 en extractos de células previamente tratadas con AICAR, limitación de Glucosa, Fenformina y A-769662; se observó que no existía una inhibición general de dicha fosforilación tras los tratamientos, salvo en el caso de la Fenformina (figura 8A). Ya que el compuesto A-769662 no parecía afectar a los niveles de inhibición de bad en este modelo celular, y que el estado de fosforilación del mismo en el residuo serina 112 no parecía influir en los



niveles de sensibilización a TRAIL, se descartó esta vía como mecanismo de sensibilización general a TRAIL por estos activadores de AMPK.

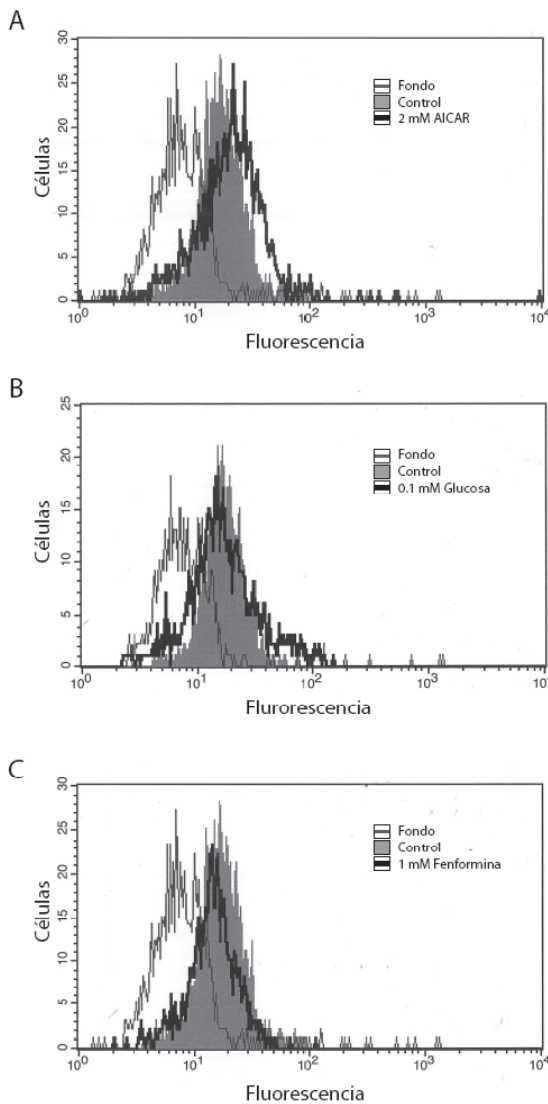
*6. Análisis del DISC tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con activadores de AMPK.*

La siguiente posible ruta de sensibilización abordada en el estudio fue la formación del DISC. En la bibliografía existen datos que indican que, diferentes agentes quimioterapéuticos, sensibilizan a TRAIL provocando un aumento en los receptores de muerte de TRAIL (TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5), lo que conlleva a un aumento en la formación del DISC y, por lo tanto, a una mayor activación de la ruta apoptótica [Nagane et al., 2000; Nimmanapalli et al., 2001; Sun et al., 2000; Wen et al., 2000]. En concreto, estudios anteriores de nuestro grupo demostraron que existía un aumento en la formación del DISC tras la sensibilización a TRAIL por privación de Glucosa en diversas células tumorales humanas [Munoz-Pinedo et al., 2003].

Por lo tanto, se estudiaron los niveles de receptores de muerte proapoptóticos TRAIL-R2, que mayoritariamente se expresan en las células MDA-MB231 [Ortiz-Ferron et al., 2008], tras tratamientos de 16 horas con AICAR, limitación de Glucosa y Fenformina. Como puede observarse en las figuras 9A, 9B y 9C, ninguno de los tratamientos aplicados aumentó de forma significativa los niveles de TRAIL-R2 expuestos en la membrana celular externa de la línea tumoral MDA-MB231.

A continuación, se procedió a estudiar la formación del DISC, con el fin de observar si existía un aumento del mismo que pudiese explicar, al menos en parte, la sensibilización a TRAIL observada en las células MDA-MB231 bajo estos tratamientos. Las células se trataron con AICAR 2 mM durante 16 horas, tras lo cual, se añadió TRAIL biotinilado (bTRAIL) durante 15, 30 ó 60 minutos. En la figura 9D puede observarse cómo un pretratamiento con AICAR no sólo no indujo la formación del DISC, sino que incluso la disminuyó. En concreto, el primer procesamiento de caspasa-8 se vio reducido en el tratamiento con AICAR con respecto al DISC formado sin estímulo previo al TRAIL; y tanto el reclutamiento, como la cantidad total de FADD en los lisados, parecía disminuir tras el tratamiento con AICAR. Esta bajada en los niveles totales de FADD podría

ser responsable de una menor formación del complejo DISC tras el tratamiento con AICAR.

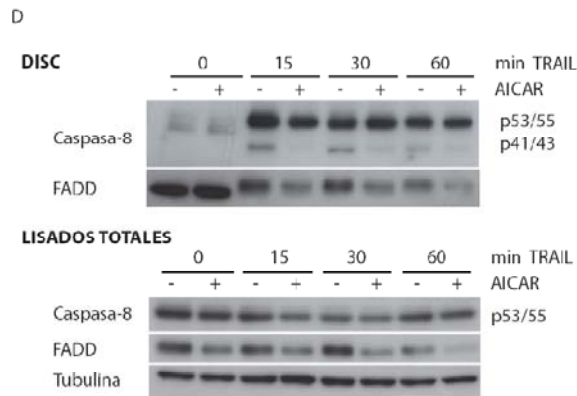


**Figura 9:** Expresión de receptores y análisis del DISC tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con activadores de AMPK (I).

Las células MDA-MB231 se trataron con AICAR 2 mM (A), Glucosa 0.1 mM (B) o Fenformina 1 mM (C) durante 16h. Tras las 16h de tratamiento se recogieron las células y se analizaron los niveles de TRAIL-R2 en la superficie celular por citometría tal como se indica en Materiales y Métodos. El fondo representa la fluorescencia basal de las células (no incubadas con anticuerpo primario). Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

Con el objetivo de discernir si este menor reclutamiento del DISC tras el tratamiento con AICAR era específico de este estímulo o se trataba de un efecto general de los activadores de AMPK, se realizó un experimento análogo al anterior usando como estímulo la limitación de Glucosa en el medio extracelular (figura 8E). En este caso, los resultados

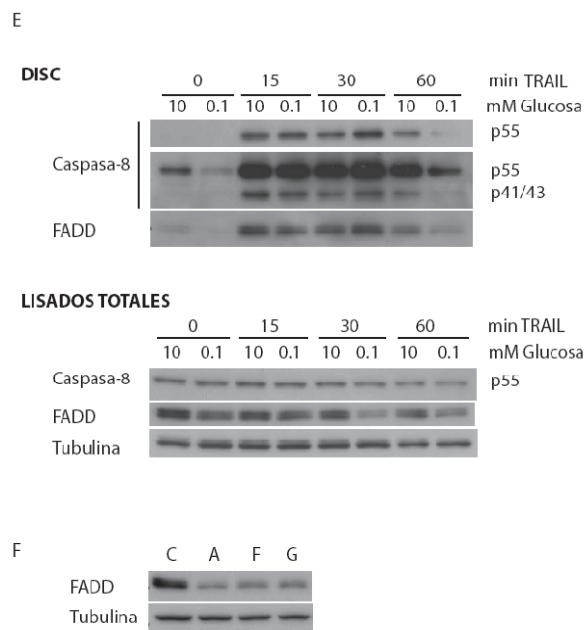
fueron similares a los obtenidos con AICAR. En concreto, aunque el reclutamiento de caspasa-8 era similar con o sin tratamiento previo a la adición de TRAIL, los niveles de FADD reclutados y totales disminuían tras la incubación en un medio de cultivo con baja concentración de Glucosa (0.1 mM). En la figura 9F puede observarse cómo los niveles de expresión de FADD disminuyen tras el tratamiento con otro activador de AMPK, Fenformina, del mismo modo que lo hacen los tratamientos con AICAR y limitación de Glucosa.



**Figura 9:** Expresión de receptores y análisis del DISC tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con activadores de AMPK (II).

(D) Las células MDA-MB231 se trataron con AICAR 2 mM durante 16h. Tras las 16h de tratamiento se trataron con TRAIL biotinilado (bTRAIL) durante los tiempos indicados y a continuación se aisló el DISC tal como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de caspasa-8, FADD y tubulina como control de carga se analizaron por Western Blot. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos.

Esta disminución en los niveles de FADD, común a todos los estímulos usados en este estudio, explicaría el hecho de que no aumentase la formación del DISC tras los tratamientos con activadores de AMPK. De este modo, se concluyó que en la sensibilización a TRAIL por activadores de AMPK no tenía lugar un aumento en el reclutamiento del DISC; por lo que el mecanismo de sensibilización debía ser posterior a la formación del complejo inductor de muerte.



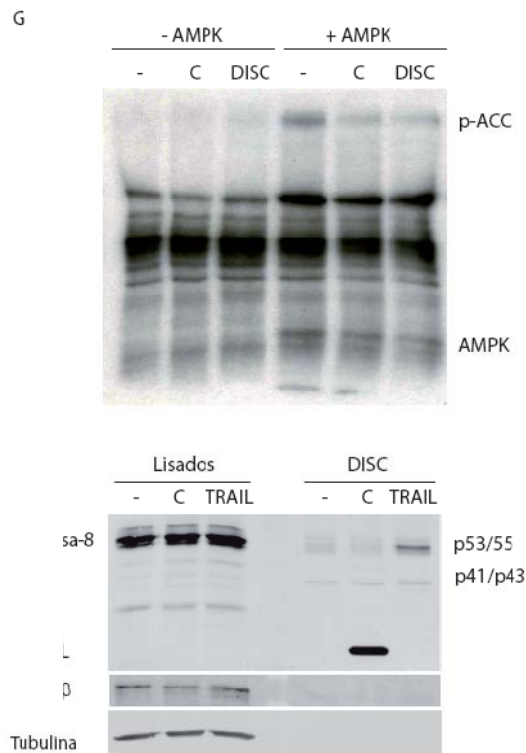
**Figura 9:** Expresión de receptores y análisis del DISC tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con activadores de AMPK (III).

Las células MDA-MB231 se trataron con Glucosa 0.1 mM (E) durante 16h. Tras las 16h de tratamiento se trataron con TRAIL biotinilado (bTRAIL) durante los tiempos indicados y a continuación se aisló el DISC tal como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de caspasa-8, FADD y tubulina como control de carga se analizaron por Western Blot. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes. Las células MDA-MB231 se trataron con AICAR 2 mM (A), Fenformina 1 mM (F) y Glucosa 0.1 mM (G) durante 16 horas (F). Los niveles de FADD y tubulina como control de carga se analizaron por Western Blot. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

De esta forma, ya que AMPK es una serina/treonina quinasa con multitud de dianas conocidas, surgió la hipótesis de que su activación pudiese estar ligada a la fosforilación de algún componente del DISC conocido o no. Para abordar esta nueva cuestión, se llevaron a cabo experimentos de aislamiento del complejo inductor de muerte en condiciones basales y se analizó la fosforilación de sus componentes 'in vitro' por AMPK recombinante. Como puede observarse en la figura 9G, no se detectó ninguna diferencia en el bandeo de fosforilación radiactiva por AMPK en las muestras en las que se había precipitado el DISC con respecto a los controles. Las detecciones, por un lado, de una banda correspondiente a la autofosforilación de la proteína AMPK recombinante y, por otro, de otra banda fuertemente fosforilada correspondiente a ACC, proteína altamente biotinilada [Lane et al., 1974], y por lo tanto, con gran afinidad por la Estreptavidina-Agarosa utilizada para aislar el DISC, resultaron ser controles positivos internos de que la proteína AMPK recombinante utilizada en estos ensayos estaba activada. Por otro lado, no se detectó inmunoprecipitación de proteína AMPK endógena en el DISC (figura 9H). Estos datos descartaban la existencia de una diana directa de la actividad quinasa de AMPK presente en el complejo inductor de muerte de TRAIL.

**Figura 9: Análisis del DISC tras el tratamiento de las células tumorales de mama MDA-MB231 con activadores de AMPK (IV).**

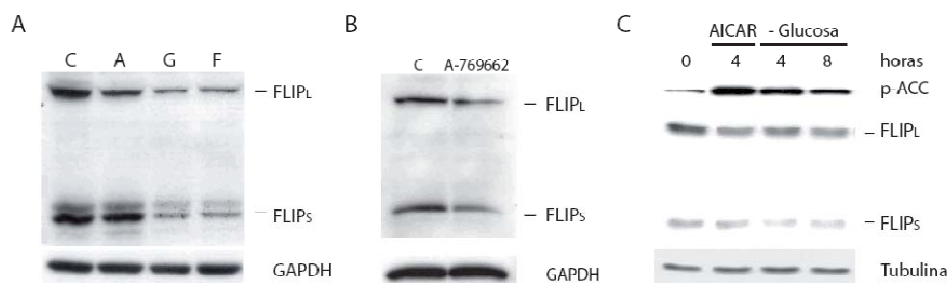
Las células MDA-MB231 se trataron con TRAIL biotinilado (bTRAIL) durante 30 minutos y, a continuación, se realizó un aislamiento del DISC tal como se describe en Materiales y Métodos (G,H). A continuación se realizó un ensayo de fosforilación 'in vitro' del DISC por AMPK recombinante activada tal como indica en Materiales y Métodos (G). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Los niveles de caspasa-8, AMPK $\beta$  y tubulina como control de carga en los precipitados de DISC se analizaron por Western Blot (H). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.



7. La disminución, independiente de AMPK, de los niveles de cFLIP por los activadores de AMPK es necesaria para la sensibilización de las células tumorales de mama a TRAIL.

Existen numerosas evidencias en la bibliografía de que un descenso en los niveles de la proteína cFLIP sensibiliza a distintos tipos celulares a la apoptosis inducida por TRAIL. Esta actividad antiapoptótica de cFLIP ha sido demostrada en células que sobreexpresan cFLIP establemente, en ratones deficientes en cFLIP y en células en las que se ha eliminado la expresión de dicha proteína [Chang et al., 2002; Krueger et al., 2001; Yeh et al., 2000]. En concreto, según trabajos anteriores del laboratorio, cFLIP parece tener un papel importante en la resistencia a TRAIL en células tumorales de mama [Palacios et al., 2006].

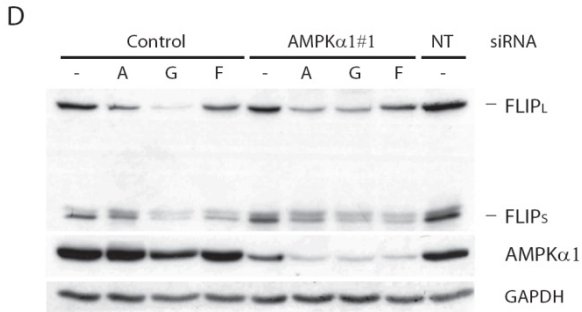
Por lo tanto, el siguiente paso en el estudio del mecanismo de sensibilización a TRAIL por activadores de AMPK fue el análisis de los niveles de cFLIP bajo estos estímulos en las células MDA-MB231. Como puede observarse en las figuras 10A y 10B, la estimulación de estas células durante 16 horas con AICAR, limitación de Glucosa, Fenformina o A-769662 provocó una reducción de cFLIP, tanto de la isoforma larga (FLIP<sub>L</sub>) como de la corta (FLIP<sub>S</sub>). Similares resultados se obtuvieron en células MCF7 tratadas con AICAR y privación total de glucosa (figura 10C).



**Figura 10:** La disminución, independiente de AMPK, de los niveles de cFLIP por los activadores de AMPK es necesaria para la sensibilización de las células tumorales de mama a TRAIL (I).

Las células MDA-MB231 se trataron con AICAR (A) 2 mM, Glucosa (G) 0.1 mM, Fenformina (F) 1 mM (A) ó A-769662 400  $\mu$ M (B) durante 16h. Los niveles de cFLIP y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Las células MCF7 se trataron con AICAR 1 mM o privación de Glucosa (C) durante los tiempos indicados. Los niveles de p-ACC, cFLIP y tubulina como control de carga se analizaron por Western Blot. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

Además, esta disminución de los niveles de cFLIP tras tratamientos activadores de AMPK, resultó ser independiente de los niveles de expresión de AMPK (figura 10D), ya que el siRNA frente a AMPK no afectó a la bajada de niveles de FLIP<sub>L</sub> ni FLIP<sub>S</sub> tras tratamientos con AICAR, limitación de Glucosa o Fenformina.

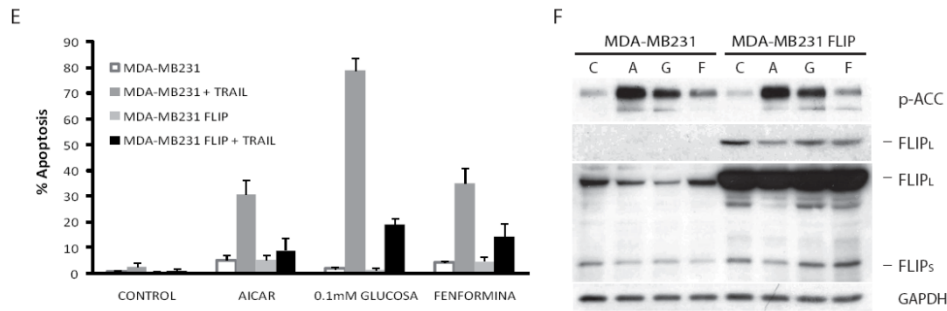


**Figura 10:** La disminución, independiente de AMPK, de los niveles de cFLIP por los activadores de AMPK es necesaria para la sensibilización de las células tumorales de mama a TRAIL (II).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#1) durante 48h. A continuación se trataron con AICAR (A) 2 mM, Glucosa (G) 0.1 mM, Fenformina (F) 1 mM durante 16h (D). Los niveles de cFLIP, AMPK y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Para demostrar que esta disminución en los niveles de cFLIP por los activadores de AMPK estaba implicada en la sensibilización a TRAIL observada en las células MDA-MB231, se realizaron el mismo tipo de ensayos en células MDA-MB231 que sobreexpresan FLIP<sub>L</sub>. Como puede verse en la figura 10F, estas células poseen unos niveles de FLIP<sub>L</sub> mucho mayores a los existentes en la línea parental de MDA-MB231. Así, aunque el tratamiento con AICAR, limitación de Glucosa y Fenformina fue capaz de reducir en cierta medida los niveles de FLIP<sub>L</sub> en estas células (figura 10F, panel poco expuesto de FLIP), esta bajada no fue suficiente para igualar estos niveles a los de las células MDA-MB231 normales (figura 10F, panel sobreexpuesto de FLIP).

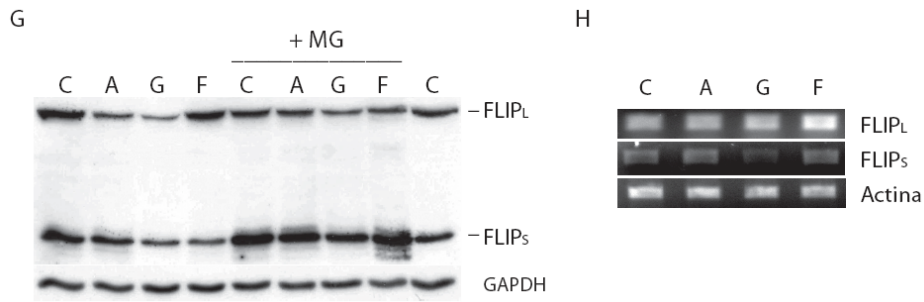
Al mismo tiempo, esta sobreexpresión de FLIP confirió a estas células resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL tras los tratamientos activadores de AMPK (figura 10E). Estos resultados indicaban que la reducción de los niveles de FLIP por parte de los activadores de AMPK usados en este estudio era necesaria para sensibilizar las células MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL.



**Figura 10:** La disminución, independiente de AMPK, de los niveles de cFLIP por los activadores de AMPK es necesaria para la sensibilización de las células tumorales de mama a TRAIL (III).

Las células MDA-MB231 y MDA-MB231 que sobreexpresan FLIP (MDA-MB231 FLIP) se trataron con AICAR (A) 2 mM, Glucosa (G) 0.1 mM, Fenformina (F) 1 mM durante 8h (E, F) antes de añadir TRAIL (1 µg/mL). La apoptosis se midió como porcentaje de células en SubG1 por citometría de flujo (E) 16 horas después de la adición de TRAIL. Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes. Los niveles de p-ACC, cFLIP, y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot (F). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Puesto que AMPK no está implicada en la reducción de los niveles de cFLIP, el mecanismo por el cual tiene lugar esta bajada tras tratamientos activadores de AMPK se desconoce. Tal como se muestra en la figura 10G, la disminución de cFLIP se debía, al menos en parte, a su degradación por el proteasoma; ya que el uso del inhibidor del proteasoma MG-132 junto con estos tratamientos disminuía la pérdida de cFLIP, sobre todo en el caso del AICAR y la Fenformina, mientras que los niveles de mRNA de cFLIP no se ven afectados significativamente por estos tratamientos (figura 10H). Estos dos estímulos, por lo tanto, parecen estar favoreciendo la degradación de FLIP por el proteasoma, es decir, una regulación postraduccional. Por otro lado, la limitación de glucosa inducía una disminución de los niveles de mRNA de FLIP<sub>S</sub> (figura 10H), mientras que la inhibición del proteasoma no restablecía completamente los niveles de cFLIP (figura 10G), lo cual señala la posible implicación de un mecanismo de regulación transcripcional de FLIP por estrés energético.



**Figura 10:** La disminución, independiente de AMPK, de los niveles de cFLIP por los activadores de AMPK es necesaria para la sensibilización de las células tumorales de mama a TRAIL (IV).

Las células MDA- se trataron con AICAR (A) 2 mM, Glucosa (G) 0.1 mM, Fenformina (F) 1 mM durante 16h (G, H) en presencia o ausencia de 500 nM de MG-132 (MG) (G) Los niveles de cFLIP, y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot (G). Los niveles de mRNA DE cFLIP y actina como control de carga se analizaron por RT-PCR, tal como se describe en materiales y métodos (H). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

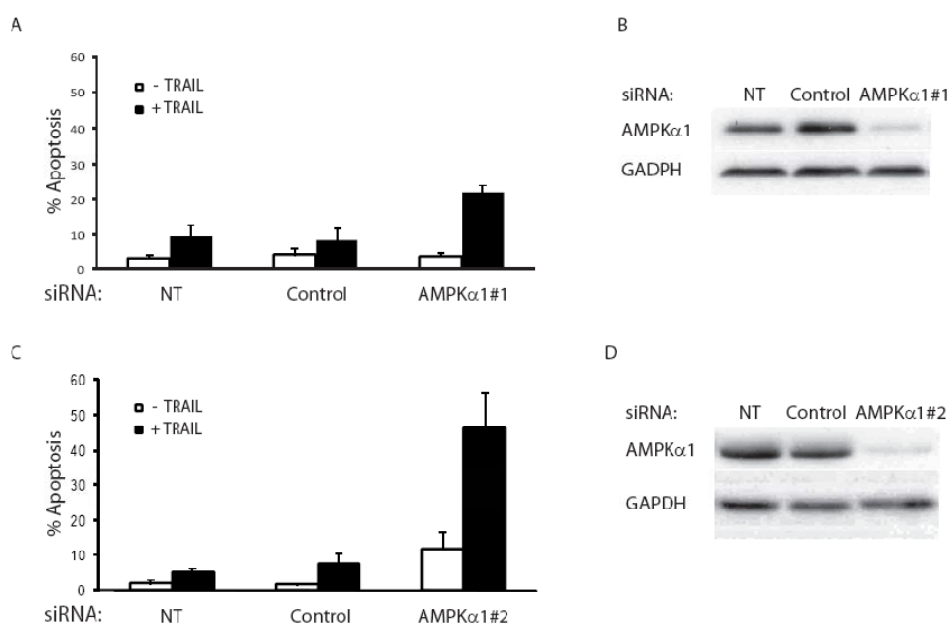
Como conclusión, todos los activadores directos o indirectos de AMPK usados en este estudio sensibilizan a las células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL mediante una reducción de los niveles de cFLIP independiente de la activación de AMPK.



## CAPÍTULO 2: IMPLICACIÓN DE AMPK EN SUPERVIVENCIA CELULAR.

## 1. La reducción de los niveles de AMPK sensibiliza a las células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.

En el capítulo anterior se obtuvieron datos que sugerían que AMPK podría estar implicada en la supervivencia celular. En concreto, en la figura 4, puede observarse cómo la disminución de los niveles de AMPK mediante siRNA no sólo no eliminaba la sensibilización a TRAIL obtenida tras tratamientos como AICAR, sino que aumentaba en cierto grado los niveles de sensibilización.

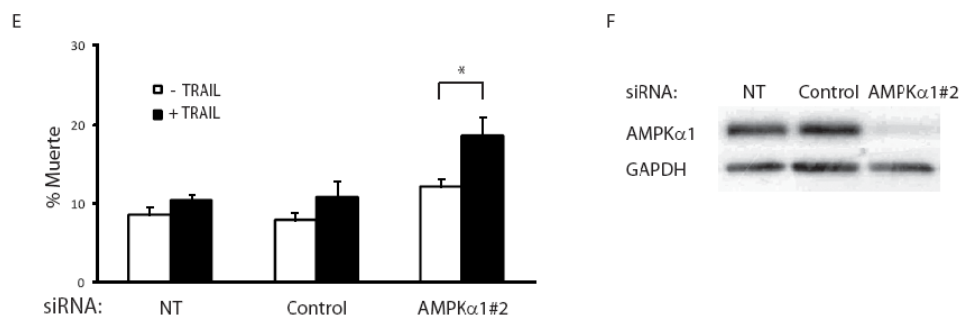


**Figura 11:** La reducción de los niveles de AMPK sensibiliza a las células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL (I).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con dos siRNA diferentes frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#1 y AMPK $\alpha$ 1#2) durante 48 horas. Los niveles AMPK $\alpha$ 1 y GAPDH como control de carga fueron analizados por Western Blot (B, D). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes. La apoptosis se midió 24 horas después de la adición de 1  $\mu$ g/mL de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (A, C). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes.

Con el fin de estudiar esta posible función antiapoptótica de AMPK, se redujeron los niveles de AMPK en las células MDA-MB231 utilizando dos oligonucleótidos de RNA de interferencia diferentes para dicha proteína. Como puede observarse, ambos siRNAs eran capaces de sensibilizar a estas células a la apoptosis inducida por TRAIL (figuras 11A y C). En las figuras 11B y D se muestra cómo disminuyeron los niveles de AMPK tras la incubación de las células MDA-MB-231 en presencia de ambos siRNAs. Para realizar el resto de los ensayos se utilizó el siRNA número 2 (AMPK $\alpha$ 1#2), ya que era el que más sensibilizaba a TRAIL.

Para determinar si esta sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL debido a la disminución de los niveles de AMPK, observada en las células MDA-MB231, se reproducía en otras líneas celulares, testamos la línea celular tumoral de mama MDA-MB468, que, al igual que la anterior, era resistente a TRAIL. Como puede observarse en la figura 11E, estas células también se sensibilizaban de forma significativa a la apoptosis inducida por TRAIL tras la disminución de los niveles de AMPK por siRNA. En la figura 11F se muestra la disminución de los niveles de AMPK tras las 48 horas de transfección con los oligonucleótidos de interferencia.



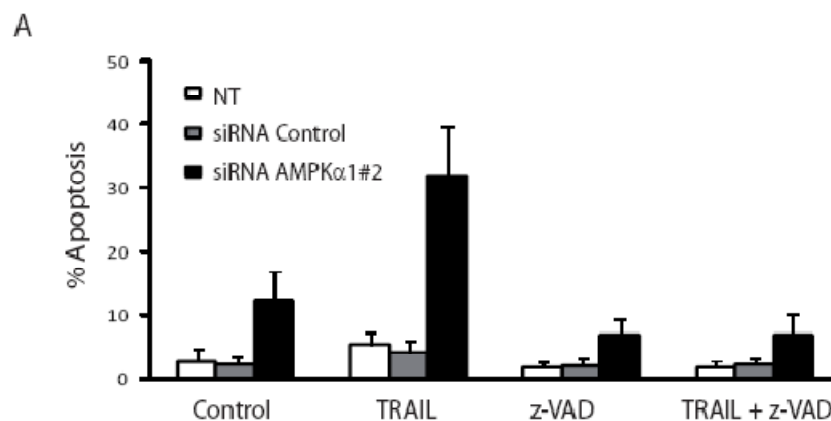
**Figura 11: La reducción de los niveles de AMPK sensibiliza a las células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL (II).**

Las células MDA-MB468 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#2) durante 48 horas. Los niveles AMPK $\alpha$ 1 y GAPDH como control de carga fueron analizados por Western Blot (F). Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes. El porcentaje de muerte se midió 24 horas después de la adición de 1  $\mu$ g/mL de TRAIL por Sytox Green tal como se describe en Materiales y Métodos (E). Los histogramas muestran los valores +/- DE de dos experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ .

En conjunto, estos datos demuestran que la reducción de los niveles de proteína AMPK sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL en diferentes líneas humanas tumorales de mama, indicando que AMPK tiene un papel importante en la supervivencia de estas células tumorales frente a la apoptosis inducida por TRAIL.

*2. La sensibilización a TRAIL inducida por el silenciamiento de AMPK requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial.*

Con el objetivo de determinar el mecanismo por el cual AMPK estaba implicada en la resistencia de las células tumorales a TRAIL, se estudió si el mecanismo de muerte observado era dependiente de caspasas. Para ello, tras 48 horas de transfección con siRNA frente a AMPK, se pretrataron las células con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk durante 1 hora, antes de tratarlas con TRAIL. Como resultado, se obtuvo una inhibición completa de la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL (figura 12A); confirmando la hipótesis de que la muerte observada correspondía a un mecanismo de apoptosis, ya que era dependiente de caspasas.

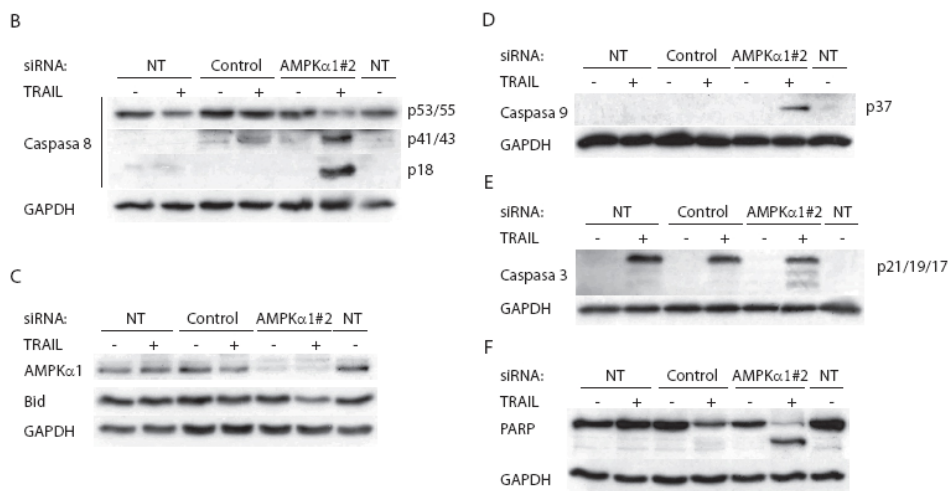


**Figura 12:** La sensibilización a TRAIL inducida por la reducción de los niveles de AMPK requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial (I).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect, tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#2) durante 48 horas. A continuación, se añadió z-VAD-fmk (10  $\mu$ M) 1 hora antes la adición de TRAIL soluble recombinante (1  $\mu$ g/mL). La apoptosis se midió 24 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (A). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes.

A continuación, se analizó la ruta de activación de apoptosis inducida por TRAIL tras reducir los niveles de AMPK por siRNA. Así, tras 48 horas de transfección, las células MDA-MB-231 se incubaron con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TRAIL durante 16 horas.

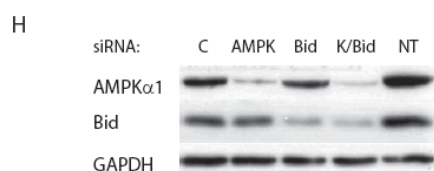
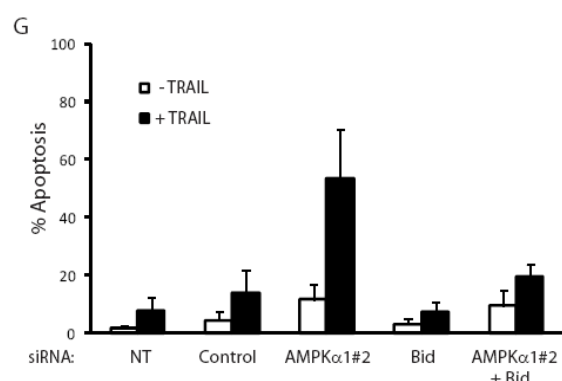
Bajo estas condiciones, se observó la fragmentación y consecuente activación de la caspasa iniciadora, caspasa-8 (figura 12B). Al mismo tiempo, se observó el procesamiento de bid (figura 12C), necesario para la activación de la ruta apoptótica mitocondrial por caspasa-8, y la activación de la caspasa iniciadora caspasa-9 (figura 12D). También se observó el procesamiento de la caspasa efectora, caspasa-3 (figura 12E) y la fragmentación de PARP (figura 12F), indicativa de la ejecución de un mecanismo de muerte apoptótica.



**Figura 12:** La sensibilización a TRAIL inducida por la reducción de los niveles de AMPK requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial (II).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#2) durante 48 horas antes de la adición de TRAIL soluble recombinante (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células se recogieron en Tampón de Lisis, 16 horas después de añadir TRAIL, y los niveles de AMPK  $\alpha$ 1 (C) y de fragmentación de caspasa-8 (B), bid (C), caspasa-9 (D), caspasa-3 (E) y PARP (F), se analizaron por Western Blot. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

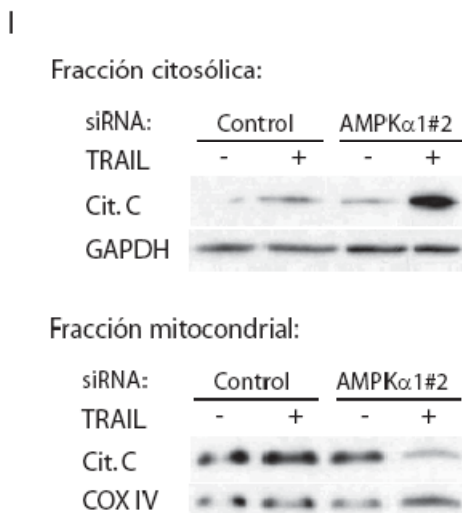
Para demostrar la activación de la ruta apoptótica mitocondrial inducida por la sensibilización a TRAIL por disminución de la proteína AMPK en estas células, se realizaron dos estudios complementarios. Por un lado, se analizaron los niveles de sensibilización a TRAIL tras la disminución de los niveles de bid, proteína cuyo procesamiento por caspasa-8 inicia la ruta mitocondrial. Para ello, las células se transfectaron con siRNA frente a bid, AMPK o ambos al mismo tiempo, tras lo cual se trataron durante 24 horas con TRAIL a 1 µg/mL. Como puede observarse en la figura 12G, la reducción de los niveles de bid por siRNA eliminaba la sensibilización a TRAIL obtenida por la disminución en los niveles de AMPK. Esto indicaba que la activación de la vía de apoptosis mitocondrial era necesaria para la ejecución de la muerte inducida por TRAIL en estas células tras la disminución de AMPK por siRNA.



**Figura 12:** La sensibilización a TRAIL inducida por la reducción de los niveles de AMPK requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial (III).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control), con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#2, AMPK ó K) o con un siRNA frente a bid (Bid) durante 48 horas antes de la adición de TRAIL soluble recombinante (1 µg/mL). La apoptosis se midió 24 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (G). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes. Los niveles de AMPK $\alpha$ 1 (K) y bid se analizaron por Western Blot (H). Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Por otro lado, se procedió al análisis de la liberación de citocromo C mitocondrial al citosol, en las condiciones sensibilizantes a TRAIL. Para ello, se realizó un ensayo de subfraccionamiento celular donde se observó un aumento de citocromo C citosólico y una disminución de citocromo C en la fracción mitocondrial (figura 12I).



**Figura 12:** La sensibilización a TRAIL inducida por la reducción de los niveles de AMPK requiere la actividad caspasa e implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial (VI).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#2), antes de la adición de TRAIL soluble recombinante (1  $\mu$ g/mL). Las células se recogieron mediante un ensayo de fraccionamiento celular, 16 horas después de añadir TRAIL, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de citocromo C, GAPDH y cox IV como controles de carga se analizaron por Western Blot en ambas fracciones (I). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

En conjunto, los datos obtenidos demuestran que la sensibilización a TRAIL observada tras la disminución de los niveles de proteína AMPK, implica la activación de la vía apoptótica mitocondrial y concluye con una muerte apoptótica dependiente de actividad caspasa.

### 3. La función antiapoptótica de AMPK es independiente de la resistencia a la apoptosis determinada por los niveles de cFLIP en las células MDA-MB231.

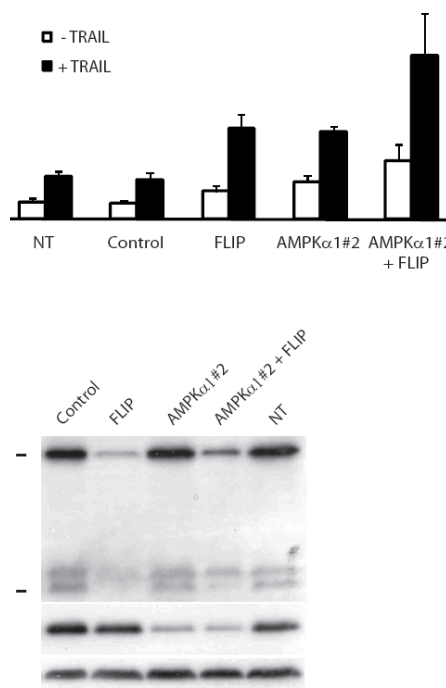
Con el objetivo de determinar el mecanismo subyacente a la implicación de AMPK en la supervivencia celular frente a la apoptosis inducida por TRAIL, se realizó un estudio de las proteínas pro y antiapoptóticas implicadas en la cascada apoptótica desencadenada por este ligando de muerte.

Ya que la línea celular MDA-MB231 presenta resistencia a TRAIL debido a sus altos niveles de expresión de cFLIP [Palacios et al., 2006], esta proteína fue la primera sujeta a estudio. Para ello, se silenció su expresión mediante siRNA y se observó que la sensibilización a TRAIL obtenida era sumatoria a la obtenida tras el silenciamiento con AMPK (figura 13A);

puesto que el silenciamiento conjunto de FLIP y AMPK sensibilizaba a la apoptosis inducida por TRAIL alrededor de un 37 %, mientras que por separado sensibilizaba un 21 y un 20 % respectivamente. Al mismo tiempo, el siRNA frente a AMPK no alteraba los niveles de la proteína cFLIP (figura 13B). En conjunto, estos datos apuntan a que la implicación de AMPK en supervivencia es independiente de la resistencia a TRAIL determinada por los niveles de cFLIP en este tipo celular.

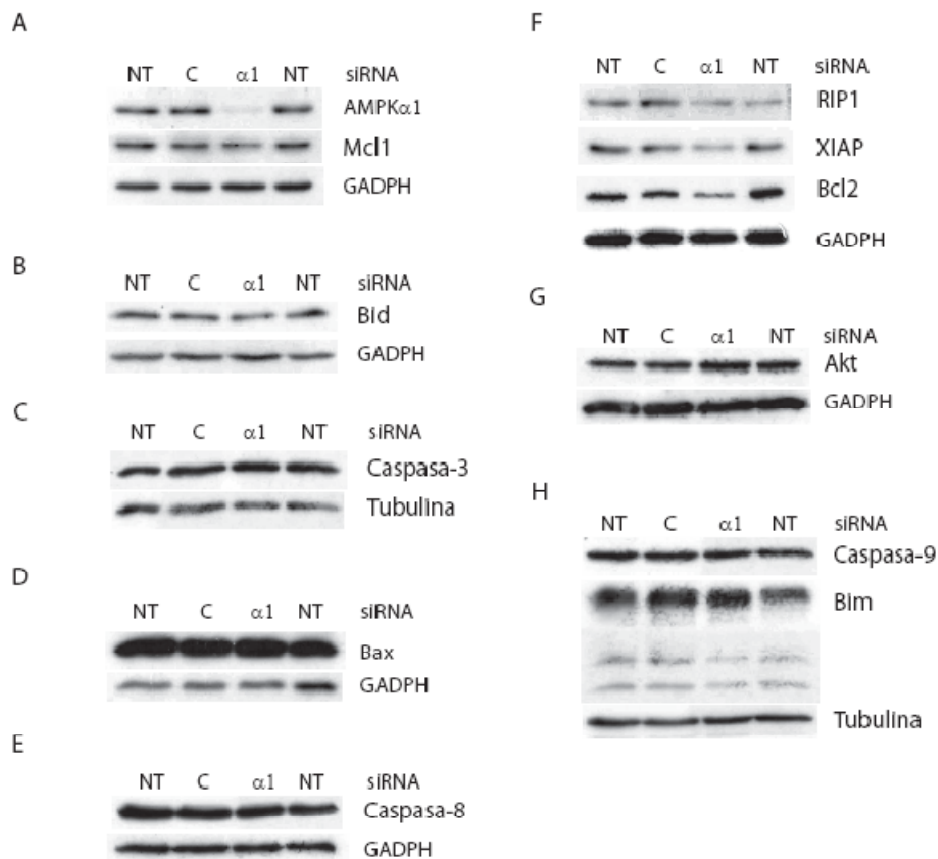
**Figura 13:** La función antiapoptótica de AMPK es independiente de la resistencia a la apoptosis determinada por los niveles de cFLIP.

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control), con un siRNA frente a cFLIP (FLIP) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#2) durante 48 horas, antes de la adición de TRAIL soluble recombinante (1  $\mu$ g/mL). La apoptosis se midió 24 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (A). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes. Los niveles de AMPK $\alpha$ 1 y FLIP se analizaron por Western Blot (B). Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.



4. *El silenciamiento de AMPK implica una disminución en la expresión de bcl2 que no es suficiente para sensibilizar las células MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL.*

A continuación, se realizó un análisis del resto de las proteínas pro y antiapoptóticas implicadas en la cascada apoptótica desencadenada por TRAIL (figura 14).



**Figura 14:** El silenciamiento de AMPK implica una disminución en la expresión de bcl2 que no es suficiente para sensibilizar las células MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL(I).

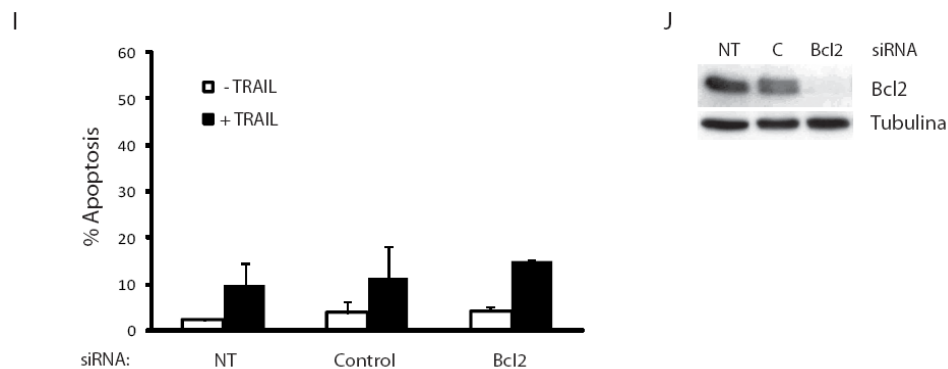
Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (C) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1) durante 48 horas. Pasado ese tiempo, las células se recogieron en Tampón de Lisis y los niveles de AMPK  $\alpha$ 1, mcl1 (A), bid (B), procaspasa-3 (C), bax (D), procaspasa-8 (E), RIP1, XIAP, bcl2 (F), akt (G) procaspasa-9 y bim (H) se analizaron por Western Blot. Los niveles de GAPDH y tubulina se usaron como control de carga. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Tras 48 horas de siRNA contra AMPK no se observaron cambios significativos en los niveles de proteínas tales como mcl1 (figura 14A), bid (figura 14B), bax (figura 14C), procaspasa-8 (figura 14E), RIP1, XIAP (figura 14F), akt (figura 14G), procaspasa-9 o bim (figura 14H). La única proteína testada cuyos niveles se veían reducidos de forma significativa tras la disminución de la expresión de AMPK era bcl2 (figura 14F).

Bcl2 es una proteína que realiza su función antiapoptótica a nivel mitocondrial, por lo que era posible que su disminución, tras el uso de



siRNA frente a AMPK, fuese el factor responsable de la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL. Para comprobar esta hipótesis, se utilizó un oligonucleótido de interferencia frente a bcl2. Como puede observarse en las figuras 14I y 14J, la reducción de los niveles de expresión de bcl2 no era suficiente para sensibilizar las células MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL. Por lo tanto, la disminución de bcl2 tras el silenciamiento de AMPK no es la responsable de esta sensibilización a TRAIL, aunque podría ser necesaria, en combinación con otros factores derivados de la interferencia de AMPK.



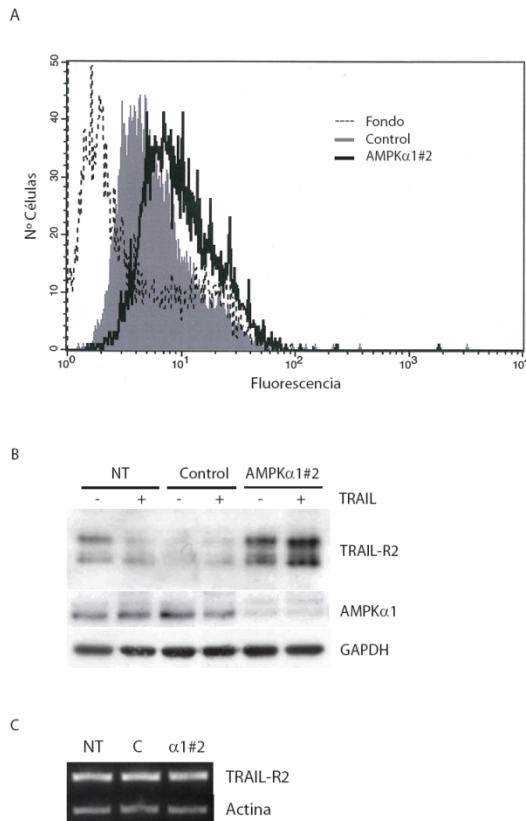
**Figura 14:** El silenciamiento de AMPK implica una disminución en la expresión de bcl2 que no es suficiente para sensibilizar las células MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL.(II).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a bcl2 (Bcl2) durante 48 horas, antes de añadir 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TRAIL. La apoptosis se midió 24 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (I). Los histogramas muestran los valores  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Los niveles de bcl2 y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot (J). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

##### 5. El silenciamiento de AMPK viene acompañado por un aumento en la expresión de TRAIL-R2 en la superficie de las células MDA-MB231.

A continuación se estudiaron los niveles de receptores proapoptóticos de TRAIL (TRAIL-R2), observándose un aumento en la expresión de los mismos en la superficie celular tras el silenciamiento de AMPK (figura 15A). Esto venía acompañado de un aumento de los niveles totales de dicha proteína (figura 15B). Sin embargo, este aumento en la expresión

de TRAIL-R2 no se correspondía con un aumento en los niveles de RNA mensajero (figura 15C).

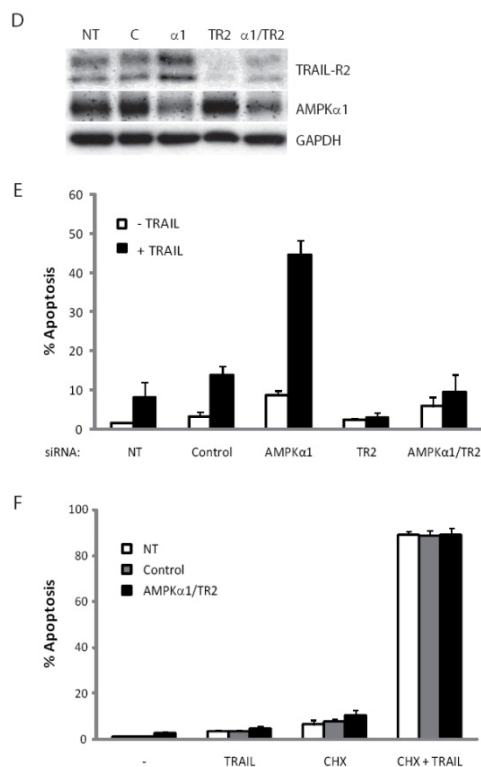


**Figura 15:** El silenciamiento de AMPK induce un aumento en la expresión de TRAIL-R2 implicado en la sensibilización de las células MDA-MB231 a TRAIL (1).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#2) durante 48 horas, tras lo cual se recogieron las células y se analizaron los niveles de receptores de TRAIL DR5/TRAIL-R2 en la superficie celular por citometría, tal como se indica en Materiales y Métodos. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. **(A)**. Los niveles de TRAIL-R2 y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot tras un tratamiento de 16 horas con 1  $\mu$ g/mL de TRAIL **(B)**. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes. Los niveles de mRNA de TRAIL-R2 y actina como control de carga se analizaron por RT-PCR, tal como se describe en materiales y métodos **(C)**. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Para confirmar la implicación de este aumento de TRAIL-R2 en la sensibilización observada tras la disminución de proteína AMPK, se realizaron experimentos combinando siRNA frente a AMPK y TRAIL-R2 al mismo tiempo. En la figura 15D, puede observarse cómo estos siRNAs disminuyen los niveles de AMPK y TRAIL-R2 respectivamente. De nuevo, la disminución de AMPK aumentaba los niveles de proteína TRAIL-R2, incluso en el caso de combinar siRNA frente a AMPK y TRAIL-R2 al mismo tiempo. En este último caso, el aumento de TRAIL-R2 mediado por el siRNA frente a AMPK equiparaba aproximadamente los niveles de TRAIL-R2 con los niveles basales en estas células (NT ó C). Sin embargo, la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL debida a la bajada de

AMPK se bloqueaba cuando se reducían AMPK y TRAIL-R2 simultáneamente (figura 15E). De forma paralela, los niveles de TRAIL-R2 en estas condiciones sí seguían siendo suficientes para sensibilizar estas células a TRAIL tras un pretratamiento con cicloheximida (figura 15F).



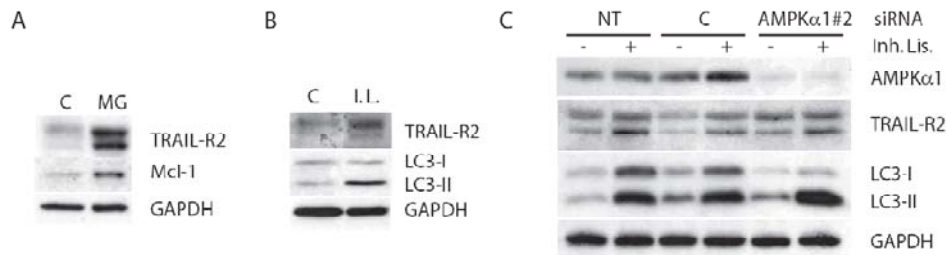
**Figura 15:** El silenciamiento de AMPK induce un aumento en la expresión de TRAIL-R2 implicado en la sensibilización de las células MDA-MB231 a TRAIL (II).

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control ó C) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1 ó  $\alpha$ 1) y/o frente a TRAIL-R2 (TR2) durante 48 horas. Los niveles de TRAIL-R2, AMPK y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot (D). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes. El porcentaje de apoptosis se midió analizando la población sub-G1 por citometría de flujo después de añadir 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 24 horas (E) o tras un pretratamiento de 5  $\mu$ g/mL de cicloheximida (CHX) 1 hora antes de añadir 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 24 horas (F). Los histogramas muestran los valores  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Estos datos indican que la actividad de AMPK favorece la supervivencia de las células tumorales de mama MDA-MB231 frente a TRAIL, ya que su silenciamiento sensibiliza a dichas células a este estímulo apoptótico. En esta sensibilización juega un papel esencial el aumento de receptores proapoptóticos TRAIL-R2 en la superficie celular.

Este aumento en los niveles de TRAIL-R2 no es debido a una inducción transcripcional (figura 15C), por lo que debe tratarse de una regulación postraduccional. Se ha descrito que la degradación de TRAIL-R2 puede ser lisosomal [Austin et al., 2006; Zhang and Zhang, 2008] o mediada por el proteasoma [Hougardy et al., 2006; Wicovsky et al., 2005]. En las células MDA-MB231, comprobamos que la inhibición de ambos procesos

degradativos inducía la acumulación de TRAIL-R2 (figura 16A y B), al mismo tiempo que se acumulaban Mcl-1 y LC3-II por inhibición del proteasoma y de la autofagia respectivamente.



**Figura 16:** Regulación de TRAIL-R2 por el proteasoma y las enzimas lisosomales en las células MDA-MB231.

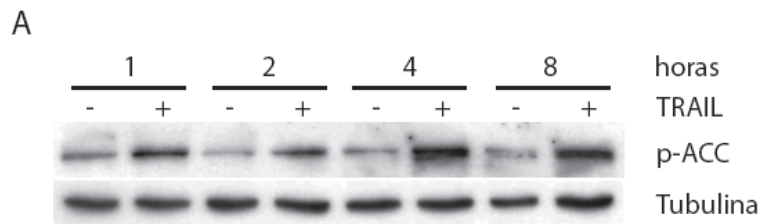
Las células MDA-MB231 se trataron durante 8 horas con MG-132 25  $\mu$ M (MG) **(A)** o 10  $\mu$ g/mL de E64d y 10  $\mu$ g/mL de Pepstatina A (inhibidores de enzimas lisosomales, I.L.) **(B)**. Los niveles de TRAIL-R2, Mcl-1, LC3 y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (C) o con un siRNA frente a AMPK $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1#2) durante 48 horas antes de añadir 10  $\mu$ g/mL de E64d y 10  $\mu$ g/mL de Pepstatina A (Inh. Lis.) durante 24 horas **(C)**. Los niveles de AMPK, TRAIL-R2, LC3 y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Ya que la actividad AMPK está implicada en la inducción de autofagia en determinados tipos celulares a través de la inhibición de mTOR [Meley et al., 2006], nos preguntamos si la actividad basal de AMPK podría estar regulando la autofagia basal en las células MDA-MB231, regulando así los niveles de TRAIL-R2 celulares. Sin embargo, el siRNA de AMPK no reducía la acumulación basal de LC3-II en estas células, aunque disminuía los niveles basales de LC3-I (figura 16C). Teniendo en cuenta que la inhibición de autofagia mediante 3-Metiladenina (3-MA) y siRNA frente a beclina no inducía la acumulación de TRAIL-R2 (datos no mostrados), concluimos que la autofagia basal de estas células no era responsable de la degradación de este receptor proapoptótico. Por lo tanto, son necesarios más estudios para determinar el mecanismo de regulación de los niveles de TRAIL-R2 por la actividad AMPK basal en las células MDA-MB231.

### CAPÍTULO 3: Mecanismo de activación de AMPK por TRAIL.

#### 1. TRAIL activa AMPK en células tumorales.

Durante el estudio de la implicación de AMPK en la resistencia y sensibilización a TRAIL en células tumorales de mama, se observó que el simple tratamiento con TRAIL inducía la activación de AMPK, determinada como fosforilación de su sustrato, ACC (figuras 2F, 3E, 7A, C y D, y 17A).

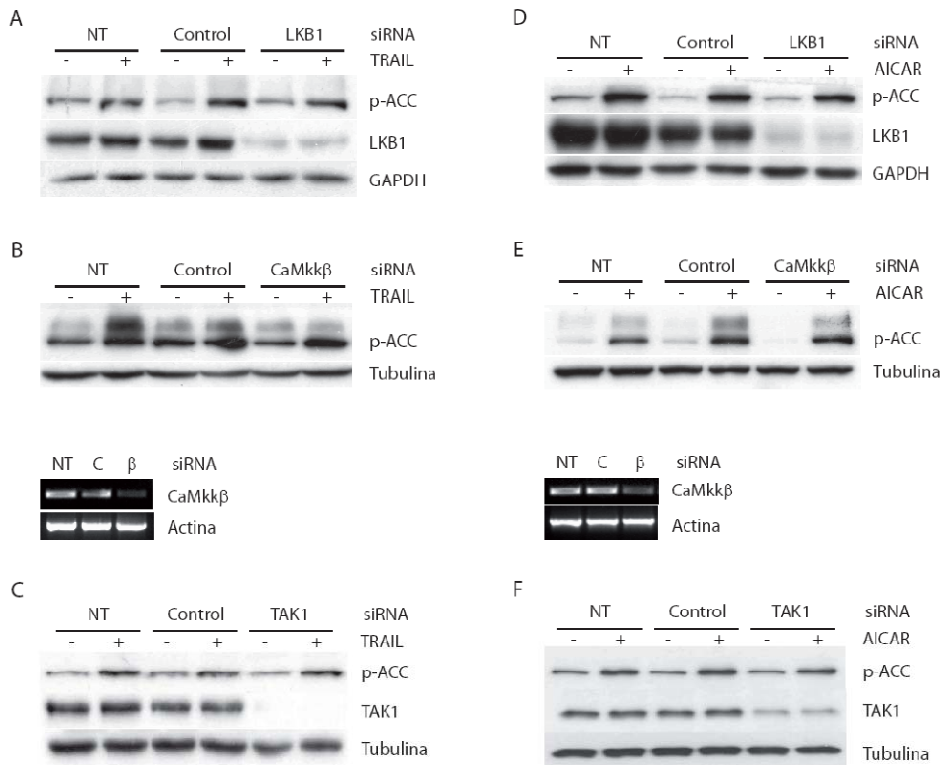


**Figura 17:** El tratamiento con TRAIL activa AMPK en las células tumorales de mama MDA-MB231.

Las células MDA-MB231 se trataron con 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante los tiempos indicados. Los niveles de p-ACC y tubulina como control de carga se analizaron por Western Blot (A). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

#### 2. La reducción de LKB1, CaMkk $\beta$ y TAK1 mediante siRNA no bloquea la activación de AMPK en las células MDA-MB231.

Se procedió a estudiar este mecanismo de activación de AMPK por TRAIL en células tumorales de mama. El primer objetivo fue determinar cuál era la quinasa de AMPK responsable de su activación por TRAIL. Para ello se realizaron experimentos en los que se reducían los niveles de las tres quinasas de AMPK conocidas (LKB1, CaMkk $\beta$  y TAK1) mediante siRNA; y se observaron los niveles de activación de AMPK por TRAIL en estas condiciones. Tal como puede observarse en las figuras 18A, B y C, la reducción de la expresión de estas quinasas por separado no inhibía la activación de AMPK por TRAIL en las células MDA-MB231. Por lo tanto, parecía que ninguna de las tres quinasas de AMPK descritas hasta el momento era imprescindible para la activación de AMPK por TRAIL.



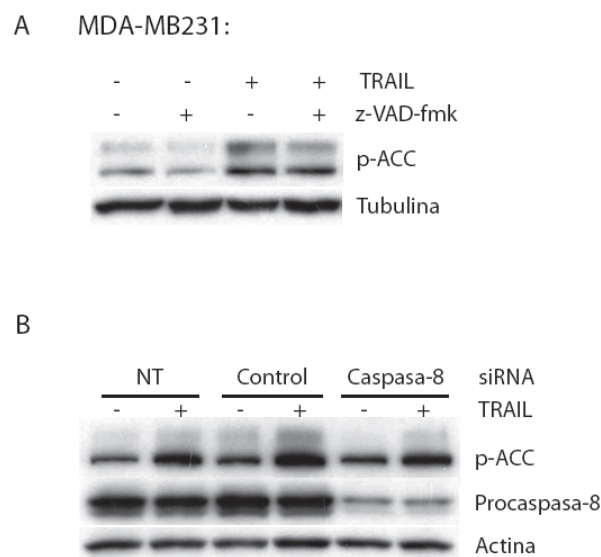
**Figura 18:** La reducción de LKB1, CaMkkβ y TAK1 mediante siRNA no bloquea la activación de AMPK en las células MDA-MB231.

Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a LKB1 (LKB1) (A, D), frente a CaMkkβ (CaMkkβ o β) (B, E) o frente a TAK1 (TAK1) (C, F) durante 48 horas, tras lo cual se añadió 1 μg/mL de TRAIL durante 2 horas (A, B, C) ó 2mM de AICAR durante 16 horas (D, E, F). Los niveles de p-ACC, LKB1, TAK1, GAPDH y tubulina como control de carga se analizaron por Western Blot. Los niveles de mRNA de CaMkkβ y actina como control de carga se analizaron por RT-PCR, tal como se describe en materiales y métodos (B, E). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Este fenómeno no era exclusivo de la activación de AMPK por TRAIL, ya que al reducir los niveles de estas quinasas por separado, tampoco se bloqueó la activación de AMPK inducida por AICAR en estas células tumorales MDA-MB231 (figuras 18D, E y F). En resumen, ninguna de las tres quinasas de AMPK conocidas, LKB1, CaMkkβ o TAK1, es la única responsable de la activación de AMPK en este modelo celular, ya sea mediada por TRAIL o por AICAR.

### 3. La implicación de la actividad caspasa en la activación de AMPK por TRAIL es dependiente del tipo celular.

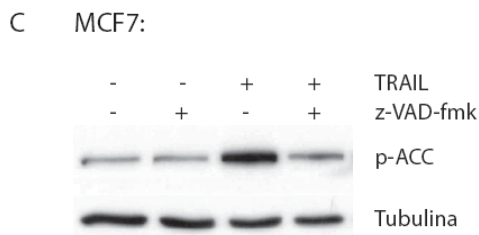
Dado que uno de los primeros pasos en la ruta de señalización de TRAIL es la activación de la caspasa-8 en el DISC, se estudió si la actividad caspasa estaba implicada en este proceso de activación de AMPK. Así, se trataron las células MDA-MB231 con el inhibidor general de caspasas, z-VAD-fmk, durante 1 hora antes de ser tratadas con TRAIL durante 2 horas más. Como puede observarse en la figura 19A, la inhibición de actividad caspasa no bloqueaba la activación de AMPK por TRAIL en estas células. Tampoco se inhibió esta activación reduciendo los niveles de procaspasa-8 mediante siRNA (figura 19B).



**Figura 19:** La implicación de la actividad caspasa en la activación de AMPK por TRAIL es dependiente del tipo celular (1).

Las células MDA-MB231 se trataron con 50  $\mu$ M de z-VAD-fmk durante 1 hora antes de añadir 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 2 horas. Los niveles de p-ACC y tubulina como control de carga se analizaron por Western Blot (A). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Las células MDA-MB231 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (Control) o con un siRNA frente a caspasa-8 (Caspasa-8) durante 48 horas antes de añadir 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 2 horas. Los niveles de p-ACC, procaspasa-8 y actina como control de carga se analizaron por Western Blot (B). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

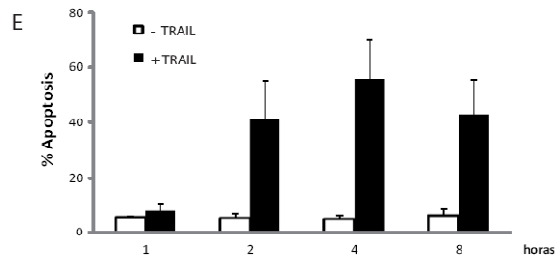
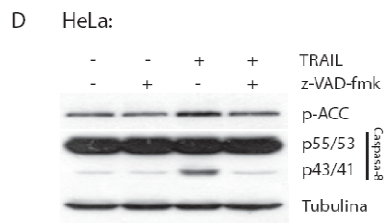
Se llevó a cabo el mismo procedimiento en otra línea celular tumoral de mama: MCF7. Estas células son sensibles a TRAIL, a diferencia de las células MDA-MB231, pero presentan una activación de AMPK muy temprana (figura 19C) (30 minutos de tratamiento con TRAIL), anterior a la ejecución de apoptosis inducida por este ligando. En este tipo celular, la activación de AMPK por TRAIL sí era dependiente de la actividad caspasa (figura 19C).



**Figura 19: La implicación de la actividad caspasa en la activación de AMPK por TRAIL es dependiente del tipo celular (II).**

Las células MCF7 se trataron con 50  $\mu$ M de z-VAD-fmk durante 1 hora antes de añadir 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 30 minutos. Los niveles de p-ACC y tubulina como control de carga se analizaron por Western Blot (C). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Observamos la misma dependencia en otro tipo celular tumoral humano: HeLa (células tumorales de cuello uterino). Estas células son sensibles a TRAIL (figura 19E); y, al igual que las células MCF7, la activación de AMPK, a tiempos de tratamiento en los que aún no se observaba muerte inducida por TRAIL, también resultó ser dependiente de la actividad caspasa (figura 19D).



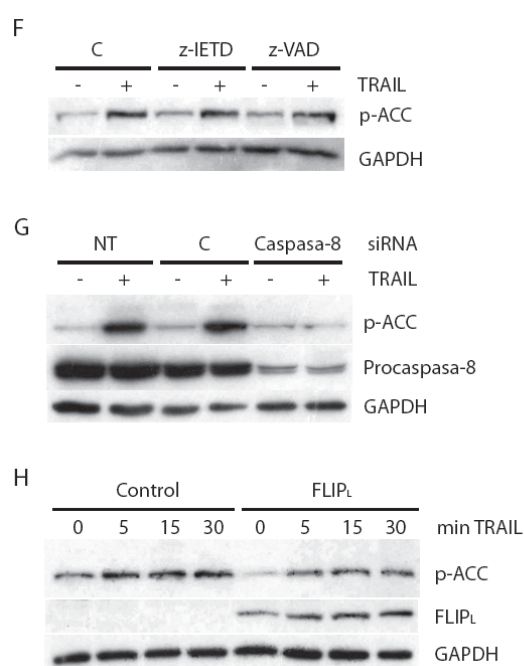
**Figura 19: La implicación de la actividad caspasa en la activación de AMPK por TRAIL es dependiente del tipo celular (III).**

Las células HeLa se trataron con 50  $\mu$ M de z-VAD-fmk durante 1 hora antes de añadir 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 1 hora más. Los niveles de p-ACC, caspasa-8 y tubulina como control de carga se analizaron por Western Blot (D). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Las células HeLa se trataron con 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante los tiempos indicados; y a continuación se midió la apoptosis inducida analizando el porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (E). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes.



Por lo tanto, en lo que concierne a las células tumorales testadas en este estudio, la activación de AMPK por TRAIL es independiente de la actividad caspasa en el caso de las células tumorales resistentes a TRAIL, MDA-MB231, pero dependiente de la activación de caspasas en el caso de células sensibles a TRAIL, MCF7 y HeLa.

Al mismo tiempo que se describía la activación de AMPK por TRAIL en células tumorales de mama; se observó en nuestro grupo de investigación la activación de esta quinasa por TRAIL en células epiteliales no tumorales de mama inmortalizadas. Este proceso estaba relacionado con la inducción de autofagia citoprotectora en estas células MCF10A [Herrero-Martin et al., 2009].



**Figura 19:** La implicación de la actividad caspasa en la activación de AMPK por TRAIL es dependiente del tipo celular (IV).

Las células MCF10A se trataron con 50  $\mu$ M de z-IETD o 10  $\mu$ M de z-VAD-fmk (z-VAD) durante 1 hora antes de añadir 500 ng/mL de TRAIL durante 2 horas. Los niveles de p-ACC y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot (F). Las células MCF10A se transfectaron tal como se describe en el apartado (B) durante 48 horas antes de añadir 500 ng/mL de TRAIL durante 2 horas. Los niveles de p-ACC, procaspasa-8 y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot (G). Las células MCF10A (Control) y MCF10A que sobreexpresaban FLIP<sub>L</sub> (FLIP<sub>L</sub>) se trataron con 500 ng/mL de TRAIL durante los tiempos indicados. Los niveles de p-ACC, FLIP<sub>L</sub> y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot (H). Todos los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

En este modelo celular, la activación de AMPK por TRAIL era independiente de actividad caspasa, al igual que en las células MDA-MB231 (figura 19F), pero dependiente de la proteína caspasa-8, ya que el siRNA frente a esta caspasa sí inhibió el incremento de fosforilación de ACC provocado por TRAIL en estas células (figura 19G). Se observó que, en células MCF10A que sobreexpresaban c-FLIP<sub>L</sub>, un inhibidor

competitivo de caspasa-8 en el DISC, la activación de AMPK por TRAIL seguía siendo la misma que en las células MCF10A controles (figura 19H). Por lo tanto, aunque la actividad de la caspasa-8 no está implicada en la activación de AMPK por TRAIL en estas células, parece que la proteína caspasa-8 como tal juega un papel en dicha activación, de tipo estructural o adaptador.

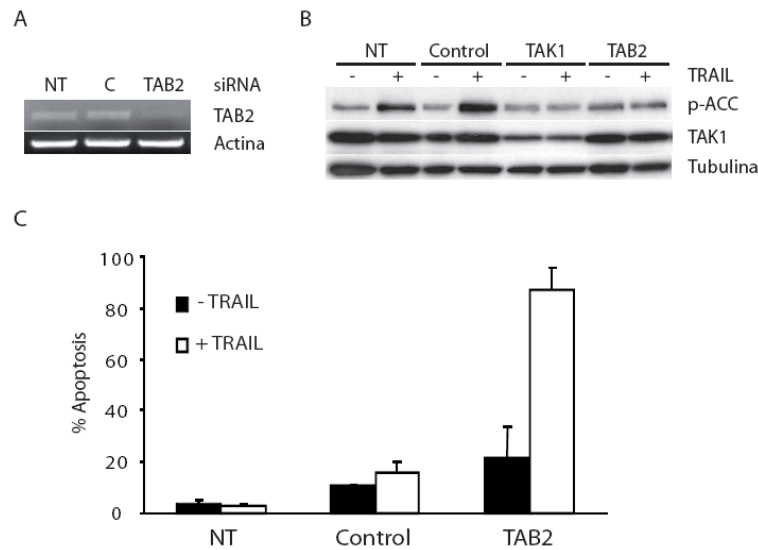
#### 4. *TRAIL activa AMPK en células epiteliales de mama a través de la inducción y activación del complejo TAK1-TAB2.*

La activación de AMPK por TRAIL en las células MCF10A tenía lugar a través de la activación de TAK1 por TRAIL, ya que la disminución de los niveles de TAK1 mediante siRNA era suficiente para eliminar esta activación (figura 20B). Además, el bloqueo de la activación de AMPK por TRAIL, mediante siRNA frente a TAK1 o AMPK, conllevaba, no sólo a la inhibición de la autofagia inducida por TRAIL, sino que sensibilizaba dichas células no tumorales a la apoptosis inducida por este ligando de muerte [Herrero-Martin et al., 2009].

La activación de TAK1 a través de rutas de señalización inducidas por otros estímulos extracelulares, como TNF o IL-1, ya ha sido descrita en numerosas ocasiones en la literatura [Cheung et al., 2004; Ishitani et al., 2003; Kanayama et al., 2004; Shibuya et al., 1996]; pero era la primera vez que se describía la activación de la ruta TAK1-AMPK inducida por TRAIL, por lo que se procedió a estudiar este proceso más en detalle.

En primer lugar, se estudiaron las proteínas implicadas en la activación de TAK1 por las rutas de señalización previamente descritas en la literatura. En concreto, se analizó la implicación de TAB2 (*TAK1 Binding Protein 2*), proteína asociada a TAK1, cuya ubiquitinación es necesaria para la fosforilación y activación de TAK1 por TNF e IL-1. Así, la reducción de la expresión de TAB2 mediante siRNA (figura 20A) era suficiente para bloquear la activación de AMPK por TRAIL (figura 20B), de la misma forma que se bloqueaba tras la disminución de los niveles de TAK1 con siRNA, tal como se había descrito previamente. Además, la reducción de los niveles de TAB2, al impedir la activación de AMPK por TRAIL, sensibilizaba a las células MCF10A a la apoptosis inducida por este ligando de muerte

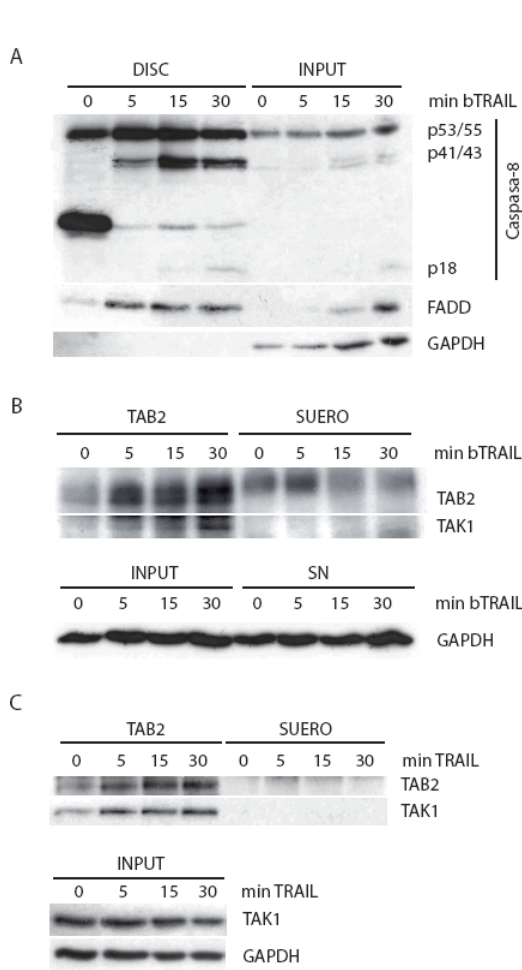
(figura 20C). Por lo tanto, TAB2 es una proteína esencial en el mecanismo de activación de AMPK por TRAIL en células epiteliales de mama.



**Figura 20:** La proteína TAB2 es necesaria para la activación de la ruta TAK1-AMPK por TRAIL en células epiteliales de mama.

Las células MCF10A-GFP-LC3 se transfectaron con Dharmafect tal como se describe en Materiales y Métodos sin siRNA (NT), con un siRNA control (C) o con un siRNA frente a TAK1 (TAK1) o frente a TAB2 (TAB2) durante 48 horas antes de añadir 500 ng/mL de TRAIL. Los niveles de mRNA de TAB2 y actina como control de carga se analizaron por RT-PCR (A). Los niveles de p-ACC, TAK1 y tubulina como control de carga se analizaron, 2 horas después de la adición de TRAIL, por Western Blot (B). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. La apoptosis se midió 24 horas después de la adición de TRAIL como porcentaje de células en sub-G1 por citometría de flujo (C). Los histogramas muestran los valores +/- DE de tres experimentos independientes.

A continuación se estudió la cinética de formación del complejo TAB2-TAK1 en estas células MCF10A tras el tratamiento con TRAIL. Para ello, se trataron las células con 1  $\mu$ g/mL de TRAIL durante 5, 15 ó 30 minutos, y se analizó, en primer lugar, la formación del DISC de TRAIL, tal como se describe en Materiales y Métodos (figura 21A). A continuación, de los sobrenadantes resultantes tras el aislamiento del DISC, se inmunoprecipitó el complejo TAB2-TAK1 con un anticuerpo frente a TAB2 (figura 21B). Como puede observarse en la figura 21B, el tratamiento con TRAIL inducía la formación del complejo TAB2-TAK1, mientras que no se observó la presencia de ninguna de estas dos proteínas en el DISC. Estos datos indican que TRAIL induce la formación del complejo TAB2-TAK1 en el citosol, lo que conlleva a la activación de TAK1 y consiguiente activación de AMPK en estas células epiteliales de mama.



**Figura 21: TRAIL induce la formación del complejo TAB2-TAK1 en células MCF10A.**

Las células MCF10A-GFP-LC3 se trataron con TRAIL biotinilado (bTRAIL) durante los tiempos indicados y a continuación se aisló el DISC tal como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de caspasa-8, FADD y GAPDH como control de carga se analizaron por Western Blot (**A**). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Del sobrenadante resultante del aislamiento del DISC, se inmunoprecipitó TAB2 tal como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de TAK1 y TAB2 en los inmunoprecipitados, y los niveles de GAPDH como control de carga en los lisados, antes de la inmunoprecipitación (INPUT) y después de ella (SN), se analizaron por Western Blot (**B**). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Las células MCF10A-GFP-LC3 se trataron con TRAIL durante los tiempos indicados y a continuación se inmunoprecipitó TAB2 tal como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de TAK1 y TAB2 en los inmunoprecipitados, y los niveles de TAK1 y GAPDH como control de carga en los lisados, antes de la inmunoprecipitación (INPUT) se analizaron por Western Blot (**C**). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Se obtuvieron los mismos resultados al inmunoprecipitar el complejo TAB2-TAK1 directamente, sin realizar una precipitación previa del DISC (figura 21C).

Los datos obtenidos sugieren que TRAIL induce la activación de AMPK en las células epiteliales de mama MCF10A a través de la inducción del complejo TAB2-TAK1, con la consiguiente activación de TAK1, una de las quinasas conocidas capaces de activar a AMPK por fosforilación. La activación de la ruta de señalización TAB2/TAK1/AMPK por TRAIL parece desempeñar una función de supervivencia, dado que la eliminación selectiva de cualquiera de estas proteínas sensibiliza a estas células a la apoptosis inducida por TRAIL (figura 20C y [Herrero-Martin et al., 2009]).

## VII. DISCUSIÓN



*1. Sensibilización a TRAIL por activadores de AMPK, a través de una regulación negativa de FLIP independiente de AMPK.*

AMPK es el sensor del estado energético celular [Hardie, 2007]. Cuando se activa en respuesta a un estrés energético inhibe los procesos anabólicos celulares, como la síntesis de proteínas y ácidos grasos, impidiendo el gasto de moléculas de ATP. Al mismo tiempo, induce la activación de procesos catabólicos, como la degradación de ácidos grasos por parte de la mitocondria, o la degradación de contenido citoplasmático en los autofagosomas, mediante la inhibición de mTOR [Pattingre et al., 2008]. De este modo, AMPK regula el metabolismo celular hasta que el cociente AMP/ATP en la célula adquiere niveles normales.

Además, la activación de AMPK también produce una parada en el ciclo celular en G1, a través de la activación de p53, lo cual permite la recuperación de los niveles energéticos antes de que la célula avance en el ciclo celular. Si p53 no es funcional, la activación de AMPK no inducirá este punto de control y la célula finalmente morirá por apoptosis [Jones et al., 2005].

La implicación de AMPK en apoptosis es controvertida, aunque existen numerosos estudios en los que se relaciona su activación con la inducción de apoptosis en determinados tipos celulares, sobre todo tumorales. Así por ejemplo, AICAR es capaz de inducir apoptosis en linfocitos B leucémicos [Campas et al., 2003]. Más recientemente, se ha descrito que la activación de AMPK por estrés energético puede inducir apoptosis dependiente de p53 [Okoshi et al., 2008]; incluso favorecer la apoptosis inducida por el factor de transcripción E2F1 [Hallstrom et al., 2008]. Por lo tanto, la activación de AMPK podría tener un papel proapoptótico en determinados tipos celulares.

TRAIL es una citoquina de la familia de TNF $\alpha$  capaz de inducir apoptosis en células tumorales a través del reclutamiento de sus receptores de muerte en la superficie de la membrana celular. Sin embargo, tiene una toxicidad mínima sobre las células normales, lo que le confiere características interesantes como agente antitumoral [Ashkenazi et al., 1999; Ichikawa et al., 2001; Lawrence et al., 2001].

Sin embargo, existen multitud de células tumorales que son resistentes a TRAIL, en concreto muchas células tumorales de mama. La adquisición de resistencia puede deberse a una inhibición de la ruta apoptótica, por ejemplo a nivel del DISC (por disminución de los receptores o sobreexpresión de c-FLIP), o a nivel mitocondrial (por sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2 antiapoptóticas). Además, TRAIL puede señalizar para supervivencia y proliferación en determinadas células tumorales a través de NF- $\kappa$ B y PI3K/Akt [Morel et al., 2005; Trauzold et al., 2006]. Por lo tanto, la sensibilización a TRAIL mediante otros agentes que favorezcan o faciliten su señalización apoptótica, puede ser una buena estrategia para eliminar de manera eficiente las células tumorales resistentes a esta citoquina, impidiendo sus efectos adversos de proliferación y metástasis [Held and Schulze-Osthoff, 2001].

Nuestro laboratorio se ha centrado en el estudio de la resistencia a TRAIL en células tumorales de mama humanas y los posibles tratamientos capaces de eliminar dicha resistencia. En concreto, se ha observado que la formación del DISC es una buena diana para sensibilizar estas células a TRAIL [Palacios et al., 2006; Ruiz-Ruiz et al., 2000].

Se ha descrito que la falta de glucosa, estímulo activador de AMPK, sensibiliza las células tumorales a la apoptosis inducida por receptores de muerte mediante un aumento en los niveles del DISC [Munoz-Pinedo et al., 2003]. También existen evidencias de que AICAR es capaz de sensibilizar a TRAIL en células de cáncer de colon [Su et al., 2007]. Por lo tanto, en el presente trabajo se ha tratado de determinar si la activación de AMPK es capaz de sensibilizar a TRAIL en células tumorales de mama humanas resistentes a esta citoquina.

Para ello se utilizaron diferentes estímulos de AMPK, algunos indirectos, como la limitación de glucosa o la Fenformina [Owen et al., 2000], los cuales aumentan el cociente AMP/ATP intracelular; y otros directos, como AICAR y el compuesto A-769662, los cuales favorecen la activación de AMPK mediante una interacción directa con dicha quinasa, cada uno de ellos por unión a una subunidad diferente [Day et al., 2007; Sanders et al., 2007a].

En este trabajo se demuestra que un pretratamiento con estos estímulos sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL en diferentes



células tumorales de mama de forma dependiente de la concentración, a la vez que activan AMPK (figuras 1 y 2). En todos los casos, salvo en el de la Fenformina, los activadores de AMPK sensibilizan a TRAIL a concentraciones elevadas, a las cuales provocan una activación máxima de AMPK (figuras 1A, B, C, D, E y F). Sin embargo, en el caso de la Fenformina no hemos observado correlación entre la activación de AMPK y la sensibilización a TRAIL (figuras 1G y H). Las diferencias observadas en la activación de AMPK por Fenformina comparando los niveles de p-ACC (figura 1H) con la medida de actividad AMPK (figura 1J), podría deberse a que este segundo método sea menos sensible que el primero, ya que se trata de un ensayo 'in vitro', mientras que los niveles de p-ACC son el resultado de la actividad AMPK 'in vivo'.

Por otro lado, la activación de AMPK por la Fenformina es menor que la obtenida por el resto de estímulos utilizados en este trabajo (figuras 1B, 1D, 1J, 7A, 8A y 10F). La causa de que la Fenformina no active AMPK tan intensamente como el resto de estímulos puede deberse a que es un inhibidor de la cadena de electrones de la respiración oxidativa mitocondrial [Davidoff, 1971; Steiner and Williams, 1958]. Las células tumorales obtienen la mayor parte de su energía de la vía glucolítica, la cual tienen sobreactivada en detrimento de la fosforilación oxidativa mitocondrial, que pasa a un segundo plano [Warburg, 1956]. La mitocondria se convierte entonces en fuente de metabolitos intermedios para la síntesis de macromoléculas, perdiendo su función de motor energético celular. Por lo tanto, la inhibición de la cadena transportadora de electrones por parte de la Fenformina no debe alterar demasiado el ratio AMP/ATP intracelular en células tumorales, activando así más levemente a AMPK que el resto de estímulos usados en este trabajo.

Usando AICAR como activador de AMPK, observamos que la sensibilización a TRAIL en las células tumorales de mama MDA-MB231 por estos estímulos es un mecanismo apoptótico dependiente de caspasas (figura 3A), teniendo lugar la activación de las vías extrínseca e intrínseca (figuras 3B, C y D).

El siguiente paso fue intentar demostrar la relación entre la actividad AMPK y la sensibilización a TRAIL en estas células. La primera aproximación a esta cuestión se realizó mediante el silenciamiento de

AMPK, usando oligos de RNA interferente para la subunidad catalítica  $\alpha 1$  de esta proteína, ya que la isoforma  $\alpha 2$  apenas tiene actividad en este tipo celular. Sin embargo, usando esta herramienta no se eliminó la sensibilización a TRAIL observada tras pretratamientos con AICAR, limitación de glucosa o Fenformina (figuras 4A, B y C). Esto puede deberse a que los niveles de AMPK no desaparecen totalmente tras el RNA interferente, e incluso se sigue observando fosforilación de ACC por estos estímulos.

La siguiente herramienta usada para eliminar la activación de AMPK fue la sobreexpresión de una isoforma dominante negativa de AMPK $\alpha 1$  (AMPK $\alpha 1$ -DN), competitiva con la isoforma endógena y con una mutación en el Asp157 a Ala157 que la convierte en inactiva. La sobreexpresión de esta isoforma inactiva eliminó, casi en su totalidad, la activación de AMPK por A-769662, atendiendo tanto a los niveles de p-ACC como a su actividad 'in vitro' (figuras 5A y B). Sin embargo, no fue capaz de reducir la sensibilización a TRAIL por A-769662 (figura 5C).

Por otro lado, se sobreexpresó una isoforma mutada de la subunidad  $\gamma$  (AMPK $\gamma 2$ -R531G), que convierte a AMPK en constitutivamente activa, con una actividad quinasa incluso mayor que la que se obtiene al pretratar las células con A-769662 (figura 6B y C). Sin embargo, esta actividad no era suficiente para sensibilizar estas células a la apoptosis inducida por TRAIL (figura 6D).

En resumen, estos datos indican que la activación de AMPK no sensibiliza a las células tumorales de mama MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL, y que la sensibilización observada tras un pretratamiento con activadores de AMPK, como AICAR, A-769662, limitación de glucosa o Fenformina, es independiente de la activación de AMPK.

La falta de glucosa altera el metabolismo glucolítico celular, limitando no sólo los niveles energéticos, sino también el aporte de metabolitos necesarios para macromoléculas [Guppy et al., 1993]. La Fenformina es capaz de reducir la fosforilación de Akt y GSK-3 (glucógeno sintasa quinasa-3) independientemente de AMPK, al igual que el AICAR [King et al., 2006]. Se ha demostrado en multitud de ocasiones que AICAR tiene otras muchas dianas además de AMPK [Longnus et al., 2003; Vincent et

al., 1991], en concreto, se ha observado que AICAR tiene efectos proapoptóticos en células leucémicas humanas independientemente de la activación de AMPK [Lopez et al., 2003]. Por lo tanto, ninguno de estos estímulos es un activador específico de AMPK.

El compuesto A-769662 se describió como un activador específico de AMPK [Cool et al., 2006], que no afectaba de forma significativa a otras quinasas [Goransson et al., 2007]. Sin embargo, según nuestros resultados, el compuesto A-769662 sensibiliza a TRAIL independientemente de AMPK, por lo que no es absolutamente específico de AMPK. También se han descrito efectos independientes de AMPK en otros contextos, por ejemplo, puede inhibir la actividad del proteasoma 26S [Moreno et al., 2008], disminuir la producción de glucosa en hepatocitos [Scott et al., 2008] y activar el consumo de glucosa en células de músculo esquelético de ratón mediante la activación de la ruta PI3K/Akt [Treebak et al., 2009].

Aunque no hemos sido capaces de describir el mecanismo de sensibilización a TRAIL por todos estos activadores de AMPK en células tumorales de mama, se ha observado que un evento común a todos ellos es la disminución de los niveles de c-FLIP<sub>L</sub> y c-FLIP<sub>S</sub>, de forma independiente de AMPK (figura 10D).

La disminución de los niveles de c-FLIP es suficiente para sensibilizar las células tumorales de mama a TRAIL [Palacios et al., 2006], facilitando la activación de caspasa-8 en el DISC [MacFarlane et al., 2002]. Así, la disminución de c-FLIP por activadores de AMPK es necesaria para que tenga lugar la sensibilización a TRAIL en estas células (figura 10E y 10F).

Aunque parece que los activadores de AMPK disminuyen los niveles de c-FLIP favoreciendo su degradación por el proteasoma (figura 10G), se desconoce el mecanismo mediante el cual sucede esto. Está descrito que la regulación transcripcional de c-FLIP tiene lugar a través las vías PI3K/Akt/Foxo3a [Cornforth et al., 2008] y NF- $\kappa$ B [Micheau et al., 2001]; mientras que a nivel postraducciona, c-FLIP se degrada por el proteasoma, mediante su ubiquitinación por dos E3 ubiquitin ligasas conocidas hasta el momento, Itch [Chang et al., 2006] y c-Cbl [Kundu et al., 2009]. Estas enzimas son las responsables de la degradación de c-FLIP

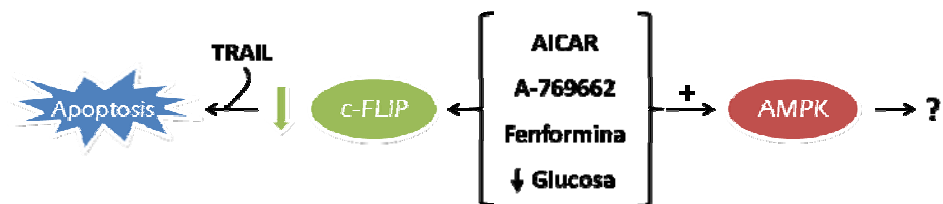
en presencia de TNF $\alpha$ , sin embargo la ubiquitin ligasa que regula los niveles de c-FLIP basales aún no se ha descrito.

La ubiquitinación de c-FLIP puede depender de su estado de fosforilación. Por ejemplo, tras la estimulación con TNF $\alpha$ , Akt puede fosforilar a c-FLIP<sub>L</sub> en el residuo Ser273, no presente en las isoformas cortas de FLIP, y señalar así para su degradación por el proteasoma [Shi et al., 2009]. Sin embargo, está descrito que el AICAR, la Fenformina y la limitación de glucosa son capaces no de activar, sino de inhibir Akt de forma independiente de AMPK [King et al., 2006; Nam et al., 2002], por lo que podrían inhibir la expresión de c-FLIP a nivel transcripcional, no postraduccional. A-769662, en contraposición, puede activar la ruta PI3K/Akt independientemente de AMPK [Trebbak et al., 2009], lo que podría señalar para la fosforilación de c-FLIP por Akt, y su posterior degradación por el proteasoma.

Recientemente se ha descrito que c-FLIP puede ser fosforilado por la PKC en la Ser193, presente tanto en la isoforma larga como en las cortas [Kaunisto et al., 2009]. Esta fosforilación regula la ubiquitinación y estabilidad de c-FLIP. Por otro lado, está descrito que el mecanismo de activación de AMPK por la Metformina es a través de la activación de PKC [Xie et al., 2008a]. Un mecanismo similar es el que tiene lugar en la activación de AMPK por estatinas [Choi et al., 2008]; y se ha descrito que el tratamiento con AICAR conlleva a la activación de isoformas atípicas de la PKC [Chen et al., 2002]. También se ha observado que la deprivación de glucosa es capaz de inducir la activación de la PKC [Gupta et al., 1997; Takeda et al., 2004a], sobre todo en modelos de isquemia (deprivación de glucosa y oxígeno) [Downey et al., 1994; Padanilam, 2001]. Esto podría explicar la regulación de c-FLIP observada en este trabajo por la Fenformina, el AICAR y la limitación de glucosa.

En resumen, todos los activadores de AMPK regulan los niveles de la proteína c-FLIP independientemente de AMPK (figura S1). Aunque desconocemos el mecanismo de regulación, es improbable que sea el mismo para todos los estímulos activadores de AMPK utilizados. A continuación sería necesario describir si estos estímulos activan Akt o PKC, y si estas quinasas fosforilan a c-FLIP en estos modelos, señalizando así para su degradación. Además, sería interesante identificar la o las

ubiquitín ligasas implicadas en el mecanismo de regulación postranscripcional de c-FLIP por los activadores de AMPK.



| *Figura S1:* Mecanismo de sensibilización a TRAIL por activadores de AMPK.

## 2. Sensibilización a TRAIL por silenciamiento de AMPK, a través de la inducción de TRAIL-R2.

La activación de AMPK no está relacionada con la sensibilización a TRAIL observada en las células tumorales de mama tras los pretratamientos con activadores de AMPK. Más aún, cuando se disminuyeron los niveles de AMPK mediante siRNA, la sensibilización a TRAIL debida a estos estímulos era aún mayor que cuando no se silenciaba dicha proteína (figuras 4A, B y C). Incluso, el silenciamiento de AMPK por sí solo era capaz de sensibilizar las células MDA-MB231 a la apoptosis inducida por TRAIL (figuras 11A y C).

En células tumorales de próstata humana, se ha descrito que la inhibición de AMPK sensibiliza a FasL induciendo la degradación proteasomal de c-FLIP [Jung et al., 2009]. No obstante, en nuestro modelo no se detectaron cambios en los niveles de c-FLIP tras el siRNA de AMPK (figura 13B). Sin embargo, sí se detectó una disminución de los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (figura 14F) y un aumento de los niveles de TRAIL-R2, tanto totales como expresados en la superficie celular (figuras 15A y B). Aunque la disminución en los niveles de Bcl-2 no era suficiente para sensibilizar estas células a la apoptosis inducida por TRAIL (figuras 14I y J), el aumento de los receptores de TRAIL era necesario para que tuviera lugar esta sensibilización mediada por el silenciamiento de AMPK (figuras 15D y E).

Los niveles de TRAIL-R2 pueden estar regulados a nivel transcripcional por dos factores de transcripción conocidos, p53 [Wu et al., 1997] y CHOP [Yamaguchi and Wang, 2004], inducibles por daño al DNA y estrés en el retículo endoplásmico, respectivamente. Así, se ha descrito la regulación de TRAIL-R2 a nivel de mensajero por multitud de fármacos, como la Tapsigargina [He et al., 2002] y la Tunicamicina [Jiang et al., 2007], activadores de la respuesta del retículo endoplásmico a proteínas mal plegadas; o a través de agentes que dañan el DNA, como el Etopóxido [Nagane et al., 2000], la Doxorubicina [Wen et al., 2000; Wu et al., 1997] o la radiación ionizante [Chinnaiyan et al., 2000].

Está descrito que AMPK es capaz de activar p53 [Jones et al., 2005], por lo que la reducción de los niveles de AMPK podría incidir negativamente en la regulación de los niveles de TRAIL-R2 a través de este

factor de transcripción. Si este fuese el caso, la inhibición de p53 tras el siRNA de AMPK supondría una disminución en los niveles de TRAIL-R2, resultado opuesto al obtenido en este trabajo. Además, según nuestros datos, la regulación de TRAIL-R2 por AMPK no es a nivel transcripcional (figura 15C), por lo tanto, debe tratarse de una regulación a nivel postranscripcional, independiente de la regulación que ejerce p53 sobre TRAIL-R2. Se ha descrito que la degradación de TRAIL-R2 puede ser lisosomal [Austin et al., 2006; Zhang and Zhang, 2008] o mediada por el proteasoma [Hougarly et al., 2006; Johnson et al., 2003]; y nuestros datos indican que en las células MDA-MB231 ambos procesos participan en la regulación de los niveles proteicos basales de TRAIL-R2 (figura 16A y B).

Ya que la actividad AMPK está implicada en la inducción de autofagia en determinados tipos celulares a través de la inhibición de mTOR [Meley et al., 2006], nos preguntamos si la actividad basal de AMPK podría estar regulando la autofagia basal en las células MDA-MB231, regulando así los niveles de TRAIL-R2 celulares. Sin embargo, nuestros datos indicaban que la autofagia basal de estas células no estaba regulada por AMPK, y que la acumulación de TRAIL-R2 por siRNA frente a AMPK y por inhibición de las enzimas lisosomales era independiente y aditiva (figura 16C).

Se observó al mismo tiempo que la disminución de AMPK mediante siRNA disminuía los niveles citosólicos de LC3 (LC3-I), pero no afectaba a los niveles de LC3 conjugados con fosfatidil etanolamina (PE), los cuales son los que se encuentran asociados a los autofagosomas (LC3-II) [Kabeya et al., 2000], ni impedía su acumulación por los inhibidores de las enzimas lisosomales. LC3 es una molécula marcadora de autofagia [Mizushima and Yoshimori, 2007], implicada en la expansión del fagóforo (precursor de la membrana autofagosómica) [Xie et al., 2008b]. Sin embargo, no se ha descrito ninguna función de LC3-I no conjugado con PE, por lo que desconocemos las implicaciones que puede tener una disminución de estos niveles de LC3 citosólico por el siRNA de AMPK.

Por otro lado, recientemente se ha descrito que la activación de AMPK mediada por AICAR o Metformina, es capaz de inhibir al proteasoma [Viana et al., 2008], y se ha detectado que tanto las subunidades AMPK $\alpha$  y AMPK $\beta$  interaccionan con una subunidad proteica

no-ATPasa de la tapa del proteasoma 26S, PSMD11, cambiando su estado de fosforilación [Moreno et al., 2009]. Estos datos contradirían una implicación de la actividad basal de AMPK en la regulación positiva del proteasoma. Además, según nuestros datos, la reducción de los niveles de AMPK no inhibe el proteasoma, ya que, por ejemplo, no induce la acumulación de FLIP, proteína de vida media corta regulada por el proteasoma (figura 13).

En lo que concierne a la regulación de TRAIL-R2 por el proteasoma, la mayor parte de los estudios realizados describen cómo los distintos inhibidores del proteasoma utilizados inducen la acumulación de TRAIL-R2 a través de un aumento de los niveles de RNA mensajero [Liu et al., 2007; Yoshida et al., 2005]. Sin embargo, existen algunos trabajos que describen cómo la proteína TRAIL-R2 también puede degradarse por el proteasoma [Hougardy et al., 2006; Johnson et al., 2003], e incluso se ha observado que los inhibidores del proteasoma inducen la estabilización de TRAIL-R2 ubiquitinado [Johnson et al., 2003]. Hoy en día no se ha descrito ninguna ubiquitín ligasa de este receptor, aunque sí se ha detectado la localización de la ubiquitín ligasa CUL3 en el DISC de TRAIL, implicada en la estabilización del dímero activo de caspasa-8 [Jin et al., 2009]. Sin embargo se desconoce si esta ligasa puede tener otras dianas en este complejo inductor de muerte.

Aunque no hay nada descrito acerca de la regulación de TRAIL-R2 por AMPK, sí se ha descrito que la activación de AMPK puede aumentar la expresión de ubiquitín ligasas específicas del tejido muscular a través de la inducción de los factores de transcripción FOXO [Krawiec et al., 2007; Nakashima and Yakabe, 2007; Tong et al., 2009]. También se ha observado que AMPK fosforila a Nedd4-2, la ubiquitín ligasa que regula los canales de sodio epiteliales (ENaC), regulando su actividad de forma positiva [Almacá et al., 2009; Bhalla et al., 2006]. Por otro lado, se ha descrito que la fosforilación por AMPK en ciertos casos señala para la degradación de sus sustratos. Así, la fosforilación de la subunidad reguladora R5 de la PP1 (Proteína fosfatasa de tipo 1) por AMPK induce su unión al complejo lanforina-malina, acelerando su ubiquitinación y degradación por el proteasoma [Vernia et al., 2009].



Por lo tanto, es posible que AMPK regule de algún modo el estado de ubiquitinación de TRAIL-R2, ya sea fosforilándolo o afectando a los niveles o actividad de su ubiquitín ligasa. Así, cuando se reducen los niveles de AMPK mediante siRNA, esta regulación podría perderse, inhibiéndose así la degradación proteasomal de TRAIL-R2, lo que conllevaría a su acumulación. No obstante, son necesarios más estudios para confirmar o descartar esta teoría de regulación de TRAIL-R2 por la actividad basal de AMPK. También sería muy interesante describir la o las ubiquitín ligasas implicadas en dicho proceso.

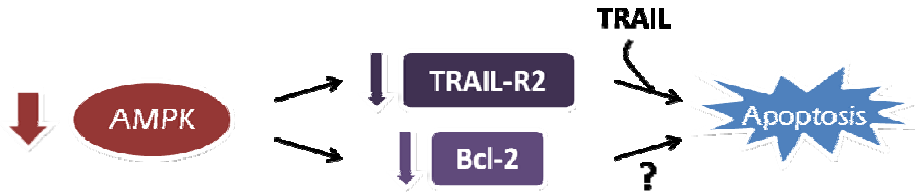


Figura S2: Mecanismo de sensibilización a TRAIL por silenciamiento de AMPK.

### 3. Mecanismo de activación de AMPK por TRAIL.

Durante el desarrollo de este proyecto, se observó que TRAIL era capaz de activar AMPK por sí solo en las células tumorales de mama MDA-MB231 (figuras 3E, 7A, C y D, y 17A). Se ha intentado describir el mecanismo, pero no se ha identificado la quinasa responsable de la activación de AMPK tras el tratamiento con TRAIL (figuras 18A, B y C). Esto podría deberse a que el siRNA frente a LKB1, CaMkk $\beta$  y TAK1 no eliminase suficientemente los niveles de dichas proteínas. Sin embargo, en el laboratorio se ha descrito recientemente la activación de AMPK por TRAIL en células epiteliales de mama (MCF10A) a través de TAK1. En estos experimentos, el mismo siRNA frente a TAK1 eliminó los niveles de TAK1 de forma similar a como lo hacía en este modelo celular (MDA-MB231) [Herrero-Martin et al., 2009]. Sin embargo, el mecanismo de activación de AMPK en las células tumorales de mama MDA-MB231 no es dependiente de una sola de las quinasas de AMPK conocidas (LKB1, CaMkk $\beta$  o TAK1), ya que la disminución de cada una de ellas mediante siRNA no reduce la activación de AMPK por TRAIL.

También es posible que exista otra quinasa de AMPK aún sin describir. Por ejemplo, se ha observado que la actividad de JNK es capaz de modular la activación de AMPK, aunque el mecanismo directo o indirecto de activación no se ha descrito [Yun et al., 2009]. En nuestro trabajo hemos observado que el inhibidor de JNK, SP600125, bloquea la activación de AMPK por AICAR, Fenformina y limitación de glucosa (figuras 7B, C y D), medida como grado de fosforilación de ACC.

El compuesto SP600125 es un inhibidor de JNK que compite con el ATP en su sitio de unión a esta proteína [Bennett et al., 2001]. Sin embargo, se ha descrito que el SP600125 es capaz de inhibir a otras proteínas independientemente de JNK, como a la quinasa Mps1 (*Mitotic checkpoint kinase monopolar spindle 1*), implicada en el control del punto de control mitótico [Schmidt et al., 2005]. En concreto, se ha descrito que el SP600125 es capaz de reducir la actividad de AMPK 'in vitro' en un 74% [Bain et al., 2003], y existen datos en los que se observa cómo el SP600125 inhibe a AMPK 'in vivo', aunque no se ha descrito si directa o indirectamente [Andersson et al., 2006]. Por lo tanto es posible que este

compuesto compita con el ATP y AMP en los dominios Bateman de la subunidad AMPK $\gamma$ , inhibiendo así directamente a AMPK.

Por otro lado, la actividad caspasa parece estar implicada en la activación de AMPK por TRAIL dependiendo del tipo celular estudiado. Así, en las células MDA-MB231 la activación de AMPK por TRAIL es independiente de actividad caspasa (figura 19A), mientras en las células MCF7 y HeLa, dos líneas celulares sensibles a TRAIL, esta activación sí depende de actividad caspasa (figuras 19C y D). Posiblemente, en las células sensibles a TRAIL la activación de AMPK que observamos es resultado del estrés celular provocado por la activación de la ruta apoptótica.

En las células MDA-MB231, la proteína caspasa-8 no es necesaria para que tenga lugar la activación de AMPK por TRAIL, sin embargo en las células MCF10A, aunque la actividad caspasa no es necesaria, sí lo es la proteína caspasa-8 (figuras 19F y G), que parece tener un papel estructural en la activación de AMPK por TRAIL, ya que la sobreexpresión de c-FLIP<sub>L</sub>, inhibidor competitivo de la caspasa-8 en el DISC, no impide esta activación (figura 19H). Esta diferencia puede radicar en la redundancia entre las quinasas de AMPK que parece existir en las células MDA-MB231 en lo que concierne a su activación por TRAIL y otros estímulos. Sin embargo, en el caso de las líneas celulares de mama no tumorales, MCF10A, la activación de AMPK por TRAIL es a través de la activación de TAK1 y no de las otras quinasas de AMPK conocidas (figura 20B y [Herrero-Martin et al., 2009]). Así, puede ser que la caspasa-8 esté jugando un papel estructural en la activación de TAK1 por TRAIL, pero no se relaciona con la activación de AMPK por otras quinasas, como LKB1 y CaMkk $\beta$ .

Ya que no existían datos previos que describiesen la activación de TAK1/AMPK por TRAIL, profundizamos en el estudio del mecanismo subyacente a esta activación. Para ello, tomamos como referencia modelos de activación de TAK1 por otros estímulos extracelulares, como la IL-1, o más concretamente, el TNF $\alpha$ , un ligando de muerte de la misma familia que TRAIL. Así, demostramos que la proteína adaptadora TAB2 era necesaria para que tuviese lugar la activación de AMPK por TRAIL (figuras 20A y B y [Herrero-Martin et al., 2009]). Además, detectamos la inducción

o estabilización del complejo TAK1-TAB2 tras el tratamiento con TRAIL en estas células (figuras 21B y C).

Por otro lado, tratamos de determinar si RIP1, proteína necesaria para la activación de TAK1 por TNF $\alpha$ , estaba también implicada en la activación de TAK1 por TRAIL. Sin embargo, el siRNA frente a RIP1 no eliminó suficientemente los niveles de esta proteína, ya que no inhibía la degradación de I $\kappa$ B por TNF $\alpha$  (datos no mostrados), por lo que no obtuvimos ninguna conclusión acerca de la implicación de RIP1 en la señalización de TRAIL. Tuvimos las mismas complicaciones al intentar eliminar mediante siRNA proteínas tales como TRAF2, TRAF5 y TRAF6, implicadas en la activación de TAK1 por TNF $\alpha$  e IL-1 (datos no mostrados).

Por lo tanto, son necesarios más estudios para detectar las proteínas implicadas en el mecanismo de activación de TAK1/AMPK por TRAIL.

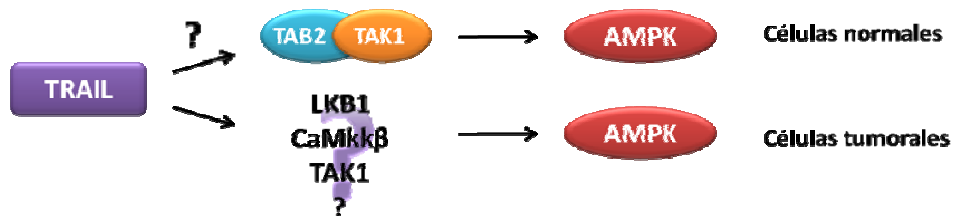


Figura S3: Mecanismo de activación de AMPK por TRAIL en células tumorales y no tumorales epiteliales de mama.

AMPK es el sensor del estado energético celular, capaz de activar un punto de control del ciclo celular de forma reversible, según la disponibilidad de energía que exista en la célula [Jones et al., 2005]. Esto señala a AMPK como un posible guardián implicado en la supervivencia celular.

Según los datos obtenidos durante este trabajo de investigación, la sensibilización a TRAIL observada tras el uso de activadores de AMPK es independiente de la activación de esta quinasa, y una disminución en los niveles basales de AMPK sensibiliza las células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL, mediante un incremento de los niveles de

TRAIL-R2. Además, en células epiteliales de mama no transformadas, TRAIL activa una autofagia citoprotectora a través de la activación de AMPK [Herrero-Martin et al., 2009]. Por lo tanto, nuestros datos apoyan la teoría de que AMPK señala procesos de supervivencia, jugando un papel importante en la viabilidad celular.



## VIII. CONCLUSIONES





1. Los activadores de AMPK directos, como el AICAR y el compuesto A-769662, e indirectos, como la Fenformina y la limitación de glucosa, sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama.
2. La sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL mediada por AICAR, A-769662, Fenformina y limitación de glucosa, en las células tumorales de mama MDA-MB231, es independiente de AMPK.
3. La regulación negativa de los niveles de c-FLIP inducida por los activadores de AMPK está implicada en la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL en las células MDA-MB231.
4. Los niveles basales de expresión de AMPK participan en la resistencia a TRAIL en células tumorales de mama.
5. El silenciamiento de AMPK induce la estabilización de los niveles de TRAIL-R2, tanto totales como expresados en la superficie externa de la membrana celular.
6. El incremento de los niveles del receptor proapoptótico TRAIL-R2, mediado por el silenciamiento de AMPK, está implicado en la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL bajo estas condiciones.
7. TRAIL activa AMPK tanto en células tumorales como en células epiteliales no tumorales de mama.
8. La activación de AMPK por TRAIL en las células epiteliales de mama MCF10A tiene lugar a través del complejo TAB2-TAK1.



## IX. BIBLIOGRAFÍA



- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002): Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9:423-32.
- Adhikary S, Eilers M (2005): Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:635-45.
- Aho TL, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M, Koskinen PJ (2004): Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett* 571:43-9.
- Ai H, Ihlemann J, Hellsten Y, Lauritzen HP, Hardie DG, Galbo H, Ploug T (2002): Effect of fiber type and nutritional state on AICAR- and contraction-stimulated glucose transport in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E1291-300.
- Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR (2006): LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem* 75:137-63.
- Algire C, Zakikhani M, Blouin MJ, Shuai JH, Pollak M (2008): Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth. *Endocr Relat Cancer* 15:833-9.
- Almaca J, Kongsuphol P, Hieke B, Ousingsawat J, Viollet B, Schreiber R, Amaral MD, Kunzelmann K (2009): AMPK controls epithelial Na<sup>(+)</sup> channels through Nedd4-2 and causes an epithelial phenotype when mutated. *Pflugers Arch* 458:713-21.
- Altenberg B, Greulich KO (2004): Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84:1014-20.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997): A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3:917-21.
- Andersson Y, Le H, Juell S, Fodstad O (2006): AMP-activated protein kinase protects against anti-epidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin A immunotoxin-induced MA11 breast cancer cell death. *Mol Cancer Ther* 5:1050-9.
- Anisimov VN, Berstein LM, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, Kovalenko IG, Poroshina TE, Semchenko AV, Provinciali M, Re F, Franceschi C (2005): Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp Gerontol* 40:685-93.
- Ashkenazi A (2002): Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2:420-30.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-8.
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokhi Z, Schwall RH (1999): Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104:155-62.
- Austin CD, Lawrence DA, Peden AA, Varfolomeev EE, Totpal K, De Maziere AM, Klumperman J, Arnott D, Pham V, Scheller RH,

- Ashkenazi A (2006): Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10283-8.
- Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK (2005): Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 5:921-9.
- Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P (2003): The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371:199-204.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W (1993): Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431-45.
- Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME (2004): CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *Embo J* 23:3175-85.
- Bateman A (1997): The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci* 22:12-3.
- Baud V, Karin M (2001): Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11:372-7.
- Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM (1973): Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 54:1362-9.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW (2001): SP600125, an anthranyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13681-6.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH (2006): TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126:107-20.
- Bertazza L, Mocellin S (2008): Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. *Front Biosci* 13:2736-43.
- Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JI (1997): Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1172-6.
- Bhalla V, Oyster NM, Fitch AC, Wijngaarden MA, Neumann D, Schlattner U, Pearce D, Hallows KR (2006): AMP-activated kinase inhibits the epithelial Na<sup>+</sup> channel through functional regulation of the ubiquitin ligase Nedd4-2. *J Biol Chem* 281:26159-69.
- Bhardwaj A, Aggarwal BB (2003): Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 23:317-32.
- Bhoj VG, Chen ZJ (2009): Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458:430-7.
- Black RA, Kronheim SR, Sleath PR (1989): Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Lett* 247:386-90.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani

- N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-33.
- Blankenship JW, Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Kirkpatrick DS, Izrael-Tomasevic A, Phu L, Arnott D, Aghajan M, Zobel K, Bazan JF, Fairbrother WJ, Deshayes K, Vucic D (2009): Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem J* 417:149-60.
- Bockbrader KM, Tan M, Sun Y (2005): A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 24:7381-8.
- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J (2002): The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27:19-26.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006): Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 5:769-84.
- Bortul R, Tazzari PL, Cappellini A, Tabellini G, Billi AM, Bareggi R, Manzoli L, Cocco L, Martelli AM (2003): Constitutively active Akt1 protects HL60 leukemia cells from TRAIL-induced apoptosis through a mechanism involving NF-kappaB activation and cFLIP(L) up-regulation. *Leukemia* 17:379-89.
- Bose S, Chandran S, Mirocha JM, Bose N (2006): The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol* 19:238-45.
- Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA (2006): Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 29:254-8.
- Bremer E, Samplonius DF, van Genne L, Dijkstra MH, Kroesen BJ, de Leij LF, Helfrich W (2005): Simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and enhanced activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-mediated apoptosis induction by an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR. *J Biol Chem* 280:10025-33.
- Bright NJ, Carling D, Thornton C (2008): Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation. *J Biol Chem* 283:14946-54.
- Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL (1994): A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369:756-8.
- Browne GJ, Finn SG, Proud CG (2004): Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *J Biol Chem* 279:12220-31.
- Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R (2003): Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 424:797-801.

- Budanov AV, Karin M (2008): p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 134:451-60.
- Burke RE (2008): Programmed cell death and new discoveries in the genetics of parkinsonism. *J Neurochem* 104:875-90.
- Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, Viollet B, Thompson CB (2007): Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res* 67:6745-52.
- Cailleau R, Olive M, Cruciger QV (1978): Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14:911-5.
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. (1974): Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53:661-74.
- Campas C, Lopez JM, Santidrian AF, Barragan M, Bellosillo B, Colomer D, Gil J (2003): Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood* 101:3674-80.
- Campbell IK, Roberts LJ, Wicks IP (2003): Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol* 81:354-66.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV (1996): TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383:443-6.
- Carling D, Zammit VA, Hardie DG (1987): A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223:217-22.
- Carlson CA, Kim KH (1973): Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 248:378-80.
- Cipriani G, Rapizzi E, Vannacci A, Rizzuto R, Moroni F, Chiarugi A (2005): Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 280:17227-34.
- Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, Screaton G, Lenardo MJ, Chan FK (2005): Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18099-104.
- Clynes R, Takeuchi Y, Moroi Y, Houghton A, Ravetch JV (1998): Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:652-6.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-6.
- Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, Dickinson R, Adler A, Gagne G, Iyengar R, Zhao G, Marsh K, Kym P, Jung P, Camp HS, Frevert E (2006): Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 3:403-16.



- Corallini F, Rimondi E, Secchiero P (2008): TRAIL and osteoprotegerin: a role in endothelial physiopathology? *Front Biosci* 13:135-47.
- Cornforth AN, Davis JS, Khanifar E, Nastiuk KL, Krolewski JJ (2008): FOXO3a mediates the androgen-dependent regulation of FLIP and contributes to TRAIL-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* 27:4422-33.
- Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG (1995): 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229:558-65.
- Crabtree HG (1928): The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. *Biochem J* 22:1289-98.
- Cretney E, Shanker A, Yagita H, Smyth MJ, Sayers TJ (2006): TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol Cell Biol* 84:87-98.
- Crino PB, Nathanson KL, Henske EP (2006): The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med* 355:1345-56.
- Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA (1998): Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273:35347-54.
- Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X (2002): c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* 21:3704-14.
- Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M (2006): The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124:601-13.
- Chawla-Sarkar M, Bauer JA, Lupica JA, Morrison BH, Tang Z, Oates RK, Almasan A, DiDonato JA, Borden EC, Lindner DJ (2003): Suppression of NF-kappa B survival signaling by nitrosylcobalamin sensitizes neoplasms to the anti-tumor effects of Apo2L/TRAIL. *J Biol Chem* 278:39461-9.
- Chen G, Goeddel DV (2002): TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296:1634-5.
- Chen HC, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert M, Farese RV, Jr., Farese RV (2002): Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-riboside (AICAR)-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 277:23554-62.
- Chen L, Jiao ZH, Zheng LS, Zhang YY, Xie ST, Wang ZX, Wu JW (2009): Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase. *Nature* 459:1146-9.
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD (1994): Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263:1759-62.
- Cheung PC, Nebreda AR, Cohen P (2004): TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. *Biochem J* 378:27-34.

- Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D (2000): Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J* 346 Pt 3:659-69.
- Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, Ross BD, Rehemtulla A (2000): Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1754-9.
- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ (1995): A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* 14:5589-96.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK (2009): Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137:1112-23.
- Choi HC, Song P, Xie Z, Wu Y, Xu J, Zhang M, Dong Y, Wang S, Lau K, Zou MH (2008): Reactive nitrogen species is required for the activation of the AMP-activated protein kinase by statin in vivo. *J Biol Chem* 283:20186-97.
- Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H (2002): All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115:679-88.
- Chuntharapai A, Dodge K, Grimmer K, Schroeder K, Marsters SA, Koeppen H, Ashkenazi A, Kim KJ (2001): Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. *J Immunol* 166:4891-8.
- da Silva Xavier G, Leclerc I, Salt IP, Doiron B, Hardie DG, Kahn A, Rutter GA (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* 97:4023-8.
- Daniel T, Carling D (2002): Functional analysis of mutations in the gamma 2 subunit of AMP-activated protein kinase associated with cardiac hypertrophy and Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Biol Chem* 277:51017-24.
- Daniels RA, Turley H, Kimberley FC, Liu XS, Mongkolsapaya J, Ch'En P, Xu XN, Jin BQ, Pezzella F, Screaton GR (2005): Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Res* 15:430-8.
- Davidoff F (1971): Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function. 3. The mechanism of phenethylbiguanide accumulation and its relationship to in vitro respiratory inhibition. *J Biol Chem* 246:4017-27.
- Davies SP, Carling D, Hardie DG (1989): Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *Eur J Biochem* 186:123-8.

- Day P, Sharff A, Parra L, Cleasby A, Williams M, Horer S, Nar H, Redemann N, Tickle I, Yon J (2007): Structure of a CBS-domain pair from the regulatory gamma1 subunit of human AMPK in complex with AMP and ZMP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63:587-96.
- Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS (2003): Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 30:256-68.
- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG (1997): The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7:813-20.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003): A decade of caspases. *Oncogene* 22:8543-67.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000): Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-61.
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC (1999): Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J* 18:5242-51.
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC (1998): IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17:2215-23.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997): X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-4.
- Djerbi M, Darreh-Shori T, Zhivotovsky B, Grandien A (2001): Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different flip isoforms. *Scand J Immunol* 54:180-9.
- Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, Liu Y (1994): Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase C. *Ann N Y Acad Sci* 723:82-98.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
- Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB (1996): A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J* 15:2685-94.
- Dumitru CA, Carpinteiro A, Trarbach T, Hengge UR, Gulbins E (2007): Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. *Apoptosis* 12:1533-41.
- Dykens JA, Jamieson J, Marroquin L, Nadanaciva S, Billis PA, Will Y (2008): Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2

- cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 233:203-10.
- Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ (2006): Activation of IKK by TNF $\alpha$  requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22:245-57.
- Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL (2006): Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 7:988-94.
- Eckhart L, Ballaun C, Uthman A, Kittel C, Stichenwirth M, Buchberger M, Fischer H, Sipos W, Tschachler E (2005): Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity. *J Biol Chem* 280:35077-80.
- Edinger AL, Thompson CB (2003): Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell* 4:422-4.
- Edinger AL, Thompson CB (2004): Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16:663-9.
- El-Zawahry A, McKillop J, Voelkel-Johnson C (2005): Doxorubicin increases the effectiveness of Apo2L/TRAIL for tumor growth inhibition of prostate cancer xenografts. *BMC Cancer* 5:2.
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR (1998): Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273:14363-7.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
- Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD (2005): Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330:1304-5.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM (2000): A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405:85-90.
- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P (2006): Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9:425-34.
- Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ (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* 67:3043-53.
- Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, Vandenabeele P (2007): RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ* 14:400-10.
- Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D (2002): The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 277:25226-32.

- Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004): The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384:201-32.
- Fulda S, Debatin KM (2006): Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25:4798-811.
- Gambhir SS (2002): Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* 2:683-93.
- Garber K (2006): Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 312:1158-9.
- Gatenby RA, Gillies RJ (2007): Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1358-66.
- Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN (2005): c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280:14507-13.
- Gollob MH, Seger JJ, Gollob TN, Tapscott T, Gonzales O, Bachinski L, Roberts R (2001): Novel PRKAG2 mutation responsible for the genetic syndrome of ventricular preexcitation and conduction system disease with childhood onset and absence of cardiac hypertrophy. *Circulation* 104:3030-3.
- Goodwin PJ, Ligibel JA, Stambolic V (2009): Metformin in breast cancer: time for action. *J Clin Oncol* 27:3271-3.
- Goransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M, Viollet B, Hardie DG, Sakamoto K (2007): Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 282:32549-60.
- Green DR, Evan GI (2002): A matter of life and death. *Cancer Cell* 1:19-30.
- Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL (2008): Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17402-7.
- Guo F, Sigua C, Tao J, Bali P, George P, Li Y, Wittmann S, Moscinski L, Atadja P, Bhalla K (2004): Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res* 64:2580-9.
- Guppy M, Greiner E, Brand K (1993): The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur J Biochem* 212:95-9.
- Gupta AK, Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Martinez AA, Corry PM, Wu X, Guan KL (1997): Differential effect of glucose deprivation on MAPK activation in drug sensitive human breast carcinoma MCF-7 and multidrug resistant MCF-7/ADR cells. *Mol Cell Biochem* 170:23-30.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008): AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30:214-26.

- Gyrd-Hansen M, Darding M, Miasari M, Santoro MM, Zender L, Xue W, Tenev T, da Fonseca PC, Zvelebil M, Bujnicki JM, Lowe S, Silke J, Meier P (2008): IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 10:1309-17.
- Ha HC, Snyder SH (1999): Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13978-82.
- Hallstrom TC, Mori S, Nevins JR (2008): An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell* 13:11-22.
- Hamilton SR, Stapleton D, O'Donnell JB, Jr., Kung JT, Dalal SR, Kemp BE, Witters LA (2001): An activating mutation in the gamma1 subunit of the AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 500:163-8.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hardie DG (2007): AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:774-85.
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR, Gout I, Downes CP, Lamb RF (2004): The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-P13K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* 166:213-23.
- Hartford CM, Ratain MJ (2007): Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin Pharmacol Ther* 82:381-8.
- Harvey AJ, Soliman H, Kaiser WJ, Miller LK (1997): Anti- and pro-apoptotic activities of baculovirus and *Drosophila* IAPs in an insect cell line. *Cell Death Differ* 4:733-44.
- Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S (1998): A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol* 141:1415-22.
- Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, Hardie DG (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* 2:24.
- Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG (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* 271:27879-87.
- Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG (2002): The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 51:2420-5.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG (2005): Calmodulin-dependent protein kinase

- kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2:9-19.
- Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, Grandien A, Ljunggren HG, Smyth MJ, Chambers BJ (2004): NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* 172:123-9.
- He Q, Lee DI, Rong R, Yu M, Luo X, Klein M, El-Deiry WS, Huang Y, Hussain A, Sheikh MS (2002): Endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the death receptor 5 pathway. *Oncogene* 21:2623-33.
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X (2009): Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 137:1100-11.
- Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002): Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277:432-8.
- Held J, Schulze-Osthoff K (2001): Potential and caveats of TRAIL in cancer therapy. *Drug Resist Updat* 4:243-52.
- Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Hoglund P, Jarvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpaa M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA (1998): A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391:184-7.
- Herrero-Martin G, Hoyer-Hansen M, Garcia-Garcia C, Fumarola C, Farkas T, Lopez-Rivas A, Jaattela M (2009): TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *Embo J* 28:1532.
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M (2004): Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165:347-56.
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J (2000): Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1:489-95.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC (1994): Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22:3551-5.
- Horman S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L, Lavoigne A, Hue L, Proud C, Rider M (2002): Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol* 12:1419-23.

- Hougardy BM, Maduro JH, van der Zee AG, de Groot DJ, van den Heuvel FA, de Vries EG, de Jong S (2006): Proteasome inhibitor MG132 sensitizes HPV-positive human cervical cancer cells to rhTRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* 118:1892-900.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996): TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308.
- Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ (1997): Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3668-72.
- Hu S, Vincenz C, Buller M, Dixit VM (1997a): A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272:9621-4.
- Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM (1997b): I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272:17255-7.
- Huang X, Wullschleger S, Shpiro N, McGuire VA, Sakamoto K, Woods YL, McBurnie W, Fleming S, Alessi DR (2008): Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. *Biochem J* 412:211-21.
- Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, Baba O, Terashima T, Hardie DG (2003): A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol* 13:861-6.
- Hughes MA, Harper N, Butterworth M, Cain K, Cohen GM, MacFarlane M (2009): Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Mol Cell* 35:265-79.
- Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI (2000): Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49:2063-9.
- Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA (2005): The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280:29060-6.
- Hymowitz SG, O'Connell MP, Ultsch MH, Hurst A, Totpal K, Ashkenazi A, de Vos AM, Kelley RF (2000): A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 39:633-40.
- Ichikawa K, Liu W, Zhao L, Wang Z, Liu D, Ohtsuka T, Zhang H, Mountz JD, Koopman WJ, Kimberly RP, Zhou T (2001): Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 7:954-60.



- Ido Y, Carling D, Ruderman N (2002): Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes* 51:159-67.
- Igney FH, Krammer PH (2002): Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277-88.
- Imamura K, Ogura T, Kishimoto A, Kaminishi M, Esumi H (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* 287:562-7.
- Inagaki M, Omori E, Kim JY, Komatsu Y, Scott G, Ray MK, Yamada G, Matsumoto K, Mishina Y, Ninomiya-Tsuji J (2008): TAK1-binding protein 1, TAB1, mediates osmotic stress-induced TAK1 activation but is dispensable for TAK1-mediated cytokine signaling. *J Biol Chem* 283:33080-6.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002): TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4:648-57.
- Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL (2006): TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126:955-68.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003): TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115:577-90.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-5.
- Isakovic A, Harhaji L, Stevanovic D, Markovic Z, Sumarac-Dumanovic M, Starcevic V, Micic D, Trajkovic V (2007): Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 64:1290-302.
- Iseli TJ, Walter M, van Denderen BJ, Katsis F, Witters LA, Kemp BE, Michell BJ, Stapleton D (2005): AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *J Biol Chem* 280:13395-400.
- Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ (2006): Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G129-36.
- Ishitani T, Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Shibuya H, Gaynor RB, Matsumoto K (2003): Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *Embo J* 22:6277-88.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN (2004): Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6:1122-8.

- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG (1998): Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273:9357-60.
- Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, Griffith TS, Green DR, Schoenberger SP (2005): CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434:88-93.
- Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, Muller O, Back W, Zimmer M (1998): Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 18:38-43.
- Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozlowski P, Torrice C, Wu MC, Shimamura T, Perera SA, Liang MC, Cai D, Naumov GN, Bao L, Contreras CM, Li D, Chen L, Krishnamurthy J, Koivunen J, Chirieac LR, Padera RF, Bronson RT, Lindeman NI, Christiani DC, Lin X, Shapiro GI, Janne PA, Johnson BE, Meyerson M, Kwiatkowski DJ, Castrillon DH, Bardeesy N, Sharpless NE, Wong KK (2007): LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 448:807-10.
- Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Kiejda KA, Mhaidat N, Wang YF, Thorne R, Zhang XD, Hersey P (2007): Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response. *Cancer Res* 67:5880-8.
- Jin S, White E (2007): Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 3:28-31.
- Jin Z, El-Deiry WS (2006): Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 26:8136-48.
- Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A (2009): Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 137:721-35.
- Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, Hsu L, Hung MC, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM (2009): Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 27:3297-302.
- Johnson TR, Stone K, Nikrad M, Yeh T, Zong WX, Thompson CB, Nesterov A, Kraft AS (2003): The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells. *Oncogene* 22:4953-63.
- Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB (2005): AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18:283-93.
- Jung SN, Park IJ, Kim MJ, Kang I, Choe W, Kim SS, Ha J (2009): Down-regulation of AMP-activated protein kinase sensitizes DU145

- carcinoma to Fas-induced apoptosis via c-FLIP degradation. *Exp Cell Res* 315:2433-41.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000): LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19:5720-8.
- Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, Chiu YH, Deng L, Chen ZJ (2004): TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15:535-48.
- Karikari CA, Roy I, Tryggestad E, Feldmann G, Pinilla C, Welsh K, Reed JC, Armour EP, Wong J, Herman J, Rakheja D, Maitra A (2007): Targeting the apoptotic machinery in pancreatic cancers using small-molecule antagonists of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Mol Cancer Ther* 6:957-66.
- Kasof GM, Gomes BC (2001): Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 276:3238-46.
- Kaufmann SH, Vaux DL (2003): Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* 22:7414-30.
- Kaunisto A, Kochin V, Asaoka T, Mikhailov A, Poukkula M, Meinander A, Eriksson JE (2009): PKC-mediated phosphorylation regulates c-FLIP ubiquitylation and stability. *Cell Death Differ* 16:1215-26.
- Kefas BA, Cai Y, Ling Z, Heimberg H, Hue L, Pipeleers D, Van de Castele M (2003): AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun-N-terminal kinase. *J Mol Endocrinol* 30:151-61.
- Kelley RF, Totpal K, Lindstrom SH, Mathieu M, Billeci K, Deforge L, Pai R, Hymowitz SG, Ashkenazi A (2005): Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem* 280:2205-12.
- Kelley SK, Ashkenazi A (2004): Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol* 4:333-9.
- Kemp BE (2004): Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *J Clin Invest* 113:182-4.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-57.
- Khanbolooki S, Nawrocki ST, Arumugam T, Andtbacka R, Pino MS, Kurzrock R, Logsdon CD, Abbruzzese JL, McConkey DJ (2006): Nuclear factor-kappaB maintains TRAIL resistance in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5:2251-60.
- Kim JE, Ahn MW, Baek SH, Lee IK, Kim YW, Kim JY, Dan JM, Park SY (2008): AMPK activator, AICAR, inhibits palmitate-induced apoptosis in osteoblast. *Bone* 43:394-404.

- Kim KM, Song JJ, An JY, Kwon YT, Lee YJ (2005): Pretreatment of acetylsalicylic acid promotes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by down-regulating BCL-2 gene expression. *J Biol Chem* 280:41047-56.
- Kimberley FC, Lobito AA, Siegel RM, Screaton GR (2007): Falling into TRAPS—receptor misfolding in the TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome. *Arthritis Res Ther* 9:217.
- Kimberley FC, Screaton GR (2004): Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 14:359-72.
- Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, Richardson C, Yoshino K, Hara K, Kemp BE, Witters LA, Mimura O, Yonezawa K (2003): A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* 8:65-79.
- King TD, Song L, Jope RS (2006): AMP-activated protein kinase (AMPK) activating agents cause dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase-3. *Biochem Pharmacol* 71:1637-47.
- Klionsky DJ, Emr SD (2000): Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-21.
- Ko YH, Park S, Jin H, Woo H, Lee H, Park C, Kim K (2007): Granzyme B leakage-induced apoptosis is a crucial mechanism of cell death in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Lab Invest* 87:241-50.
- Koenig U, Eckhart L, Tschachler E (2001): Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1150-4.
- Koschny R, Walczak H, Ganten TM (2007): The promise of TRAIL—potential and risks of a novel anticancer therapy. *J Mol Med* 85:923-35.
- Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, Schmidt JA (1989): Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5227-31.
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G (2003): The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424:801-5.
- Krawiec BJ, Nystrom GJ, Frost RA, Jefferson LS, Lang CH (2007): AMP-activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E1555-67.
- Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, Hacker G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Scheurich P, Wajant H (2004): NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* 166:369-80.
- Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H (2001): NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21:3964-73.
- Krikos A, Laherty CD, Dixit VM (1992): Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 267:17971-6.

- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001): Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276:20633-40.
- Kundu M, Pathak SK, Kumawat K, Basu S, Chatterjee G, Pathak S, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H, Thien CB, Langdon WY, Basu J (2009): A TNF- and c-Cbl-dependent FLIP(S)-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis. *Nat Immunol* 10:918-26.
- Kurtoglu M, Lampidis TJ (2009): From delocalized lipophilic cations to hypoxia: blocking tumor cell mitochondrial function leads to therapeutic gain with glycolytic inhibitors. *Mol Nutr Food Res* 53:68-75.
- Lagace M, Xuan JY, Young SS, McRoberts C, Maier J, Rajcan-Separovic E, Korneluk RG (2001): Genomic organization of the X-linked inhibitor of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics* 77:181-8.
- Lage R, Dieguez C, Vidal-Puig A, Lopez M (2008): AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 14:539-49.
- Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenaabeele P (2002): Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 9:358-61.
- Lane MD, Moss J, Polakis SE (1974): Acetyl coenzyme A carboxylase. *Curr Top Cell Regul* 8:139-95.
- Lang T, Yu L, Tu Q, Jiang J, Chen Z, Xin Y, Liu G, Zhao S (2000): Molecular cloning, genomic organization, and mapping of PRKAG2, a heart abundant gamma2 subunit of 5'-AMP-activated protein kinase, to human chromosome 7q36. *Genomics* 70:258-63.
- Lasfargues EY, Coutinho WG, Redfield ES (1978): Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 61:967-78.
- Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A (2001): Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7:383-5.
- Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A (2000): Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289:2350-4.
- Lee JM, Bernstein A (1995): Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev* 14:149-61.
- Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J, Bron C (2003): Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* 18:655-64.
- Leist M, Jaattela M (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:589-98.

- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002): Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2:183-92.
- Levine B, Klionsky DJ (2004): Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463-77.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li L, Thomas RM, Suzuki H, De Brabander JK, Wang X, Harran PG (2004): A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death. *Science* 305:1471-4.
- Li LY, Luo X, Wang X (2001): Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-9.
- Li YY, Popivanova BK, Nagai Y, Ishikura H, Fujii C, Mukaida N (2006): Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human pancreatic cancer and phosphorylates bad to block bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 66:6741-7.
- Lin JH, Deng G, Huang Q, Morser J (2000): KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 279:820-31.
- Lindemann RK, Newbold A, Whitecross KF, Cluse LA, Frew AJ, Ellis L, Williams S, Wiegmans AP, Dear AE, Scott CL, Pellegrini M, Wei A, Richon VM, Marks PA, Lowe SW, Smyth MJ, Johnstone RW (2007): Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8071-6.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG (1996): Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349-53.
- Liu X, Yue P, Chen S, Hu L, Lonial S, Khuri FR, Sun SY (2007): The proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) up-regulates DR5 expression leading to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis despite up-regulation of c-FLIP and survivin expression in human NSCLC cells. *Cancer Res* 67:4981-8.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996): Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87:565-76.
- Longnus SL, Wambolt RB, Parsons HL, Brownsey RW, Allard MF (2003): 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R936-44.
- Lopez JM, Santidrian AF, Campas C, Gil J (2003): 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in Jurkat cells, but the

- AMP-activated protein kinase is not involved. *Biochem J* 370:1027-32.
- Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B, Andrews DW (2008): Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135:1074-84.
- Luo J, Manning BD, Cantley LC (2003): Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4:257-62.
- Macdonald A, Campbell DG, Toth R, McLauchlan H, Hastie CJ, Arthur JS (2006): Pim kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. *BMC Cell Biol* 7:1.
- MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES (1997): Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272:25417-20.
- MacFarlane M, Harper N, Snowden RT, Dyer MJ, Barnett GA, Pringle JH, Cohen GM (2002): Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* 21:6809-18.
- MacFarlane M, Inoue S, Kohlhaas SL, Majid A, Harper N, Kennedy DB, Dyer MJ, Cohen GM (2005): Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. *Cell Death Differ* 12:773-82.
- Majno G, Joris I (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.
- Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N (2006): mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25:6416-22.
- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC (2002): Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 10:151-62.
- Mariani SM, Krammer PH (1998): Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol* 28:973-82.
- Martelli AM, Tazzari PL, Tabellini G, Bortul R, Billi AM, Manzoli L, Ruggeri A, Conte R, Cocco L (2003): A new selective AKT pharmacological inhibitor reduces resistance to chemotherapeutic drugs, TRAIL, all-trans-retinoic acid, and ionizing radiation of human leukemia cells. *Leukemia* 17:1794-805.
- Martinon F, Holler N, Richard C, Tschopp J (2000): Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett* 468:134-6.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM (2006): p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312:1650-3.

- McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG (2009): The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* 9:23-34.
- McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Bertrand FE, Ludwig DE, Basecke J, Libra M, Stivala F, Milella M, Tafuri A, Lunghi P, Bonati A, Martelli AM (2008): Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia* 22:708-22.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001): Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21:1249-59.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997): FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16:2794-804.
- Meisse D, Van de Casteele M, Beauloye C, Hainault I, Kefas BA, Rider MH, Fougelle F, Hue L (2002): Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett* 526:38-42.
- Meley D, Bauvy C, Houben-Weerts JH, Dubbelhuis PF, Helmond MT, Codogno P, Meijer AJ (2006): AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J Biol Chem* 281:34870-9.
- Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O (2006): Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 26:7046-55.
- Meurette O, Fontaine A, Rebillard A, Le Moigne G, Lamy T, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel MT (2006): Cytotoxicity of TRAIL/anticancer drug combinations in human normal cells. *Ann N Y Acad Sci* 1090:209-16.
- Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J (2001): NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21:5299-305.
- Micheau O, Tschopp J (2003): Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-90.
- Mita MM, Mita A, Rowinsky EK (2003): Mammalian target of rapamycin: a new molecular target for breast cancer. *Clin Breast Cancer* 4:126-37.
- Mizushima N, Yoshimori T (2007): How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3:542-5.
- Mollinedo F, Gajate C (2003): Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8:413-50.
- Momcilovic M, Hong SP, Carlson M (2006): Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* 281:25336-43.



- Morel J, Audo R, Hahne M, Combe B (2005): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem* 280:15709-18.
- Moreno D, Knecht E, Viollet B, Sanz P (2008): A769662, a novel activator of AMP-activated protein kinase, inhibits non-proteolytic components of the 26S proteasome by an AMPK-independent mechanism. *FEBS Lett* 582:2650-4.
- Moreno D, Viana R, Sanz P (2009): Two-hybrid analysis identifies PSMD11, a non-ATPase subunit of the proteasome, as a novel interaction partner of AMP-activated protein kinase. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002): An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287-94.
- Munoz-Pinedo C, Robledo G, Lopez-Rivas A (2004): Thymidylate synthase inhibition triggers glucose-dependent apoptosis in p53-negative leukemic cells. *FEBS Lett* 570:205-10.
- Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Palacios C, Lopez-Rivas A (2003): Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J Biol Chem* 278:12759-68.
- Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ (2000): Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res* 60:847-53.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000): Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.
- Nakano K, Vousden KH (2001): PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683-94.
- Nakashima K, Yakabe Y (2007): AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1650-6.
- Nam SY, Amoscato AA, Lee YJ (2002): Low glucose-enhanced TRAIL cytotoxicity is mediated through the ceramide-Akt-FLIP pathway. *Oncogene* 21:337-46.
- Neumann D, Woods A, Carling D, Wallimann T, Schlattner U (2003): Mammalian AMP-activated protein kinase: functional, heterotrimeric complexes by co-expression of subunits in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 30:230-7.
- Newsom-Davis T, Prieske S, Walczak H (2009): Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* 14:607-23.

- Nimmanapalli R, Perkins CL, Orlando M, O'Bryan E, Nguyen D, Bhalla KN (2001): Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *Cancer Res* 61:759-63.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000): Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288:1053-8.
- Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kamijo T, Nakagawara A, Kizaki H (2008): Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J Biol Chem* 283:3979-87.
- Ortiz-Ferron G, Yerbes R, Eramo A, Lopez-Perez AI, De Maria R, Lopez-Rivas A (2008): Roscovitine sensitizes breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through a pleiotropic mechanism. *Cell Res* 18:664-76.
- Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV (2000): Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 275:21797-800.
- Owen MR, Doran E, Halestrap AP (2000): Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 348 Pt 3:607-14.
- Padanilam BJ (2001): Induction and subcellular localization of protein kinase C isozymes following renal ischemia. *Kidney Int* 59:1789-97.
- Palacios C, Yerbes R, Lopez-Rivas A (2006): Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells. *Cancer Res* 66:8858-69.
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM (1997a): An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815-8.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997b): The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:1111-3.
- Pang T, Xiong B, Li JY, Qiu BY, Jin GZ, Shen JK, Li J (2007): Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits. *J Biol Chem* 282:495-506.
- Pang T, Zhang ZS, Gu M, Qiu BY, Yu LF, Cao PR, Shao W, Su MB, Li JY, Nan FJ, Li J (2008): Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells. *J Biol Chem* 283:16051-60.
- Panner A, James CD, Berger MS, Pieper RO (2005): mTOR controls FLIPs translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. *Mol Cell Biol* 25:8809-23.

- Parker AL, McVey JH, Doctor JH, Lopez-Franco O, Waddington SN, Havenga MJ, Nicklin SA, Baker AH (2007): Influence of coagulation factor zymogens on the infectivity of adenoviruses pseudotyped with fibers from subgroup D. *J Virol* 81:3627-31.
- Paschen W, Mengesdorf T (2005): Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38:409-15.
- Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P (2008): Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* 90:313-23.
- Pauley RJ, Soule HD, Tait L, Miller FR, Wolman SR, Dawson PJ, Heppner GH (1993): The MCF10 family of spontaneously immortalized human breast epithelial cell lines: models of neoplastic progression. *Eur J Cancer Prev* 2 Suppl 3:67-76.
- Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G (2004): S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol* 24:3112-24.
- Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wiltrout RH, Zornig M, Lynch DH (2007): The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 129:447-50.
- Petros AM, Medek A, Nettlesheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, Matayoshi ED, Oltersdorf T, Fesik SW (2001): Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3012-7.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996): Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271:12687-90.
- Polekhina G, Gupta A, Michell BJ, van Denderen B, Murthy S, Feil SC, Jennings IG, Campbell DJ, Witters LA, Parker MW, Kemp BE, Stapleton D (2003): AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol* 13:867-71.
- Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW (2004): Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23:2934-49.
- Popivanova BK, Li YY, Zheng H, Omura K, Fujii C, Tsuneyama K, Mukaida N (2007): Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Sci* 98:321-8.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A (1999): The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3:287-96.
- Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang J, MacPherson DP, Black SC, Hornung

- F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, Nicholson DW (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* 5:271-88.
- Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I (2005): 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280:39582-93.
- Richter BW, Mir SS, Eiben LJ, Lewis J, Reffey SB, Frattini A, Tian L, Frank S, Youle RJ, Nelson DL, Notarangelo LD, Vezzoni P, Fearnhead HO, Duckett CS (2001): Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol Cell Biol* 21:4292-301.
- Roberts DL, Merrison W, MacFarlane M, Cohen GM (2001): The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol* 153:221-8.
- Romagnoli M, Desplanques G, Maiga S, Legouill S, Dreano M, Bataille R, Barille-Nion S (2007): Canonical nuclear factor kappaB pathway inhibition blocks myeloma cell growth and induces apoptosis in strong synergy with TRAIL. *Clin Cancer Res* 13:6010-8.
- Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, Grant S (2003): Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2:1273-84.
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV (1995): The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83:1243-52.
- Roue G, Perez-Galan P, Lopez-Guerra M, Villamor N, Campo E, Colomer D (2007): Selective inhibition of I kappaB kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *J Immunol* 178:1923-30.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al. (1995): The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80:167-78.
- Royds JA, Iacopetta B (2006): p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death Differ* 13:1017-26.
- Ruiz-Ruiz C, Munoz-Pinedo C, Lopez-Rivas A (2000): Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res* 60:5673-80.
- Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S (2007): Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 46:383-93.
- Russell RR, 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ, Young LH (2004): AMP-activated protein

- kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest* 114:495-503.
- Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas O (2005): Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* 19:2199-211.
- Safa AR, Day TW, Wu CH (2008): Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 8:37-46.
- Salomoni P, Pandolfi PP (2002): The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108:165-70.
- Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG (1998): AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J* 334 ( Pt 1):177-87.
- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM (2007): PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25:903-15.
- Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Esteller M, Nomoto S, Trink B, Engles JM, Westra WH, Herman JG, Sidransky D (2002): Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 62:3659-62.
- Sanders MJ, Ali ZS, Hegarty BD, Heath R, Snowden MA, Carling D (2007a): Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family. *J Biol Chem* 282:32539-48.
- Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D (2007b): Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403:139-48.
- Sanjo H, Takeda K, Tsujimura T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Akira S (2003): TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for interleukin-1 signaling. *Mol Cell Biol* 23:1231-8.
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2004): Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14:1296-302.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006): Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22:159-68.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-101.
- Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG (2004): CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113:274-84.

- Scott JW, van Denderen BJ, Jorgensen SB, Honeyman JE, Steinberg GR, Oakhill JS, Iseli TJ, Koay A, Gooley PR, Stapleton D, Kemp BE (2008): Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes. *Chem Biol* 15:1220-30.
- Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI (1997): TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* 7:693-6.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97:695-710.
- Schmidt M, Budirahardja Y, Klompmaker R, Medema RH (2005): Ablation of the spindle assembly checkpoint by a compound targeting Mps1. *EMBO Rep* 6:866-72.
- Schneider MB, Matsuzaki H, Haorah J, Ulrich A, Standop J, Ding XZ, Adrian TE, Pour PM (2001): Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology* 120:1263-70.
- Schwartzberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E (2004): The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 64:2627-33.
- Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, Milani D, Pandolfi A, Zella D, Zauli G (2003): TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation* 107:2250-6.
- Semenza GL (2000): HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88:1474-80.
- Shah OJ, Wang Z, Hunter T (2004): Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol* 14:1650-6.
- Shankar S, Chen X, Srivastava RK (2005): Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate* 62:165-86.
- Shankar S, Singh TR, Srivastava RK (2004): Ionizing radiation enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer in vitro and in vivo: Intracellular mechanisms. *Prostate* 61:35-49.
- Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC (2004): The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3329-35.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997): Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277:818-21.

- Shi B, Tran T, Sobkoviak R, Pope RM (2009): Activation-induced degradation of FLIP(L) is mediated via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in macrophages. *J Biol Chem* 284:14513-23.
- Shi Y (2002): Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9:459-70.
- Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, Irie K, Nishida E, Matsumoto K (1996): TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272:1179-82.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV (1997): c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6658-63.
- Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ (2000): The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 1:469-74.
- Sim AT, Hardie DG (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* 233:294-8.
- Skaug B, Jiang X, Chen ZJ (2009): The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* 78:769-96.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994): The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959-62.
- Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H (2003): Nature's TRAIL—on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18:1-6.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1409-16.
- Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE (1996): Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem* 271:611-4.
- Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D (2000): The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 345 Pt 3:437-43.
- Steiner DF, Williams RH (1958): Respiratory inhibition and hypoglycemia by biguanides and decamethylenediguandine. *Biochim Biophys Acta* 30:329-40.
- Su RY, Chao Y, Chen TY, Huang DY, Lin WW (2007): 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside sensitizes TRAIL- and TNF{alpha}-induced cytotoxicity in colon cancer cells through AMP-activated protein kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 6:1562-71.
- Sun SY, Yue P, Hong WK, Lotan R (2000): Augmentation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437) through

- up-regulation of TRAIL receptors in human lung cancer cells. *Cancer Res* 60:7149-55.
- Susín SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G (2000): Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192:571-80.
- Susín SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-6.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001): A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8:613-21.
- Swinnen JV, Beckers A, Brusselmans K, Organe S, Segers J, Timmermans L, Vanderhoydonc F, Deboel L, Derua R, Waelkens E, De Schrijver E, Van de Sande T, Noel A, Fougelle F, Verhoeven G (2005): Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype. *Cancer Res* 65:2441-8.
- Tada K, Okazaki T, Sakon S, Kobarai T, Kurosawa K, Yamaoka S, Hashimoto H, Mak TW, Yagita H, Okumura K, Yeh WC, Nakano H (2001): Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 276:36530-4.
- Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC (1998): A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273:7787-90.
- Takeda K, Lin J, Okubo S, Akazawa-Kudoh S, Kajinami K, Kanemitsu S, Tsugawa H, Kanda T, Matsui S, Takekoshi N (2004a): Transient glucose deprivation causes upregulation of heme oxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 36:821-30.
- Takeda K, Yamaguchi N, Akiba H, Kojima Y, Hayakawa Y, Tanner JE, Sayers TJ, Seki N, Okumura K, Yagita H, Smyth MJ (2004b): Induction of tumor-specific T cell immunity by anti-DR5 antibody therapy. *J Exp Med* 199:437-48.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008): Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-41.
- Tennant DA, Duran RV, Boulahbel H, Gottlieb E (2009): Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis* 30:1269-80.
- Thakkar H, Chen X, Tyan F, Gim S, Robinson H, Lee C, Pandey SK, Nwokorie C, Onwudiwe N, Srivastava RK (2001): Pro-survival function of Akt/protein kinase B in prostate cancer cells. Relationship with TRAIL resistance. *J Biol Chem* 276:38361-9.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Kramer PH, Peter ME, Tschopp J (1997): Viral FLICE-inhibitory proteins



- (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386:517-21.
- Thornton C, Snowden MA, Carling D (1998): Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem* 273:12443-50.
- Tinel A, Tschopp J (2004): The PIDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304:843-6.
- Tong JF, Yan X, Zhu MJ, Du M (2009): AMP-activated protein kinase enhances the expression of muscle-specific ubiquitin ligases despite its activation of IGF-1/Akt signaling in C2C12 myotubes. *J Cell Biochem* 108:458-68.
- Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, Emme D, Roder C, Kalthoff H, Wajant H (2006): TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 25:7434-9.
- Treebak JT, Birk JB, Hansen BF, Olsen GS, Wojtaszewski JF (2009): A-769662 activates AMPK {beta}1-containing complexes but induces glucose uptake through a PI3 kinase-dependent pathway in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschritzis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G (2003): CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 424:793-6.
- Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF (1999): Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem* 72:1707-16.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004): Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431:200-5.
- Upton JP, Austgen K, Nishino M, Coakley KM, Hagen A, Han D, Papa FR, Oakes SA (2008): Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 28:3943-51.
- Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL (1996): Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4974-8.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W (1995): Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5:392-9.
- Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH (2007): Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9:316-23.
- Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, Lawrence D, Renz M, Vucic D, Ashkenazi A (2005): Molecular determinants of kinase pathway

- activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280:40599-608.
- Varfolomeev E, Vucic D (2008): (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkappaB signaling pathways. *Cell Cycle* 7:1511-21.
- Varfolomeev EE, Ashkenazi A (2004): Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* 116:491-7.
- Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA (2009): The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. *Cell Cycle* 8:88-96.
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P (1998a): Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187:1477-85.
- Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W, Vandenabeele P (1998b): Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 188:919-30.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000): Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.
- Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2002): HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277:445-54.
- Vernia S, Solaz-Fuster MC, Gimeno-Alcaniz JV, Rubio T, Garcia-Haro L, Foretz M, de Cordoba SR, Sanz P (2009): AMP-activated protein kinase phosphorylates R5/PTG, the glycogen targeting subunit of the R5/PTG-protein phosphatase 1 holoenzyme, and accelerates its down-regulation by the laforin-malin complex. *J Biol Chem* 284:8247-55.
- Viana R, Aguado C, Esteban I, Moreno D, Viollet B, Knecht E, Sanz P (2008): Role of AMP-activated protein kinase in autophagy and proteasome function. *Biochem Biophys Res Commun* 369:964-8.
- Villen J, Beausoleil SA, Gerber SA, Gygi SP (2007): Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1488-93.
- Vincent MF, Marangos PJ, Gruber HE, Van den Berghe G (1991): Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 40:1259-66.
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004): Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:789-99.
- Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, Dixit VM (2000): ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 10:1359-66.

- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003): Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT (1997): TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* 16:5386-97.
- Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR (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, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ (2001): TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-51.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5510-4.
- Wang L, Du F, Wang X (2008): TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133:693-703.
- Wang X (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15:2922-33.
- Warburg O (1956): On the origin of cancer cells. *Science* 123:309-14.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000): tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14:2060-71.
- Wen J, Ramadevi N, Nguyen D, Perkins C, Worthington E, Bhalla K (2000): Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* 96:3900-6.
- Wicovsky A, Siegmund D, Wajant H (2005): Interferons induce proteolytic degradation of TRAILR4. *Biochem Biophys Res Commun* 337:184-90.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. (1995): Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-82.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC (2007): Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315:856-9.
- Wingo SN, Gallardo TD, Akbay EA, Liang MC, Contreras CM, Boren T, Shimamura T, Miller DS, Sharpless NE, Bardeesy N, Kwiatkowski DJ, Schorge JO, Wong KK, Castrillon DH (2009): Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PLoS One* 4:2.
- Wojtaszewski JF, Jorgensen SB, Hellsten Y, Hardie DG, Richter EA (2002): Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide

- (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes* 51:284-92.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997): Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139:1281-92.
- Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferre P, Foufelle F, Carling D (2000): Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 20:6704-11.
- Woods A, Cheung PC, Smith FC, Davison MD, Scott J, Beri RK, Carling D (1996a): Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. *J Biol Chem* 271:10282-90.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D (2005): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2:21-33.
- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D (2003): LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13:2004-8.
- Woods A, Salt I, Scott J, Hardie DG, Carling D (1996b): The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. *FEBS Lett* 397:347-51.
- Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD (2006): Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* 8:398-406.
- Wu GS, Burns TF, McDonald ER, 3rd, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan DD, Zhou JY, Muschel R, Hamilton SR, Spinner NB, Markowitz S, Wu G, el-Deiry WS (1997): KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 17:141-3.
- Wyllie AH (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-6.
- Xia ZP, Sun L, Chen X, Pineda G, Jiang X, Adhikari A, Zeng W, Chen ZJ (2009): Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature*.
- Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ (2007): Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449:496-500.
- Xie M, Zhang D, Dyck JR, Li Y, Zhang H, Morishima M, Mann DL, Taffet GE, Baldini A, Khoury DS, Schneider MD (2006a): A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-

- activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17378-83.
- Xie Z, Dong Y, Scholz R, Neumann D, Zou MH (2008a): Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* 117:952-62.
- Xie Z, Dong Y, Zhang M, Cui MZ, Cohen RA, Riek U, Neumann D, Schlattner U, Zou MH (2006b): Activation of protein kinase C zeta by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 281:6366-75.
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ (2008b): Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19:3290-8.
- Yamaguchi H, Wang HG (2004): CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 279:45495-502.
- Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K (1995): Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270:2008-11.
- Yang JK (2008): FLIP as an anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J* 49:19-27.
- Yang S, Thor AD, Edgerton S, Yang X (2006): Caspase-3 mediated feedback activation of apical caspases in doxorubicin and TNF-alpha induced apoptosis. *Apoptosis* 11:1987-97.
- Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD (2000): Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288:874-7.
- Yeh WC, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu HB, Wakeham A, Mirtsos C, Suzuki N, Bonnard M, Goeddel DV, Mak TW (2000): Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12:633-42.
- Yethon JA, Epand RF, Leber B, Epand RM, Andrews DW (2003): Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J Biol Chem* 278:48935-41.
- Yeung SJ, Pan J, Lee MH (2008): Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* 65:3981-99.
- Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Horinaka M, Wakada M, Mizutani Y, Miki T, Sakai T (2005): Proteasome inhibitor MG132 induces death receptor 5 through CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein. *Cancer Res* 65:5662-7.
- Young LH (2009): A crystallized view of AMPK activation. *Cell Metab* 10:5-6.
- Yu H, Fujii N, Hirshman MF, Pomerleau JM, Goodyear LJ (2004): Cloning and characterization of mouse 5'-AMP-activated protein kinase gamma3 subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:24.

- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002): Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297:259-63.
- Yu X, Wang L, Acehan D, Wang X, Akey CW (2006): Three-dimensional structure of a double apoptosome formed by the *Drosophila* Apaf-1 related killer. *J Mol Biol* 355:577-89.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993): The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-52.
- Yun H, Kim HS, Lee S, Kang I, Kim SS, Choe W, Ha J (2009): AMP kinase signaling determines whether c-Jun N-terminal kinase promotes survival or apoptosis during glucose deprivation. *Carcinogenesis* 30:529-37.
- Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M (2006): Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* 66:10269-73.
- Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, Pollak MN (2008): The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 1:369-75.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996): Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87:619-28.
- Zhang XD, Gillespie SK, Borrow JM, Hersey P (2003): The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate: a potential sensitizer of melanoma to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 66:1537-45.
- Zhang Y, Zhang B (2008): TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. *Mol Cancer Res* 6:1861-71.
- Zong WX, Thompson CB (2006): Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 20:1-15.

|

## X. ANEXO





Ref.: Ms. No. BCP-D-09-00927R1

AMPK-INDEPENDENT DOWN-REGULATION OF cFLIP AND  
SENSITIZATION TO TRAIL-INDUCED APOPTOSIS BY AMPK  
ACTIVATORS

Dear Dr. Lopez-Rivas,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in *Biochemical Pharmacology*. In six to eight weeks you will receive the page proofs. It is imperative you return them as soon as possible.

For matters pertaining to page proofs, please e-mail [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com). Be sure to include your manuscript identification number (BCP-D-09-00927R1) to assist them in locating your article.

Thank you for submitting your work to our journal.

Sincerely,

Jacques G. Piette, Ph.D.  
Editor  
*Biochemical Pharmacology*



Contents lists available at ScienceDirect

## Biochemical Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochempharm](http://www.elsevier.com/locate/biochempharm)

## AMPK-independent down-regulation of cFLIP and sensitization to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activators

Celina García-García<sup>a</sup>, Claudia Fumarola<sup>a,b</sup>, Naveenan Navaratnam<sup>c</sup>, David Carling<sup>c</sup>, Abelardo López-Rivas<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain<sup>b</sup> Department of Experimental Medicine, Division of Molecular Pathology and Immunology, University of Parma, Parma 43100, Italy<sup>c</sup> Medical Research Council Clinical Sciences Centre, Cellular Stress Group, Imperial College London, Hammersmith Hospital Campus, DuCane Road, London W12 0NN, UK

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 August 2009

Accepted 23 October 2009

Available online xxx

## Keywords:

FLIP  
Apoptosis  
TRAIL  
AMPK  
Tumor

## ABSTRACT

The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a TNF superfamily member that is being considered as a new strategy in anticancer therapy because of its ability to induce apoptosis, alone or in combination with other stimuli, in many cancer cells. AMP-activated protein kinase (AMPK) is an evolutionarily conserved key regulator of cellular energy homeostasis that protects the cell from energy depletion and stress by activating several biochemical pathways that lead to the conservation, as well as generation, of ATP. Here we report that a number of AMPK activators, including the small molecule activator A-769662, markedly sensitize TRAIL-resistant breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. However, silencing AMPK $\alpha$ 1 expression with siRNA or over-expression of DN-AMPK $\alpha$ 1 does not inhibit AICAR, glucose deprivation, phenformin or A-769662-induced sensitization to TRAIL. Furthermore, the expression of constitutively active AMPK subunits does not sensitize resistant breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. The cellular FLICE-inhibitory proteins (cFLIP<sub>L</sub> and cFLIP<sub>S</sub>) were significantly down-regulated following exposure to AMPK activators through an AMPK-independent mechanism. Furthermore, in cells over-expressing cFLIP<sub>L</sub>, sensitization to TRAIL by AMPK activators was markedly reduced. In summary, our results indicate that AMPK activators facilitate the activation by TRAIL of an apoptotic cell death program through a mechanism independent of AMPK and dependent on the down-regulation of cFLIP levels.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

## 1. Introduction

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) is a cytokine of the TNF gene superfamily that selectively induces apoptosis in many tumor cells while leaving normal cells intact and thus is an attractive candidate for anti-tumor therapies [1]. However, despite the ubiquitous expression of TRAIL receptors, some tumor cells, including most breast cancer

cells, show either partial or complete resistance to the apoptotic effects of TRAIL [2,3]. To overcome this resistance, TRAIL-induced signalling is being studied alone or in combination with different sensitizing agents, such as chemotherapeutic drugs, cytokines and inhibitors of survival pathways [4–6].

TRAIL induces apoptosis through its binding to membrane bound death domain (DD)-containing receptors TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5. This interaction induces the recruitment of the intracellular adaptor molecule FADD (FAS-associated death domain protein), that concurrently engages procaspase-8 at the death-inducing signalling protein complex (DISC) [7]. Within the DISC, caspase-8 is activated by transcatalytic and autocatalytic cleavage and released into the cytoplasm, initiating the protease cascade that leads to the effector caspases activation, thereby triggering the execution of steps that induce apoptosis (extrinsic apoptotic pathway). In addition, activated caspase-8 is able to cleave Bid, a BH3-only pro-apoptotic member of the Bcl-2 family protein, releasing a truncated protein (tBid) that translocates to the mitochondrial external membrane and, in concert with other pro-

*Abbreviations:* cFLIP, cellular FLICE-inhibitory protein; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; TNF, tumor necrosis factor; DISC, death-inducing signalling complex; FADD, Fas-associated death domain; Cyt c, cytochrome c; DD, death domain; DED, death effector domain; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PFU, plaque-forming unit.

\* Corresponding author. Tel.: +34 954 467997.

*E-mail addresses:* [celina.garcia@cabimer.es](mailto:celina.garcia@cabimer.es) (C. García-García), [claudia.fumarola@unipr.it](mailto:claudia.fumarola@unipr.it) (C. Fumarola), [naveenan.navaratnam@csc.mrc.ac.uk](mailto:naveenan.navaratnam@csc.mrc.ac.uk) (N. Navaratnam), [david.carling@csc.mrc.ac.uk](mailto:david.carling@csc.mrc.ac.uk) (D. Carling), [abelardo.lopez@cabimer.es](mailto:abelardo.lopez@cabimer.es) (A. López-Rivas).

apoptotic Bcl-2 family proteins, as Bax and Bak, induces the release of apoptogenic factors, thereby amplifying caspase activation [8]. The apoptotic signal from the DISC may be inhibited by the cellular FLICE-inhibitory protein (FLIP) [9]. In most cells, two alternatively spliced isoforms of cFLIP exist: a caspase-8 homologue cFLIP<sub>L</sub> that lacks the amino acids critical for proteolytic caspase activity; and cFLIP<sub>S</sub>, which is comprised of the two death effector domains alone [9]. Although the role of cFLIP in apoptotic signalling remains controversial, there is strong evidence that it displays anti-apoptotic activity [10–12].

AMPK (AMP-dependent protein kinase) is a heterotrimeric protein kinase complex comprising of a catalytic subunit ( $\alpha$ ) and two regulatory subunits ( $\beta$  and  $\gamma$ ). Isoforms of each subunit ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 and  $\gamma$ 3) have been identified in mammals, allowing the generation of twelve different heterotrimeric complexes, whose expression is tissue-dependent [13]. AMPK acts as a sensor of the cellular energy status, responding to an increase in the AMP/ATP ratio by inducing ATP-producing pathways (catabolism activation) and reducing ATP-consuming pathways (anabolism inhibition), until cellular energy content reaches normal levels [14]. AMPK is activated by two mechanism. First, AMP allosterically activates AMPK by binding to the  $\gamma$  subunit. Secondly, AMPK is activated by phosphorylation of threonine 172 (Thr-172) within the catalytic  $\alpha$ subunit. Three different upstream AMPK kinases have been identified: LKB1, CaMKK $\beta$  (Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase beta) and TAK1 (transforming growth factor-beta-activated kinase 1) [15,16]. Importantly, AMP protects against the dephosphorylation of T172, thereby increasing the proportion of active AMPK [17]. Several metabolic stress (hypoxia, energy starvation) and certain external factors or drugs, such as AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside), phenformin (ATP mitochondrial sintase inhibitor) or metformin (antihyperglycemic agent used in the treatment of diabetes), are able to activate AMPK in vitro and in vivo. Recently, a novel small molecule has been proposed as a specific AMPK activator: A-769662 [18]. A-769662 activates AMPK both allosterically and by inhibiting dephosphorylation of AMPK on Thr-172, similar to the effects of AMP [19,20].

Although AMPK function in metabolism and maintenance of cellular energy homeostasis has been well studied, AMPK implication in cellular proliferation and survival remains unclear and controversial. Specifically, AMPK has been proposed to have a pro-apoptotic effect in different tumor cells. Moreover, its activation by AICAR has been shown to sensitize human colon adenocarcinoma cells to TRAIL and TNF-induced apoptosis [21]. Against these data, AMPK has been proposed as an anti-apoptotic molecule to protect cells from ischemia, hyperglycemia, glucose deprivation, fatty acids and ceramide [22–24].

Since most human breast tumor cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis, the combination of TRAIL with other sensitizing stimuli is being studied to induce apoptosis in these cell types. In the present work, we have found that several AMPK activators, including the small molecule activator A-769662, markedly sensitize TRAIL-resistant breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. However, silencing AMPK $\alpha$ 1 expression with siRNA or over-expression of DN-AMPK $\alpha$ 1 does not inhibit this sensitization to TRAIL. Furthermore, the expression of constitutively active AMPK subunits does not sensitize resistant breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. In summary, our results indicate that a range of AMPK activators facilitate the activation by TRAIL of an apoptotic cell death program through a mechanism independent of AMPK. Interestingly, AMPK-independent down-regulation of cFLIP expression is observed upon treatment with AMPK activators and cFLIP over-expression markedly inhibits apoptosis induced by AMPK activators and TRAIL.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture

The breast tumor cell lines were maintained in RPMI 1640 (MDA-MB231, MDA-MB435S, MCF7) or in DMEM (BT-474) medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM l-glutamine, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 500 U penicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Growth medium for MDA-MB435S cells was also supplemented with 10  $\mu$ g/mL insulin. The cells were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air incubator. A stable cell line over-expressing cFLIP<sub>L</sub> was generated upon transfection of MDA-MB231 cells with pCR3.V64-Met-Flag-FLIP<sub>L</sub> (a kind donation of Dr. J. Tschopp, University of Lausanne) by electroporation. Mock-transfected cells and cells over-expressing FLIP<sub>L</sub> were selected in culture medium with 1 mg/mL G418 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and analyzed for the expression of cFLIP<sub>L</sub> by Western blot.

### 2.2. Reagents and antibodies

5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) was purchased from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada); phenformin, cycloheximide and 2-deoxyglucose (2DG) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); glucose from MERCK (Darmstadt, Germany). Caspases inhibitor benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp-(OMe) fluoromethyl ketone (Z-VAD-fmk) was from Bachem, AG (Bachem, Bubendorf, Switzerland). The small molecule AMPK activator A-769662 was a gift from Dr. Anu Balendran (AstraZeneca, Molndal, Sweden). Soluble human His-tagged recombinant TRAIL was generated in our laboratory as described [25]. Human Factor X was obtained from Bioscience (Cambridge, UK). Anti-caspase 8 was a gift from Dr. Gerald Cohen (Leicester University, UK). Anti-bid was a gift from Dr. Wang (University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, USA). PARP and cytochrome c antibodies were from Pharmingen (San Diego, CA, USA). The antibodies to alpha-tubulin and to Flag-M2 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Antibodies against Bax, GAPDH, actin (C-11) and c-Myc (9E10) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-cFLIP monoclonal antibody (NF6) was purchased from Alexis Corporation (Lausen, Switzerland). Anti-COX IV rabbit polyclonal antibody was from Abcam (Cambridge, UK). Antibodies against p-ACC, p-AMPK, AMPK $\alpha$ 1, active caspase-9 and active caspase-3 were from Cell Signalling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). Horseradish peroxidase or FITC conjugated, goat anti-mouse, rabbit anti-goat and goat anti-rabbit secondary antibodies were obtained from DAKO (Cambridge, UK).

### 2.3. Determination of cell viability and apoptosis

Cell viability was determined by the crystal violet method as described [26]. Hypodiploid apoptotic cells were assessed by flow cytometry according to published procedures [27].

### 2.4. Immunoblot detection of proteins

Cells were lysed in ice-cold lysis buffer [50 mM Tris/acetate (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (w/v) Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium glycerophosphate, 50 mM NaF, 5 mM sodium pyrophosphate, 27 mM sucrose and protease inhibitor mixture (Roche Applied Science, Germany)]. The samples were frozen at -20 °C until analysis. Protein concentration was determined using the Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent A, B and S (Hercules, CA, USA). Proteins were resolved on SDS-polyacrylamide minigels and detected as described previously [26].

## 2.5. Measurements of Bax translocation and cytochrome *c* release

Cells ( $3 \times 10^5$  well<sup>-1</sup>) were treated in six-well plates as indicated in the figure legends. After treatment, cells were detached from the plate with RPMI/EDTA and trypsin, washed with PBS and lysed in 30  $\mu$ L ice-cold lysis buffer (80 mM KCl, 250 mM sucrose, 500  $\mu$ g/mL digitonin and protease inhibitors in PBS). For measurements of Bax translocation and cytochrome *c* release from mitochondria, cell lysates were centrifuged for 5 min at 10,000  $\times$  g to separate the supernatant (cytosolic fraction) and pellet (mitochondria-containing fraction). Amount of protein in each fraction was determined by the Bradford protein assay (BIO-RAD, Hertfordshire, UK). Proteins from the supernatant and pellet were mixed with Laemmli buffer and resolved on SDS-12% PAGE minigels. Bax and cytochrome *c* were determined by western blot analysis.

## 2.6. RNA interference

siRNAs against AMPK $\alpha$ 1 (5'-UGCCUACCAUCUCAUAAUAdTdT) and nontargeting scrambled siRNAs were synthesized by Sigma-Proligo (St. Louis, MO, USA). Cells were transfected with the indicated siRNAs at 50 nM during 48 h using DharmaFECT transfection agent (Dharmacon Research, CO, USA) as described by the manufacturer.

## 2.7. Adenoviral infection

Cells were incubated with 100 PFU/cell of the indicated adenovirus overnight in a limiting serum-free medium volume containing 10.8  $\mu$ g/mL of Factor X (Bioscience, Cambridge, UK) to facilitate adenoviral infection [28]. After the infection, complete medium was added and cells were incubated for 8–24 h before further treatments. Adenoviruses were produced by ViraQuest Inc (North Liberty, IA, USA).

## 2.8. Immunoprecipitation and AMPK assays

AMPK was immunoprecipitated from 100  $\mu$ g of protein of cell lysate by overnight incubation at 4 °C with a sheep anti- $\alpha$ 1 or  $\alpha$ 2 antibody [29] bound to protein G or A-Sepharose from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Immune complexes were collected by brief centrifugation and washed extensively in ice-cold buffer A (50 mM HEPES, pH 7.4, containing protease inhibitor mixture (Roche Applied Science, Germany), 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol (v/v) and 1% (v/v) Triton X-100). AMPK activity in the immune complex was determined by phosphorylation of the SAMS (full sequence: HMRSAMSGHLHLVKRR) synthetic peptide substrate [30] during 20 min of incubation in the presence of 200  $\mu$ M AMP.

## 2.9. Reverse transcription-PCR

Total RNA was isolated from cells with Trizol reagent (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) as recommended by the supplier. cDNA was synthesized from 2  $\mu$ g total RNA using a RNA PCR kit (Perkin-Elmer, Indianapolis, IN, USA) with the supplied random hexamers under conditions described by the manufacturer. PCRs were done using specific primers for cFLIP<sub>L</sub> and cFLIP<sub>S</sub> as described previously [31].

## 2.10. Statistical analysis

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

## 3. Results

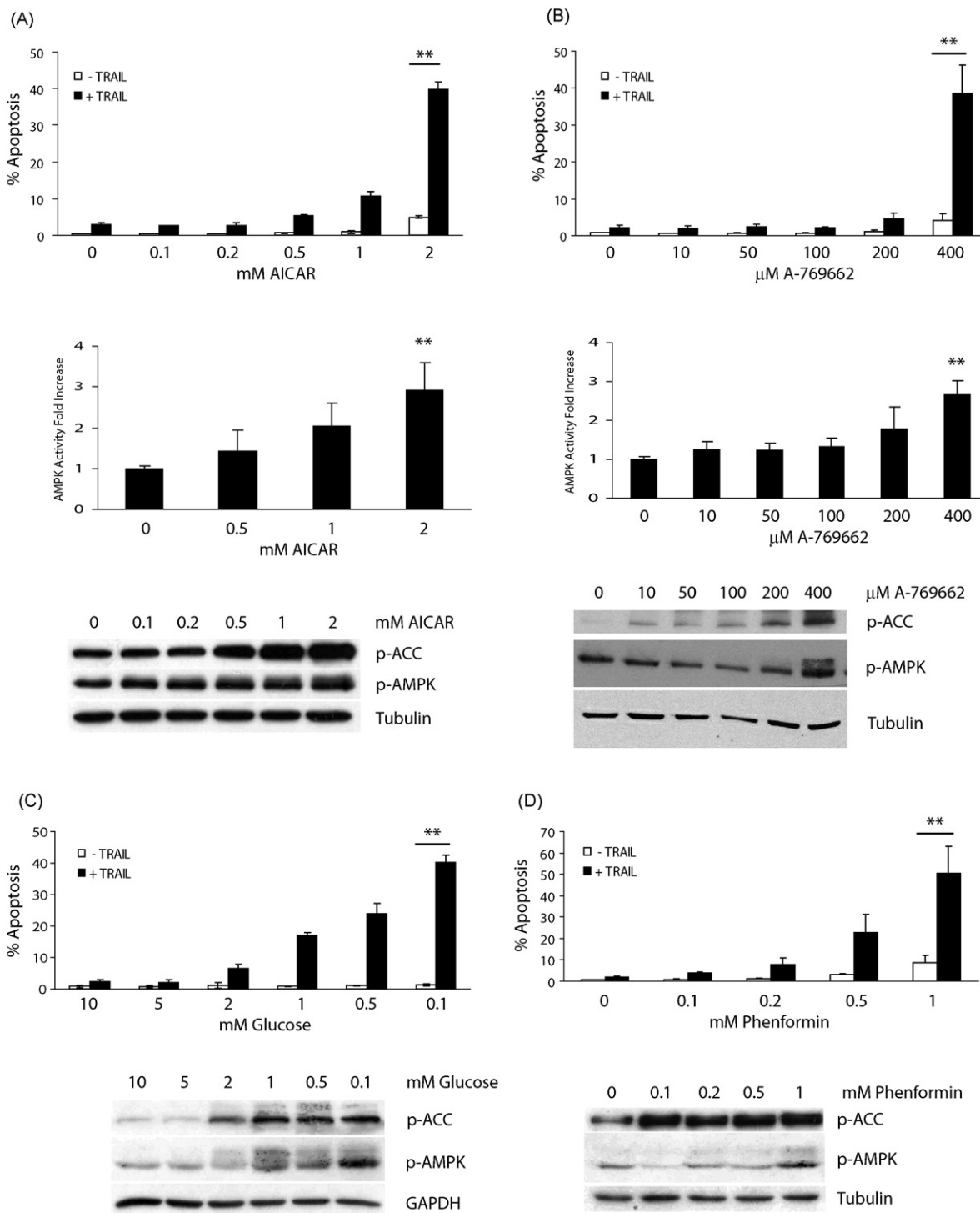
### 3.1. AMPK activators sensitize human breast cancer cell lines to TRAIL-induced apoptosis

To analyze whether AMPK activation sensitize breast tumor cells to the apoptotic ligand TRAIL, the breast tumor cell line MDA-MB231 was treated with different concentrations of 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR), a widely used AMPK activator, to determine the sub-toxic dose capable of sensitizing these cells to TRAIL-induced apoptosis. Results shown in Fig. 1A demonstrate that these cells were resistant to TRAIL-induced apoptosis and a marked sensitization to apoptosis by TRAIL can be observed at concentrations of 1–2 mM AICAR. To determine the AMPK-activating effect of these AICAR doses, we measured AMPK activity in cell extracts as described in Section 2. As shown in Fig. 1A in MDA-MB231 cells sensitization to TRAIL correlated well with AMPK activation by AICAR. In these cells AMPK activity was almost entirely associated with  $\alpha$ 1, with virtually no  $\alpha$ 2 activity detectable (data not shown). Similar association between AMPK activity and sensitization to TRAIL by AICAR was observed when AMPK activation was analyzed by determining the phosphorylation of AMPK and acetyl-CoA carboxylase (ACC), a well characterized substrate of AMPK. In subsequent experiments, we normally used 1 and 2 mM AICAR, because these concentrations produced a marked sensitization and AMPK activation (Fig. 1A) but were not toxic for the cells.

To further explore the sensitization to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activators we used the small molecule A-769662, a recently identified direct activator of AMPK. As shown in Fig. 1B, A-769662 compound, as AICAR, was able to sensitize MDA-MB231 cells to TRAIL-induced apoptosis in a dose-dependent manner, with no toxic effect by itself. This sensitization correlated well with the activation state of AMPK, as measured by the *in vitro* assay and as p-ACC levels and p-AMPK by western blotting. Since A-769662 compound is considered a specific AMPK activator, this result suggested that AMPK activation could be responsible for the observed A-769662 sensitization to TRAIL-induced apoptosis in these breast cancer cells. In addition to the direct AMPK activators AICAR and A-769662, we examined if stimuli that change the intracellular AMP/ATP ratio, were also able to sensitize these cells to TRAIL-induced apoptosis. For this purpose, we tested glucose limitation in the culture medium and phenformin, a mitochondrial ATP synthase inhibitor. As shown in Fig. 1C and D, both stimuli activated AMPK and sensitized the cells to TRAIL-induced apoptosis in a dose-dependent manner.

To demonstrate that the observed sensitization to TRAIL-induced apoptosis is not restricted to MDA-MB231 cells, dose-response experiments were performed in other breast tumor cell lines to determine whether AMPK activators also facilitated apoptosis induced by TRAIL. As shown in Fig. 2, treatment of BT474 (A and B), MDA-MB-435S (C and D) and MCF7 (E) cell lines with various AMPK activators sensitized these cells to TRAIL. All these data indicated that most AMPK activators were able to sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis.

To further analyze the apoptotic mechanism induced by the combination of AMPK activator and TRAIL in breast tumor cells, we examined the caspase dependency of this cell death process in MDA-MB231 cells. We found that the generation of hypodiploid cells induced by the combination of AICAR and TRAIL was dependent on caspase activation as it was completely prevented by the general caspase inhibitor Z-VAD-fmk (Fig. 3A). During TRAIL-induced apoptosis, procaspase-8 is recruited and processed at the DISC in a FADD- and TRAIL receptor-dependent manner. Procaspase-8 is first cleaved to the p43/p41 intermediate fragments and then subsequently processed to generate the large

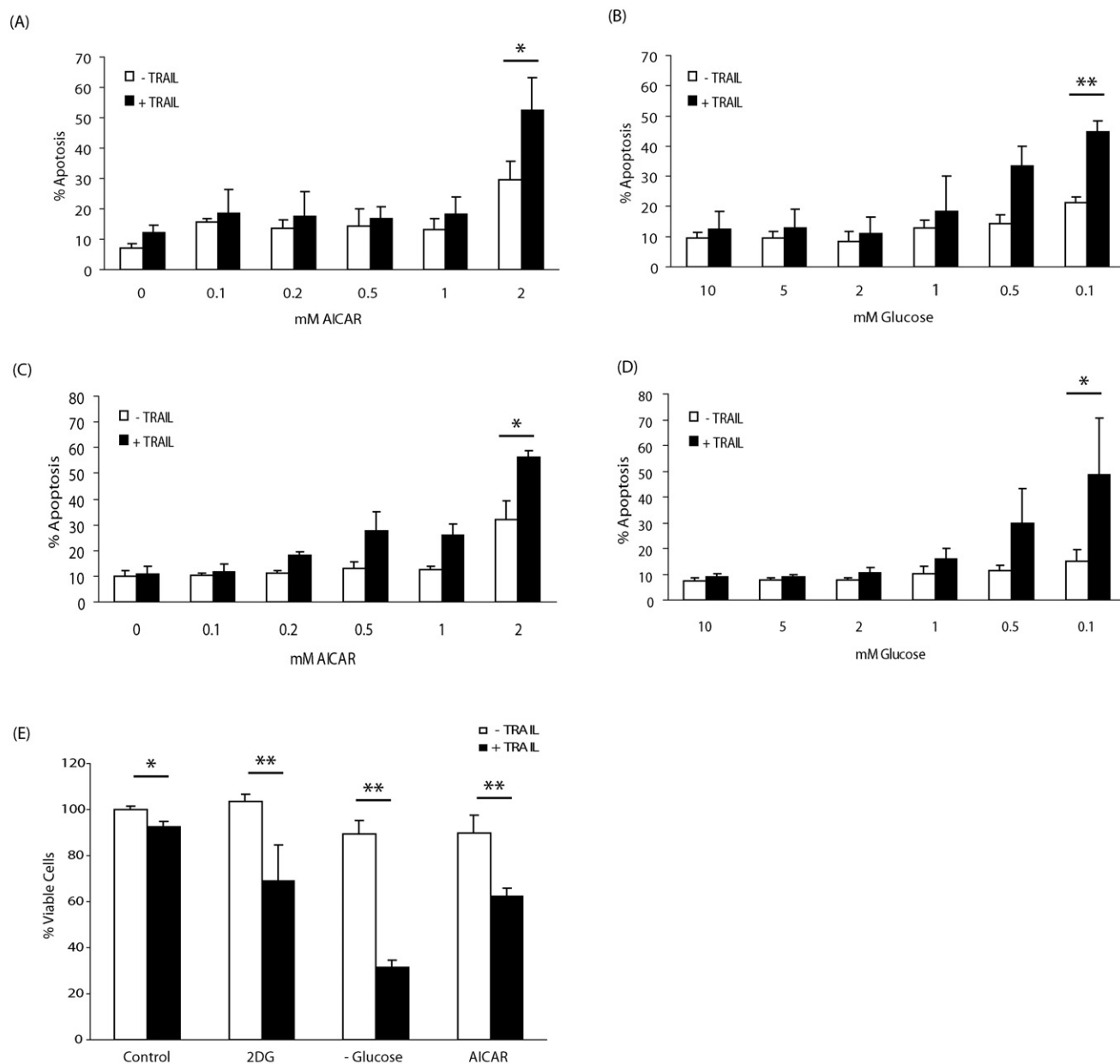


**Fig. 1.** AICAR, A-769662, glucose deprivation and phenformin sensitize MDA-MB231 human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. MDA-MB231 cells were incubated with the indicated concentrations of AICAR (A) or A-769662 (B) for 8 h, or glucose (C) or phenformin (D) for 16 h, before the addition of soluble recombinant TRAIL (1  $\mu$ g/mL). Apoptosis was measured 16 h (A and B) or 8 h (C and D) after the addition of TRAIL as percentage of cells with subG1 DNA content as described in Section 2. AMPK $\alpha$ 1 activity was measured at the end of the pre-treatment period as described in Section 2 and normalized to the activity detected in untreated cells. Error bars represent S.D. from three independent experiments.  $^{**}P < 0.01$ . p-ACC and p-AMPK levels were analyzed by immunoblotting. Tubulin was used as a protein loading control. In each case, results are representative of three independent experiments.

280 catalytically active p18 subunit. Accordingly, TRAIL-induced  
281 activation of caspase-8 was clearly enhanced by pre-treatment  
282 with AICAR (Fig. 3B). The same result was observed following  
283 pre-treatment of the cells with the protein synthesis inhibitor  
284 cycloheximide, used as a positive control of sensitization to  
285 TRAIL-induced apoptosis. Activation of caspase-8 leads to the

processing of its substrate Bid generating a 15-kDa fragment,  
which translocates to mitochondria and induces the mitochondria-  
controlled apoptotic pathway. Thus, we examined the loss of intact  
Bid by western blotting in MDA-MB231 cells. Results shown in  
Fig. 3B indicate that the amount of intact Bid was clearly  
diminished in the cells treated with a combination of AICAR and

286  
287  
288  
289  
290  
291



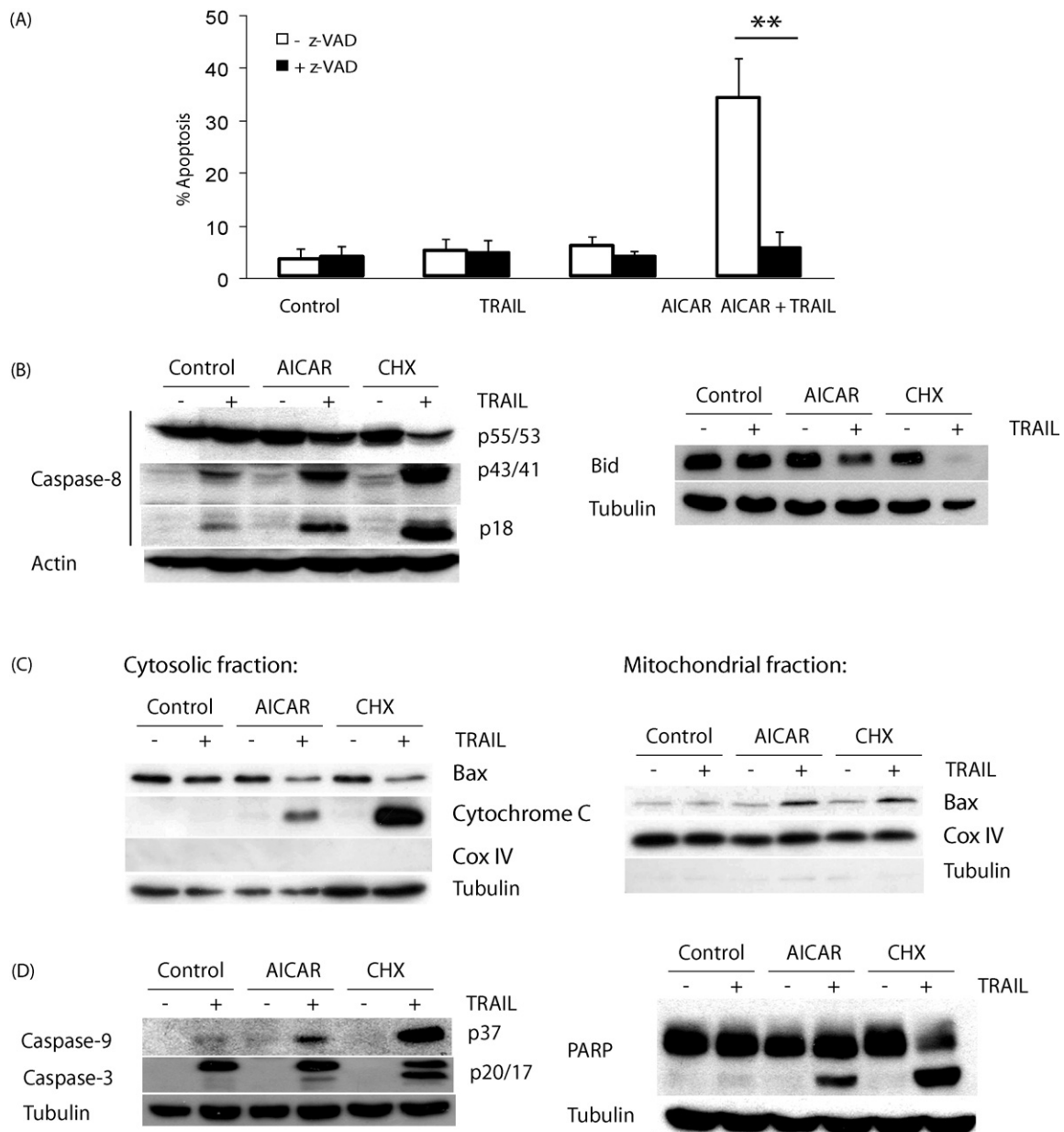
**Fig. 2.** AMPK activators sensitize different human breast tumor cell lines to TRAIL-induced apoptosis. BT-474 cells were incubated in medium with the indicated concentrations of AICAR (A) or glucose (B) for 20 h before the addition of soluble TRAIL (250 ng/mL). Apoptosis was measured 24 h after the addition of TRAIL as percentage of cells with subG1 DNA content as described in Section 2. Error bars represent S.D. from three independent experiments. MDA-MB435S cells were treated with the indicated concentrations of AICAR (C) or glucose (D) for 8 h before the addition of soluble TRAIL (25 ng/mL). Apoptosis was measured 16 h after the addition of TRAIL as percentage of cells with subG1 DNA content as described in Section 2. Error bars represent S.D. from three independent experiments. (E) MCF7 cells were incubated with 2-deoxyglucose (2DG) 5 mM, glucose-free medium or AICAR 1 mM with or without TRAIL (100 ng/mL). After 16 h of treatment, cell viability was measured by crystal violet staining, as described in Section 2. Error bars represent S.D. from three independent experiments. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .

TRAIL in comparison with the cultures treated only with TRAIL. Upon death receptor activation the cytoplasmic protein Bax migrates to the mitochondria where it co-operates with truncated Bid in the release of cytochrome *c*. We next analyzed the levels of Bax and cytochrome *c* in cytosolic and mitochondrial fractions of cells treated with AICAR and TRAIL. Results shown in Fig. 3C demonstrate that the combination of AICAR and TRAIL clearly promotes Bax translocation to the mitochondria and the release of cytochrome *c* from this organelle. The activation of the mitochondrial apoptotic pathway leads to caspase-9 processing and activation in the apoptosome complex. Activated caspase-9 is able to cleave and activate caspase-3. Processing of both caspase-9 and caspase-3 were observed after treatment with AICAR and TRAIL in MDA-MB231 cells by western blotting (Fig. 3D). To

confirm that the apoptosis cascade was fully active after this treatment, we analyzed the proteolytic degradation of the nuclear protein poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), a substrate of effector caspases. As shown in Fig. 3D, PARP cleavage was clearly induced in cells pretreated with AICAR and subsequently treated with TRAIL, as well as those cells treated with cycloheximide and TRAIL. Similar results were obtained in the MCF-7 cell line (data not shown).

### 3.2. AMPK activation is not required for the sensitization to TRAIL-induced apoptosis observed after treatment with AMPK activators

To investigate if the sensitization process required the activation of AMPK, we performed siRNA experiments to silence

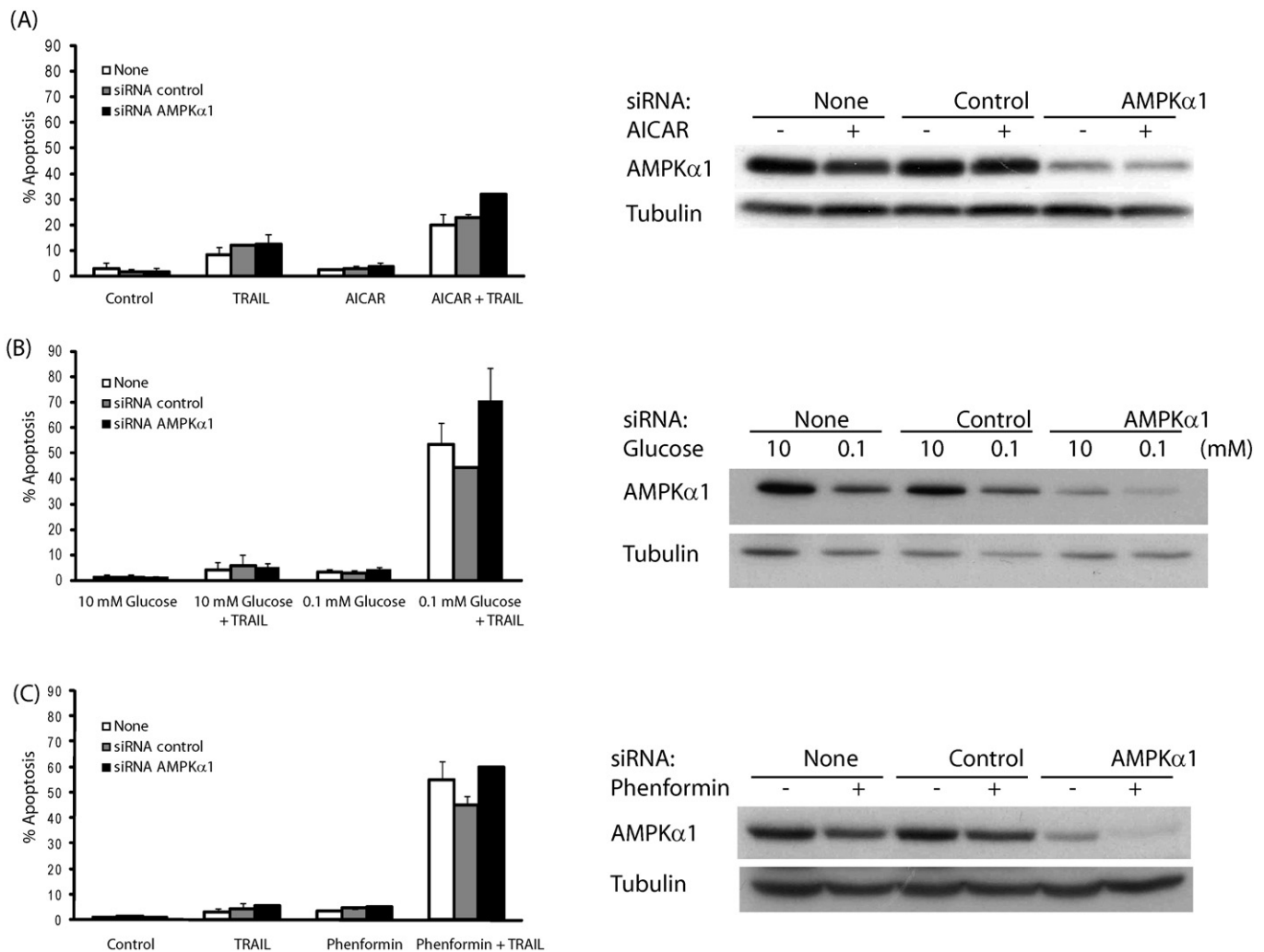


**Fig. 3.** Activation of a caspase-dependent mitochondria-operated apoptotic pathway by the combination of AICAR and TRAIL. (A) MDA-MB231 cells were incubated with AICAR (2 mM) for 8 h and then treated with soluble TRAIL (1  $\mu$ g/mL) for 16 h; z-VAD-fmk (50  $\mu$ M) was added 1 h before the addition of TRAIL. Apoptosis was measured as percentage of subG1 cells. Error bars represent S.D. from three independent experiments.  $^{**}P < 0.01$ . (B) MDA-MB231 cells were treated with AICAR (1 mM) for 16 h or 5  $\mu$ g/mL cycloheximide (CHX) for 1 h before incubation with 1  $\mu$ g/mL TRAIL for 4 h. Processing of caspase-8 and Bid were assessed by immunoblotting as described in Section 2. Cells were treated as in (B) and levels of cytochrome c and bax in cytosolic and mitochondrial fractions (C) or processing of caspase-9, caspase-3 and PARP (D) were determined by Western blot as described in Section 2. Actin and Tubulin were used as protein loading controls. Results are representative of three different experiments.

318 the expression of the catalytic AMPK $\alpha$ 1 subunit in MDA-MB231  
 319 cells and analyzed the sensitivity of these cells to TRAIL under  
 320 AMPK-activating conditions. As shown in Fig. 4A, the knockdown  
 321 of AMPK $\alpha$ 1 subunit did not inhibit AICAR sensitization to TRAIL-  
 322 induced apoptosis. Similar results were also obtained in MCF-7  
 323 cells (data not shown). Next, we determined whether sensitization  
 324 to TRAIL-induced apoptosis promoted by other AMPK activators  
 325 was also observed in MDA-MB231 cells where AMPK $\alpha$ 1 expression  
 326 had been silenced by siRNA. As shown in Fig. 4B and C, silencing  
 327 AMPK $\alpha$ 1 expression in MDA-MB231 cells did not reduce apoptosis  
 328 by TRAIL in cells subject to glucose deprivation or treated with  
 329 phenformin. Although these results suggested that AMPK may not  
 330 be required for the sensitization process, we could not exclude the  
 331 possibility that the remaining AMPK $\alpha$ 1 subunit may be sufficient

to activate the signalling leading to enhanced TRAIL sensitivity in  
 the presence of AMPK activators.

To further examine the role of AMPK in the sensitization to  
 TRAIL induced by AMPK activators we over-expressed by  
 adenoviral infection a Myc-tagged dominant negative isoform of  
 AMPK $\alpha$ 1 in MDA-MB231 cells, as described in Section 2. This  
 isoform competes with the endogenous AMPK $\alpha$ 1 in the formation  
 of the trimeric active complex, rendering an inactive complex [32].  
 As shown in Fig. 5A and B, activation of AMPK in cells treated with  
 A-769662, as determined either by measuring AMPK activity  
 directly, or by monitoring ACC phosphorylation, was markedly  
 reduced in cells expressing the dominant negative isoform of  
 AMPK $\alpha$ 1. Interestingly, abrogation of A-769662-induced AMPK  
 activation in cells expressing DN-AMPK $\alpha$ 1 was not sufficient to



**Fig. 4.** Knockdown of endogenous AMPK $\alpha$ 1 in MDA-MB231 cells does not prevent AMPK activators-induced sensitization to apoptosis by TRAIL. MDA-MB231 cells were transfected with either a siRNA oligonucleotide targeting AMPK $\alpha$ 1 or a control siRNA oligonucleotide as described in Section 2. After 48 h cells were pre-treated with 1 mM AICAR (A), 0.1 mM glucose (B) or 1 mM phenformin (C) for 16 h before the addition of soluble recombinant TRAIL (1  $\mu$ g/mL). Apoptosis was measured 4 h after the addition of TRAIL as percentage of subG1 cells. Error bars represent S.D. from three independent experiments. AMPK $\alpha$ 1 and p-ACC levels were assessed by immunoblotting. Tubulin was used as a protein loading control. Results are representative of two independent experiments.

prevent sensitization to TRAIL-induced apoptosis in MDA-MB231 cells treated with A-769662 (Fig. 5C).

Based on these results, it seems very likely that AMPK activation is not involved in the sensitization to TRAIL-induced apoptosis observed in breast tumor cells incubated with the different AMPK activators used in our studies.

### 3.3. Constitutive AMPK activation is not sufficient to sensitize MDA-MB231 cells to TRAIL-induced apoptosis

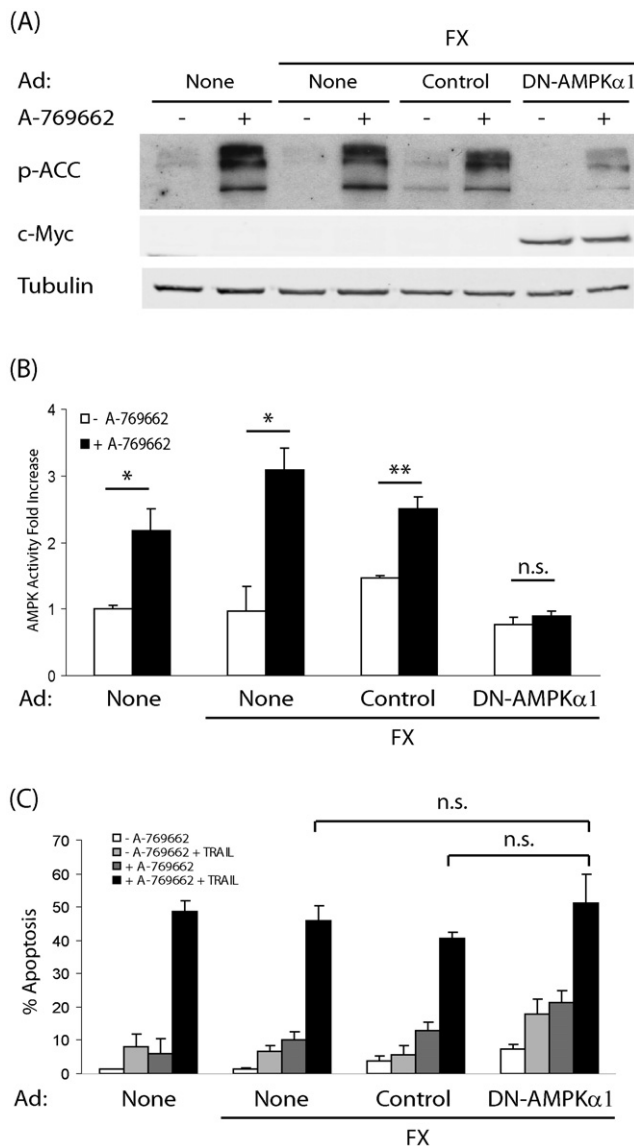
To rule out AMPK activity involvement in the observed sensitization of breast tumor cells to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activators, these cells were infected with adenovirus coding for constitutively active mutant AMPK $\gamma$ 1 [17] and  $\gamma$ 2 isoforms [33] as described in Section 2. Despite their ability to activate AMPK independently of AMP (Fig. 6A and B), sensitization to TRAIL-induced apoptosis in cells infected with constitutively active isoforms of AMPK $\gamma$  subunit was very small as compared to cells treated with the AMPK activator A-769662 (Fig. 6C). It is particularly relevant that although AMPK activity of cells expressing the mutant AMPK $\gamma$ 2RG isoform was significantly higher than the activity detected in cells incubated with the A-769662

compound, a clear sensitization to TRAIL-induced apoptosis was only observed in A-769662-treated cells. Therefore, AMPK activation is not sufficient to sensitize these cells to TRAIL-induced apoptosis.

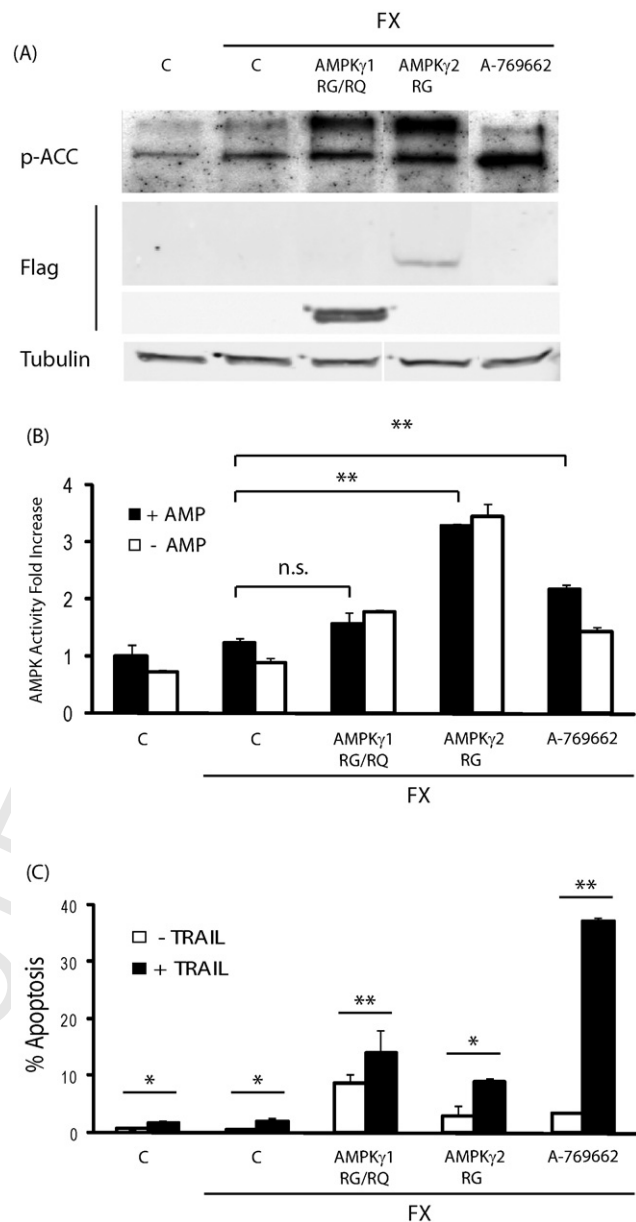
### 3.4. AMPK-independent cFLIP down-regulation is required for the sensitization to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activators in breast tumor cells

Several studies have suggested that a decrease in cFLIP, a short lived protein, sensitizes cells to death receptor-induced apoptosis. Although this is somewhat controversial [11,34], the anti-apoptotic activity of this protein is clearly supported by data obtained from cells stably over-expressing cFLIP, from mice deficient in cFLIP and from the selective knockdown of cFLIP [10,11,34]. In breast tumor cells, cFLIP appears to play an important role in preventing TRAIL-induced apoptosis [6]. Thus, we investigated whether treatment with AMPK activators affected the levels of cFLIP<sub>L</sub> and cFLIP<sub>S</sub> proteins in MDA-MB231 cells. As shown in Fig. 7A and B the protein levels of both cFLIP<sub>L</sub> and cFLIP<sub>S</sub> decreased in these cells following exposure to AICAR, A-769662, low glucose or phenformin. Similar results were obtained in MCF-7





**Fig. 5.** Inhibition of AMPK activity by a dominant negative AMPK $\alpha$ 1 mutant is not sufficient to abrogate A-769662-induced sensitization to TRAIL apoptosis in MDA-MB231 cells. (A) MDA-MB231 cells were infected for 24 h with 100 PFU of empty (control) or dominant negative AMPK $\alpha$ 1 (DN-AMPK $\alpha$ 1) adenovirus, as described in Section 2. Cells were then incubated with or without A-769662 (400  $\mu$ M) for 16 h and p-ACC levels (A) or AMPK $\alpha$ 1 activity (B) were determined as described in Section 2. Error bars represent S.D. from three independent experiments. p-ACC data are representative of three independent experiments. (C) Infected cells were treated with A-769662 as in (A) and (B) and then treated with TRAIL (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. Apoptosis was measured as percentage of subG1 cells. Error bars represent S.D. from three independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 and n.s. = non-significant.

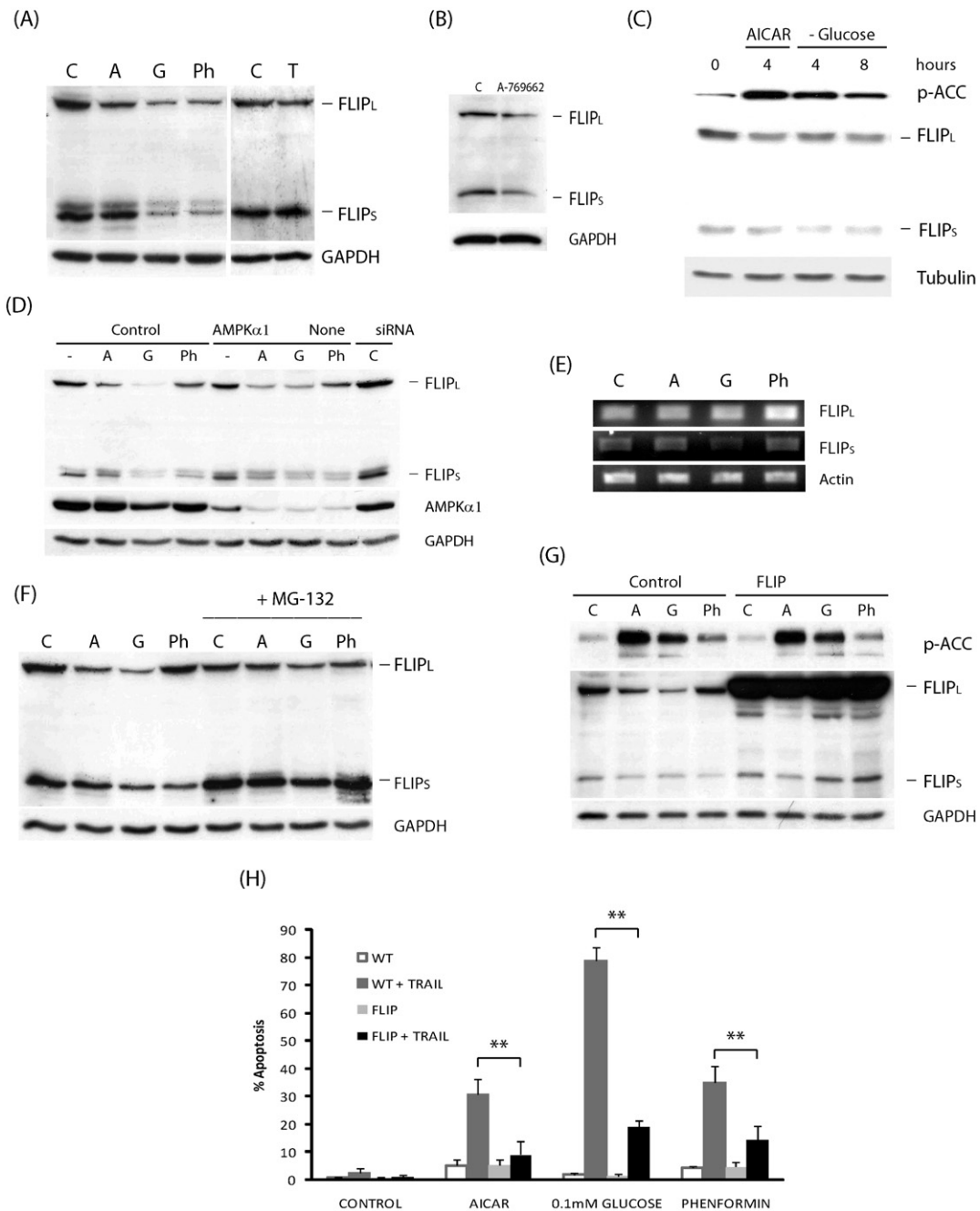


**Fig. 6.** Over-expression of constitutively active AMPK isoforms does not sensitize MDA-MB231 cells to TRAIL-induced apoptosis. MDA-MB231 cells were infected for 40 h with 100 PFU of control, RG/RQ-AMPK $\gamma$ 1, or RG-AMPK $\gamma$ 2 adenovirus as described in Section 2 or treated with A-769662 (400  $\mu$ M) for 16 h before the addition of TRAIL (1  $\mu$ g/mL). (A) p-ACC levels and constitutively active AMPK expression were assessed by immunoblotting. Tubulin was used as a protein loading control. Results are representative of three independent experiments. (B) AMPK $\alpha$ 1 activity was measured in the absence or in the presence of AMP as described in Section 2 and normalized to the activity detected in control untreated cells. Error bars represent S.D. from three independent experiments. (C) Apoptosis was measured 24 h after the addition of TRAIL as percentage of subG1 cells. Error bars represent S.D. from three independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 and n.s. = non-significant.

386 cells treated with AICAR or glucose deprivation (Fig. 7C). In  
387 contrast, TRAIL treatment did not induce a reduction in cFLIP levels  
388 in MDA-MB231 cells (Fig. 7A).

389 We next examined the role of AMPK in the observed down-  
390 regulation of cFLIP levels by AMPK activators. Silencing of AMPK  
391 expression by siRNA did not change the basal levels of cFLIP<sub>L</sub> and  
392 cFLIP<sub>S</sub> proteins in MDA-MB231 cells (Fig. 7D). Interestingly,  
393 knockdown of AMPK did not abrogate the decrease in cFLIP<sub>L</sub>  
394 and cFLIP<sub>S</sub> levels observed in cells treated with AMPK activators  
395 (Fig. 7D). These results suggest that, as is the case with  
396 sensitization to TRAIL-induced apoptosis, AMPK activation is most  
397 likely not involved in the down-regulation of cFLIP levels observed  
398 in breast tumor cells following incubation with AMPK activators.

To test whether modulation of cFLIP expression by AMPK 399  
activators in MDA-MB231 cells occurred at the mRNA level, we 400  
performed RT-PCR analysis of cFLIP<sub>L</sub> and cFLIP<sub>S</sub> mRNA in cells 401  
treated with AMPK activators. Results shown in Fig. 7E indicate 402  
that in contrast to the observed down-regulation of cFLIP protein 403  
levels, incubation of cells in the presence of the different AMPK 404  
activators did not change significantly the levels of cFLIP mRNA. It 405  
has been previously described that cFLIP levels can be modulated 406  
through an ubiquitin-proteasome pathway [35]. To assess the role 407



**Fig. 7.** Down-regulation of cFLIP levels by AMPK activators is involved in the sensitization of breast tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. MDA-MB231 cells were incubated with AICAR (A, 2 mM), low glucose (G, 0.1 mM), phenformin (P, 1 mM) or TRAIL (T, 1 μg/mL) for 16 h (A) or incubated with A-769662 (400 μM) for 16 h (B). p-ACC and FLIP levels were analyzed by immunoblotting. Tubulin or GAPDH were used as protein loading controls. Results are representative of three independent experiments. (C) MCF-7 cells were incubated with AICAR 1 mM or glucose-free medium for the times indicated. p-ACC and cFLIP levels were analyzed by immunoblotting. Tubulin was used as protein loading control. Results are representative of three independent experiments. (D) MDA-MB231 cells were transfected either with a siRNA oligonucleotide targeting AMPKα1 or a siRNA oligonucleotide control as described in Section 2. After 48 h cells were treated with AICAR (1 mM), low glucose (0.1 mM) or phenformin (1 mM) for 16 h. cFLIP and AMPKα1 levels were assessed by immunoblotting. GAPDH was used as a protein loading control. Results are representative of two independent experiments. (E) Cells were treated with AMPK activators as described in (A) and cFLIP<sub>L</sub> and cFLIP<sub>S</sub> mRNA levels were determined by RT-PCR as described in Section 2. Results are representative of three independent experiments. (F) MDA-MB231 cells were incubated with AICAR (A, 2 mM), glucose (G, 0.1 mM), or phenformin (P, 1 mM) for 16 h with or without MG-132 (MG, 500 nM). cFLIP levels were assessed by immunoblotting. GAPDH was used as a protein loading control. Results are representative of three independent experiments. Wild type (WT) and FLIP-over-expressing (FLIP) MDA-MB231 cells were treated with AICAR (2 mM), low glucose (0.1 mM) or phenformin (1 mM) for 8 h (G and H) prior to the incubation with TRAIL (1 μg/mL) (H). FLIP and p-ACC levels (G) were assessed by immunoblotting. GAPDH was used as a protein loading control. Results are representative of three independent experiments. (H) Apoptosis was measured 16 h after the addition of TRAIL as percentage of subG1 cells. Error bars represent S.D. from three independent experiments. \*\*P < 0.01.

of the proteasome in the down-regulation of cFLIP protein levels upon treatment with AMPK activators cells were treated with the proteasome inhibitor MG-132 before the addition of activators. As shown in Fig. 7F, treatment with MG-132 blocked down-regulation of both cFLIP isoforms induced by AMPK activators.

To demonstrate the importance of the reduction in cFLIP levels caused by treatment with AMPK activators in the sensitization observed to TRAIL-induced apoptosis, we performed some experiments with MDA-MB231 cells over-expressing cFLIP<sub>L</sub> (Fig. 7G and H). In these cells, cFLIP<sub>L</sub> levels were maintained in

413  
414  
415  
416  
417

418 cells treated with the different AMPK activators (Fig. 7G).  
419 Interestingly, as shown in Fig. 7H cells over-expressing cFLIP<sub>L</sub>  
420 were clearly more resistant to AMPK activators-induced sensitiza-  
421 tion to TRAIL apoptosis than cells expressing normal cFLIP levels.  
422 Taken together, these results indicate that a key step in the  
423 sensitization to TRAIL apoptosis by AMPK activators is the down-  
424 regulation of cellular FLIP levels.

#### 425 4. Discussion

426 It is well established that the key function of AMPK is to  
427 regulate the energy balance within the cell [13]. Once activated,  
428 AMPK phosphorylates downstream substrates, the overall effect  
429 of which is to switch off ATP-consuming pathways and to switch  
430 on catabolic pathways that generate ATP. Activation of AMPK by  
431 energy stress also causes a metabolic checkpoint, in which cells  
432 with intact AMPK signalling undergo cell-cycle arrest, while  
433 those cells defective for AMPK activation, or key components of  
434 the AMPK pathway, continue cycling and subsequently undergo  
435 apoptosis [36]. Activation of AMPK induces p53-dependent  
436 apoptotic cell death in response to energetic stress [37].  
437 Moreover, AMPK activation with AICAR further enhances  
438 E2F1-mediated apoptosis [38]. All these studies suggested that  
439 AMPK activation could play a pro-apoptotic role in different  
440 types of cells.

441 Anti-tumor therapy based on the apoptosis-inducing properties  
442 of TRAIL and agonistic TRAIL receptor antibodies is currently under  
443 consideration [39]. However, despite the fact that TRAIL induces  
444 selective cell death in human tumor cells, sparing most untrans-  
445 formed cells, resistance to TRAIL is not uncommon in certain tumor  
446 cell lines. Furthermore, TRAIL might also promote cell migration  
447 and invasion in some apoptosis-resistant cells [40]. Hence,  
448 sensitization of cells to TRAIL-induced apoptosis through different  
449 strategies would augment the therapeutic potential of TRAIL  
450 against its capacity to stimulate invasion, resolving the potential  
451 risk to patients with TRAIL-resistant cancers. Combination  
452 strategies have been implemented to facilitate TRAIL apoptotic  
453 signalling [41], and we have been investigating the resistance of  
454 human breast tumor cells to TRAIL and the how to overcome it. We  
455 previously reported that the formation of the death-inducing  
456 signalling complex (DISC) is a common target for different  
457 sensitizing regimes to death receptor-induced apoptosis in breast  
458 tumor cells [6,42].

459 Glucose deprivation, a potent AMPK stimulus, enhances  
460 death receptor-triggered formation of death-inducing signalling  
461 complex and markedly sensitizes tumor cells to death receptor-  
462 mediated apoptosis [27]. Furthermore, AICAR treatment of a  
463 colon cancer cell line has been reported to sensitize these cells  
464 to TNF-alpha or TRAIL-induced apoptosis [21]. In our study, we  
465 demonstrate that pre-treatment of human breast cancer cells  
466 with AMPK activators promotes the activation by TRAIL of a  
467 caspase-dependent mechanism of apoptosis in these cells. We  
468 show that sensitization to TRAIL-induced cell death by AMPK  
469 activators is a general phenomenon occurring in all human  
470 breast cancer cell lines examined. However, several evidences  
471 indicate that AMPK is not involved in the sensitization process.  
472 First, there is no correlation between the doses of phenformin  
473 that activate the AMPK pathway and those sensitizing the cells  
474 to TRAIL-induced apoptosis. Second, silencing AMPK expression  
475 by siRNA does not abrogate sensitization to TRAIL apoptosis by  
476 AMPK activators. Third, expression of a dominant negative  
477 AMPK $\alpha$ 1 mutant isoform which inhibits AMPK activation does  
478 not prevent sensitization to TRAIL-induced apoptosis. Finally,  
479 over-expression of a constitutively active form of AMPK does not  
480 sensitize the cells to TRAIL. On the basis of these findings, we  
481 propose that AMPK-independent mechanism(s) must be respon-

sible for the observed sensitization of breast tumor cells to  
TRAIL.

AMPK activators may have other targets than AMPK [43,44]. In  
this respect, a recent study has demonstrated that AICAR and  
phenformin cause dephosphorylation of Akt and glycogen  
synthase kinase-3 (GSK-3) independently of their effects on AMPK  
activity [45]. Moreover, metformin, an anti-diabetic drug targeting  
AMPK has been demonstrated to down-regulate HER2 protein  
levels and to inhibit the development of mammary carcinomas  
through an AMPK-independent mechanism [46]. Furthermore, the  
apoptosis-inducing effect of AICAR could be observed in the  
absence of concomitant activation of AMPK in some human  
leukemic cells [47].

Although we have not identified the molecular target(s) of  
AMPK-activating agents that cause sensitization to TRAIL-  
induced apoptosis in breast tumor cells, our data indicate that  
down-regulation of the apoptosis inhibitor cFLIP is a common  
event to all treatments. How cFLIP levels are lowered by AMPK  
activators in breast tumor cells is not known. Our siRNA data  
indicate that cFLIP down-regulation does not require AMPK. It  
has been reported that cellular levels of FLIP can be regulated by  
the PI3K/Akt/Foxo3a pathway [48]. AMPK-independent inhibi-  
tion of Akt by AICAR and phenformin has been recently  
demonstrated [45] and glucose deprivation has been shown to  
down-regulate cFLIP expression through the elevation of  
ceramide levels and inhibition of Akt [49]. However, results  
from our laboratory indicate that the basal levels of cFLIP are not  
affected by Akt inhibition in breast tumor cells (Yerbes et al.,  
unpublished results).

The importance of cFLIP down-regulation by AMPK activators in  
the sensitization process is supported by the finding that siRNA  
silencing of cFLIP is sufficient to sensitize breast tumor cells to  
TRAIL-induced apoptosis [6]. The decrease in cFLIP levels upon  
treatment with AMPK activators can result in an elevation of the  
caspase-8/cFLIP ratio in the DISC of treated cells, which should  
facilitate caspase-8 activation and promote apoptosis [50]. On the  
other hand, competition between FADD and cFLIP<sub>L</sub> for the death  
domain of TRAIL receptor DR5 [51] may also modulate DISC  
formation. The decrease in cFLIP<sub>L</sub> levels upon treatment with  
AMPK-activating regimes observed in our work could favour  
binding of FADD and procaspase-8 to the TRAIL DISC and enhance  
the processing and activation of caspase-8. Our results demon-  
strate that facilitation of TRAIL-induced apoptosis by AMPK  
activators is markedly inhibited in breast tumor cells over-  
expressing cFLIP<sub>L</sub>, further supporting the role of cFLIP down-  
regulation in the sensitization process.

In conclusion, our results demonstrate that treatments  
frequently used to activate AMPK and to examine the role of this  
kinase in apoptosis regulation, trigger the down-regulation of an  
important inhibitor of death receptor-mediated apoptosis through  
an AMPK-independent mechanism. Consequently, to determine  
the importance of AMPK in the resistance of tumor cells to TRAIL  
and other therapeutic strategies it will be necessary to use more  
specific approaches such as RNA interference or the expression of  
dominant inhibitory forms of AMPK.

#### Acknowledgements

We thank Ana Isabel López-Pérez for excellent technical  
assistance. This work was supported by grants from Ministerio  
de Educación y Ciencia (SAF2006-00633), Red Temática de  
Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) (RD06/0020/0068)  
and Junta de Andalucía (CTS-211) to ALR. CG-G was supported by  
an I3P fellowship from Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas. DC and NN are supported by the Medical Research  
Council (UK).

## References

- [1] Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:1001–12.
- [2] Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 1999;59:734–41.
- [3] Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 2003;22:8628–33.
- [4] Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, et al. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1754–9.
- [5] Frew AJ, Lindemann RK, Martin BP, Clarke CJ, Sharkey J, Anthony DA, et al. Combination therapy of established cancer using a histone deacetylase inhibitor and a TRAIL receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:11317–22.
- [6] Palacios C, Yerbes R, Lopez-Rivas A. Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells. *Cancer Res* 2006;66:8858–69.
- [7] Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 2000;12:599–609.
- [8] Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 2002;16:33–45.
- [9] Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190–5.
- [10] Yeh WC, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu HB, Wakeham A, et al. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 2000;12:633–42.
- [11] Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2001;276:20633–40.
- [12] Sharp DA, Lawrence DA, Ashkenazi A. Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280:19401–9.
- [13] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:774–85.
- [14] Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 2004;29:18–24.
- [15] Momcilovic M, Hong SP, Carlson M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* 2006;281:25336–43.
- [16] Witters LA, Kemp BE, Means AR. Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends Biochem Sci* 2006;31:13–6.
- [17] Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 2007;403:139–48.
- [18] Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 2006;3:403–16.
- [19] Goransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M, et al. Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2007;282:32549–60.
- [20] Sanders MJ, Ali ZS, Hegarty BD, Heath R, Snowden MA, Carling D. Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family. *J Biol Chem* 2007;282:32539–48.
- [21] Su RY, Chao Y, Chen TY, Huang DY, Lin WW. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside sensitizes TRAIL- and TNF $\alpha$ -induced cytotoxicity in colon cancer cells through AMP-activated protein kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1562–71.
- [22] Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes* 2002;51:159–67.
- [23] Russell 3rd RR, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, et al. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest* 2004;114:495–503.
- [24] Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL. Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:17402–7.
- [25] Harper N, Farrow SN, Kaptein A, Cohen GM, MacFarlane M. Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced NF- $\kappa$ B activation by inhibition of apical caspases. *J Biol Chem* 2001;276:34743–52.
- [26] Ruiz-Ruiz C, Lopez-Rivas A. Mitochondria-dependent and -independent mechanisms in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis are both regulated by interferon- $\gamma$  in human breast tumour cells. *Biochem J* 2002;365:825–32.
- [27] Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Palacios C, Lopez-Rivas A. Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J Biol Chem* 2003;278:12759–68.
- [28] Parker AL, McVey JH, Doctor JH, Lopez-Franco O, Waddington SN, Havenga MJ, et al. Influence of coagulation factor zymogens on the infectivity of adenoviruses pseudotyped with fibers from subgroup D. *J Virol* 2007;81:3627–31.
- [29] Woods A, Cheung PC, Smith FC, Davison MD, Scott J, Beri RK, et al. Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. *J Biol Chem* 1996;271:10282–90.
- [30] Davies SP, Carling D, Hardie DG. Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *Eur J Biochem* 1989;186:123–8.
- [31] Nam SY, Jung GA, Hur GC, Chung HY, Kim WH, Seol DW, et al. Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Sci* 2003;94:1066–73.
- [32] Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferre P, et al. Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 2000;20:6704–11.
- [33] Daniel T, Carling D. Functional analysis of mutations in the gamma 2 subunit of AMP-activated protein kinase associated with cardiac hypertrophy and Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Biol Chem* 2002;277:51017–24.
- [34] Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, et al. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* 2002;21:3704–14.
- [35] Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kadowaki Y, Itoshima T, et al. Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene* 2001;20:5225–31.
- [36] Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2005;18:283–93.
- [37] Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, et al. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J Biol Chem* 2008;283:3979–87.
- [38] Hallstrom TC, Mori S, Nevins JR. An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell* 2008;13:11–22.
- [39] Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2005;5:876–85.
- [40] Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, et al. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2006;25:7434–9.
- [41] Held J, Schulze-Osthoff K. Potential and caveats of TRAIL in cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2001;4:243–52.
- [42] Ruiz-Ruiz C, Munoz-Pinedo C, Lopez-Rivas A. Interferon- $\gamma$  treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res* 2000;60:5673–80.
- [43] Guigas B, Sakamoto K, Taleux N, Reyna SM, Musi N, Viollet B, et al. Beyond AICA riboside: in search of new specific AMP-activated protein kinase activators. *IUBMB Life* 2009;61:18–26.
- [44] Moreno D, Knecht E, Viollet B, Sanz P. A769662, a novel activator of AMP-activated protein kinase, inhibits non-proteolytic components of the 26S proteasome by an AMPK-independent mechanism. *FEBS Lett* 2008;582:2650–4.
- [45] King TD, Song L, Jope RS. AMP-activated protein kinase (AMPK) activating agents cause dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase-3. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1637–47.
- [46] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Menendez JA. The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. *Cell Cycle* 2009;8:88–96.
- [47] Lopez JM, Santidrian AF, Campas C, Gil J. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in Jurkat cells, but the AMP-activated protein kinase is not involved. *Biochem J* 2003;370:1027–32.
- [48] Cornforth AN, Davis JS, Khanifar E, Nastiuk KL, Krolewski JJ. FOXO3a mediates the androgen-dependent regulation of FLIP and contributes to TRAIL-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* 2008;27:4422–33.
- [49] Nam SY, Amoscato AA, Lee YJ. Low glucose-enhanced TRAIL cytotoxicity is mediated through the ceramide-Akt-FLIP pathway. *Oncogene* 2002;21:337–46.
- [50] MacFarlane M, Harper N, Snowden RT, Dyer MJ, Barnett GA, Pringle JH, et al. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* 2002;21:6809–18.
- [51] Jin TG, Kurakin A, Benhaga N, Abe K, Mohseni M, Sandra F, et al. Fas-associated protein with death domain (FADD)-independent recruitment of c-FLIPL to death receptor 5. *J Biol Chem* 2004;279:55594–601.

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

Griselda Herrero-Martín<sup>1,2,4</sup>, Maria Høyer-Hansen<sup>2,4</sup>, Celina García-García<sup>1</sup>, Claudia Fumarola<sup>3</sup>, Thomas Farkas<sup>2</sup>, Abelardo López-Rivas<sup>1,5,\*</sup> and Marja Jäätelä<sup>2,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Cell Signalling Department, Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Américo Vespucio s/n, Sevilla, Spain, <sup>2</sup>Apoptosis Department and Centre for Genotoxic Stress Research, Institute for Cancer Biology, Danish Cancer Society, Copenhagen, Denmark and <sup>3</sup>Division of Molecular Pathology and Immunology, Department of Experimental Medicine, University of Parma, Parma, Italy

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

The EMBO Journal advance online publication, 5 February 2009; doi:10.1038/emboj.2009.8

Subject Categories: signal transduction; differentiation & death

Keywords: autophagy; cancer; cell death; signalling; TRAIL

\*Corresponding authors. A López-Rivas, Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Américo Vespucio s/n, 41092-Sevilla, Spain. Tel.: +34 954467997; Fax: +34 954461664; E-mail: abelardo.lopez@cabimer.es or M Jäätelä, Apoptosis Department and Centre for Genotoxic Stress Research, Institute for Cancer Biology, Strandboulevard 49, Danish Cancer Society, Copenhagen 2100, Denmark. Tel.: +45 35257318; Fax: +45 35257721; E-mail: mj@cancer.dk

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>5</sup>These authors share the senior authorship

Received: 4 September 2008; accepted: 5 January 2009

## Introduction

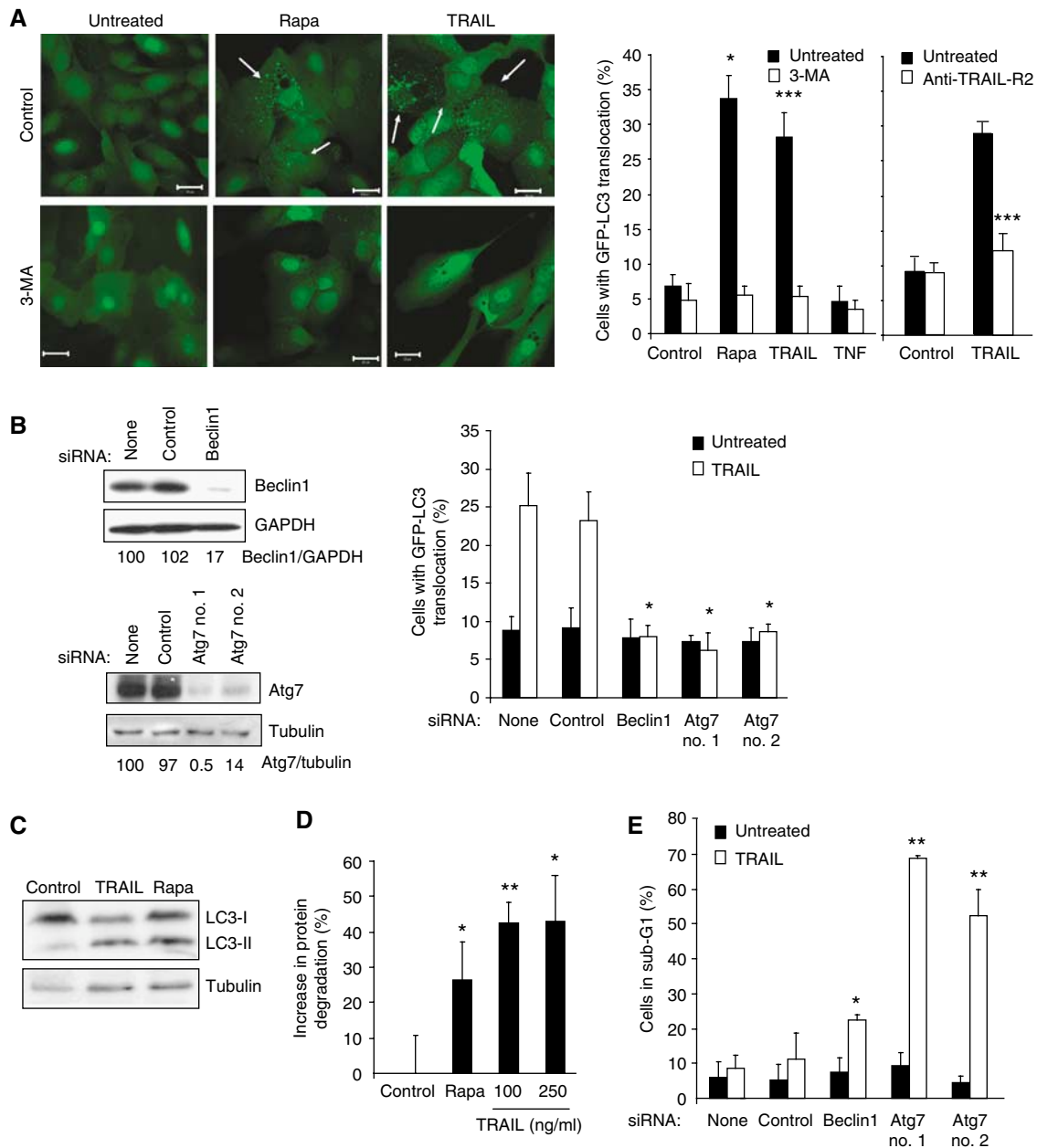
Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a lysosomal pathway involved in the turnover of long-lived proteins, cytoplasm and whole organelles (Codogno and Meijer, 2005; Kroemer and Jäätelä, 2005; Lum *et al.*, 2005; Xie and Klionsky, 2007). In unstressed cells, autophagy is inhibited by the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1). The inhibition of mTORC1 activity (e.g., by starvation or rapamycin) leads to the activation of a set of evolutionarily conserved autophagy-regulating proteins (Atg proteins) and formation of autophagosomes, which then fuse with lysosomes to form autolysosomes, in which the cargo is digested to metabolites and released back to the cytosol for recycling. Accumulating evidence indicates that autophagy can function as an adaptive cell response allowing the cell to survive otherwise lethal challenges by removing damaged organelles and misfolded proteins. Paradoxically, autophagy can also mediate a non-apoptotic type II cell death, called autophagic degeneration.

Tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a multifunctional cytokine originally identified as an apoptosis-inducing member of the TNF superfamily (Falschlehner *et al.*, 2007; Ashkenazi and Herbst, 2008). Prompted by the recent data showing that TRAIL is upregulated during breast morphogenesis and induces accumulation of autophagic vacuoles during lumen formation in an *in vitro* morphogenesis model (Mills *et al.*, 2004), we hypothesized that autophagy may either contribute to the TRAIL-induced lumen formation by facilitating cell death or it may explain the TRAIL resistance of normal cells. Using immortalized breast and pigment epithelial cells, we show here that TRAIL induces cytoprotective autophagy in untransformed cells through a novel signalling pathway involving TGF- $\beta$ -activating kinase 1 (TAK1), AMP-activated protein kinase (AMPK) and mTORC1.

## Results and discussion

### TRAIL triggers functional and cytoprotective autophagy in breast epithelial cells

To study the TRAIL-induced accumulation of autophagosomes in greater detail, we created MCF10A cells (immortalized human breast epithelial cells) stably expressing the autophagosome-associated protein LC3 (also known as Atg8) fused to enhanced green fluorescent protein (eGFP-LC3). In the majority of untreated MCF10A cells, the eGFP-LC3 was diffusely distributed in the cytosol and nucleus, and only approximately 5% of the cells showed a dotted staining pattern of eGFP-LC3 ( $\geq 5$  dots per cross-section), indicative of the accumulation of autophagosomes (Figure 1A). TRAIL treatment increased the number of cells with autophagosome accumulation to the level comparable with that seen in rapamycin-treated control cells, whereas the highly related cytokine TNF had no detectable effect on the eGFP-LC3



**Figure 1** TRAIL induces cytoprotective autophagy in breast epithelial cells. (A) MCF10A-eGFP-LC3 cells were left untreated (Control) or treated with 5  $\mu$ M rapamycin (Rapa), 500 ng/ml TRAIL or 10 ng/ml TNF for 24 h. When indicated, 10 mM 3-MA or 5  $\mu$ g/ml TRAIL-R2 antagonist antibody was added 1 h before the drugs. Representative confocal images (20  $\mu$ m scale bars) and the percentages of cells with LC3 translocation are shown. (B) MCF10A-eGFP-LC3 cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 h and analysed by immunoblotting (left), or stimulated with 500 ng/ml TRAIL for 24 h and analysed for LC3 translocation (right). (C) MCF10A cells left untreated (Control) or treated with 500 ng/ml TRAIL or 5  $\mu$ M rapamycin (Rapa) for 24 h were analysed for LC3-I, LC3-II and tubulin by immunoblotting. Pepstatin A and E64d were added to the cells 4 h before harvesting. Similar results were obtained in two independent experiments. (D) MCF10A cells were treated with 5  $\mu$ M rapamycin (Rapa) or indicated concentrations of TRAIL for 24 h, and the increase in the degradation of long-lived proteins as compared with the untreated cultures (Control) was measured. (E) MCF10A-eGFP-LC3 cells transfected with the indicated siRNAs were left untreated 48 h later (Control) or treated with 500 ng/ml TRAIL for 24 h and analysed for the DNA content by flow cytometry. The percentage of apoptotic cells with sub-G1 DNA content is shown. The values represent mean  $\pm$  s.d. for three (A, D) or four (B, E) independent experiments. \**P*-value <0.05, \*\**P*-value <0.01 and \*\*\**P*-value <0.001 as compared with control sample (A—left panel and D), with TRAIL-treated cells without anti-TRAIL-R2 (A—right panel) or with TRAIL-treated cells without siRNA (B, E).

distribution (Figure 1A). Flow cytometry-based analysis revealed TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2) on the surface of MCF10A cells, whereas the expression levels of TRAIL-R1, -R3 and -R4 expression were under the detection limit of the assay (Supplementary Figure S1A). Accordingly, an antagonistic TRAIL-R2 antibody effectively inhibited TRAIL-induced autophagosomes accumulation in MCF10A cells (Figure 1A).

This antibody also inhibited TRAIL-induced cell death in MCF10A cells sensitized to TRAIL-induced cytotoxicity by a protein synthesis inhibitor (Supplementary Figure S1B). Thus, TRAIL-R2 is able to activate signalling pathways leading to both autophagosome accumulation and cell death.

To test whether the TRAIL-induced autophagosome accumulation was mediated by the known core autophagy

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

Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced autophagosome formation was significant as early as 4 h after the addition of 500 ng/ml TRAIL and increased continuously during a 72 h treatment period (Supplementary Figure S2A). Furthermore, the response was dose dependent at TRAIL concentrations ranging from 10 to 500 ng/ml (Supplementary Figure S2A). Notably, TRAIL failed to induce significant cell death in MCF10A cells within these time and concentration ranges, but the inhibition of autophagy by depletion of beclin 1 or Atg7 sensitized the cells to TRAIL-induced cell death as analysed by flow cytometry-based quantification of cells with reduced DNA content and detection of floating dead cells by microscopy (Figure 1E and data not shown). The cytoprotective nature of TRAIL-induced autophagy suggests that it does not contribute to the lumen formation during breast morphogenesis but rather opposes it by inhibiting cell death. Accordingly, autophagy inhibition by depletion of Atg5 or Atg7 has recently been shown to enhance luminal apoptosis in an MCF10A breast morphogenesis model (Fung *et al*, 2008).

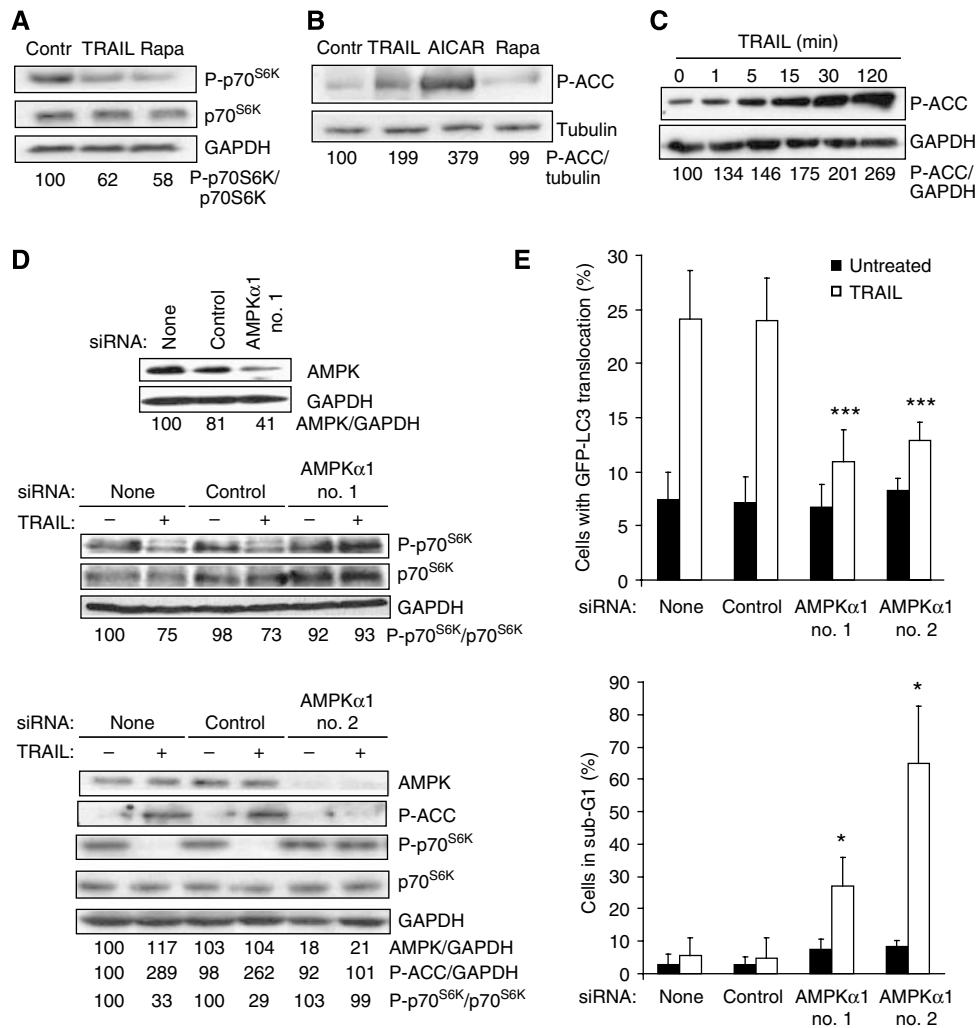
### **TRAIL-induced autophagy depends on AMPK-mediated inhibition of mTORC1**

The molecular mechanisms governing TRAIL-induced autophagy have remained unexplored. To test whether TRAIL-induced autophagy was associated with the inhibition of mTORC1 kinase complex, a key negative regulator of autophagy in unstressed cells, we measured the phosphorylation level of an mTORC1 substrate, ribosomal protein S6 kinase 1 (p70<sup>S6K</sup>). Remarkably, TRAIL inhibited the phosphorylation of p70<sup>S6K</sup> as effectively as rapamycin, a direct inhibitor of mTORC1 (Figure 2A). AMPK, an evolutionarily highly conserved regulator of cellular energy homeostasis has recently emerged as a putative activator of autophagy (Kamada *et al*, 2004; Meley *et al*, 2006; Høyer-Hansen *et al*, 2007). The AMPK-mediated autophagy activation may occur through two distinct signalling pathways that lead to the inhibition of mTORC1 (Inoki *et al*, 2003; Shaw *et al*, 2004a; Gwinn *et al*, 2008). AMPK-mediated phosphorylation of tuberous sclerosis complex 2 leads to the inhibition of an mTORC1 activator ras-family GTP-binding protein RHEB, whereas that of an mTOR-binding partner raptor triggers the binding of raptor to 14-3-3 proteins and subsequent inhibition of the ability of mTORC1 to recruit downstream substrates. Thus, we next tested whether AMPK was activated in TRAIL-treated MCF10A cells. Interestingly, TRAIL induced a rapid (detectable at 1 min), sustained (until 24 h) and dose-dependent (10–500 ng/ml) activation of AMPK as shown by an increase in

the phosphorylation of an AMPK substrate acetyl-CoA-carboxylase (ACC) (Figure 2B, C and Supplementary Figure S2B). Furthermore, the depletion of the catalytic  $\alpha$ 1-subunit of AMPK by RNA interference in TRAIL-treated MCF10A cells restored the mTORC1 activity, attenuated autophagosome formation and sensitized the cells to TRAIL-induced cell death, indicating that AMPK $\alpha$ 1 mediates the TRAIL-induced cytoprotective autophagy (Figure 2D and E). Even though TRAIL has been reported to activate several kinases (Falschlehner *et al*, 2007), to our knowledge, these data are the first to report the ability of TRAIL to activate AMPK. Furthermore, the data presented above provide the first genetic evidence that endogenous AMPK, and more precisely AMPK $\alpha$ 1, is an essential mediator of autophagy in mammalian cells.

### **TAK1 mediates TRAIL-induced activation of AMPK and autophagy**

The AMPK can be phosphorylated and activated by tumour suppressor kinase LKB1 when the ratio of AMP/ATP increases and by calcium/calmodulin-dependent protein kinase- $\beta$  (CaMKK $\beta$ ) in response to an increase in the cytosolic-free calcium [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> (Corradetti *et al*, 2004; Shaw *et al*, 2004b; Hawley *et al*, 2005; Woods *et al*, 2005). Accordingly, LKB1 and CaMKK $\beta$  have been reported to mediate autophagy in response to starvation and an increase in the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>, respectively (Liang *et al*, 2007; Høyer-Hansen *et al*, 2007; Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007). Thus, we next studied whether these AMPK kinases were responsible for the TRAIL-induced activation of AMPK and autophagy. Even though the siRNAs used effectively depleted LKB1 and CaMKK $\beta$  and completely inhibited the AMPK activation and autophagosome accumulation in starved and ionomycin-treated MCF10A cells, respectively, their depletion influenced neither TRAIL-induced AMPK activation nor autophagy (Figure 3A–C). In spite of some residual LKB1 and CaMKK $\beta$  in the siRNA-treated cells, the complete inability of the cells to activate AMPK and autophagosome accumulation upon starvation and ionomycin strongly suggests that TRAIL activates AMPK by a pathway independent of the two known AMPK kinases. Thus, it is interesting to note that TAK1, a cytokine-activated member of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase family, has recently been shown to activate the yeast AMPK homologue Snf1 *in vivo* and mammalian AMPK *in vitro*, suggesting that it could exert an effect as a third mammalian AMPK kinase (Momcilovic *et al*, 2006). To investigate the possible function of TAK1 in TRAIL-induced AMPK activation and autophagy, we first examined the effect of TRAIL on TAK1 activation in MCF10A cells by determining TAK1 phosphorylation at Thr184/187, an essential step for the complete kinase activation (Sakurai *et al*, 2000). Remarkably, TRAIL induced a rapid (detectable at 5 min), sustained (until 24 h) and dose-dependent activation of TAK1 that closely correlated with the activation of the AMPK (Figure 4A–C and Supplementary Figure S2B). Notably, siRNA-based depletion of TAK1 or TAK1-binding subunit 2 (TAB2), an essential co-factor for cytokine-induced activation of TAK1 (Adhikari *et al*, 2007), effectively abrogated TRAIL-induced AMPK activation, mTORC1 inhibition and autophagosome formation (Figure 4B–E), whereas AMPK $\alpha$ 1 depletion did not affect TRAIL-induced phosphorylation of TAK1 (Supplementary Figure S3). Furthermore,



**Figure 2** TRAIL activates AMPK and AMPK-dependent cytoprotective autophagy. (A) Protein lysates from MCF10A cells left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL or 5  $\mu$ M rapamycin (Rapa, positive control) for 24 h were analysed by immunoblotting for phosphorylated p70<sup>S6K</sup> (P-p70<sup>S6K</sup>), total p70<sup>S6K</sup> and GAPDH (loading control). (B) Immunoblot analysis of the levels of P-ACC and tubulin (loading control) in lysates from MCF10A cells left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 24 h, 1 mM AICAR for 4 h (positive control) or 5  $\mu$ M rapamycin for 24 h (negative control). (C) Immunoblot analysis of the level of P-ACC and GAPDH (loading control) in lysates from MCF10A cells treated with 500 ng/ml TRAIL for the indicated times. (D) MCF10A cells were transfected with indicated siRNAs for 48 h and analysed by immunoblotting for the indicated proteins immediately (upper panel) or after additional 24 h (middle panel) or 2 h (lower panel) incubation with (+) or without (–) 500 ng/ml TRAIL. (E) MCF10A–eGFP–LC3 cells transfected with indicated siRNAs for 48 h and incubated for an additional 24 h with or without 500 ng/ml TRAIL were analysed for LC3 translocation (top) and the DNA content (bottom). The values represent mean  $\pm$  s.d. for four independent experiments. \**P*-value < 0.05 and \*\*\**P*-value < 0.001 as compared with TRAIL-treated cells without siRNA. Similar results were obtained in two (A, B and D) or three (C, D) independent experiments.

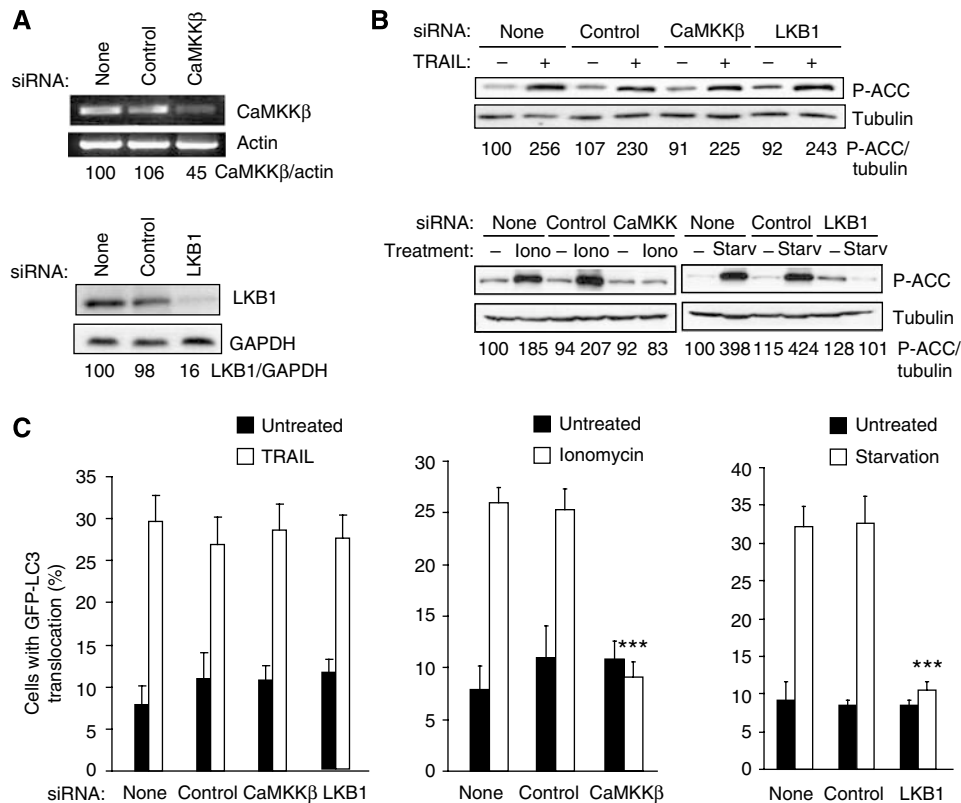
TAK1 and AMPK activation as well as mTORC1 inhibition were completely inhibited by the antagonistic TRAIL-R2 receptor (Supplementary Figure S1B). Thus, TAK1 is an essential mediator of TRAIL-R2-induced AMPK activation and autophagy in MCF10A cells. Moreover, TAK1- and TAB2-depleted cells were greatly sensitized to TRAIL-induced cell death, further highlighting the importance of the TRAIL-induced autophagy pathway in determining the cellular outcome in response to TRAIL treatment (Figure 4D and E).

Transforming growth factor- $\beta$ -activating kinase 1 is an essential mediator of the activation of nuclear factor kappa-B in response to several cytokines (Shim *et al*, 2005; Adhikari *et al*, 2007). To investigate whether TAK1 activation is sufficient for the activation of AMPK–autophagy pathway, we tested the ability of TNF and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) to activate this pathway in MCF10A cells. As shown in

Figure 5A, both cytokines activated TAK1 as judged by the rapid phosphorylation of the inhibitor of kappa-B (I $\kappa$ B). In the case of TNF, which failed to induce the accumulation of autophagosomes (Figure 1A), we also failed to detect the activation of AMPK, whereas IL-1 $\beta$  activated both AMPK and autophagosome accumulation without detectable cell death (Figure 5A–C). Taken together, our data suggest that TAK1 is essential, but not sufficient for the effective activation of AMPK and autophagy.

The downstream signalling pathways activated by TAK1 vary greatly, depending on the cell type and the stimulus (Delaney and Mlodzik, 2006). To investigate whether the ability of TRAIL to activate the cytoprotective TAK1–AMPK pathway was restricted to breast epithelial cells, we included human hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cells (hTERT–RPE-1) to this study. TRAIL activated AMPK and



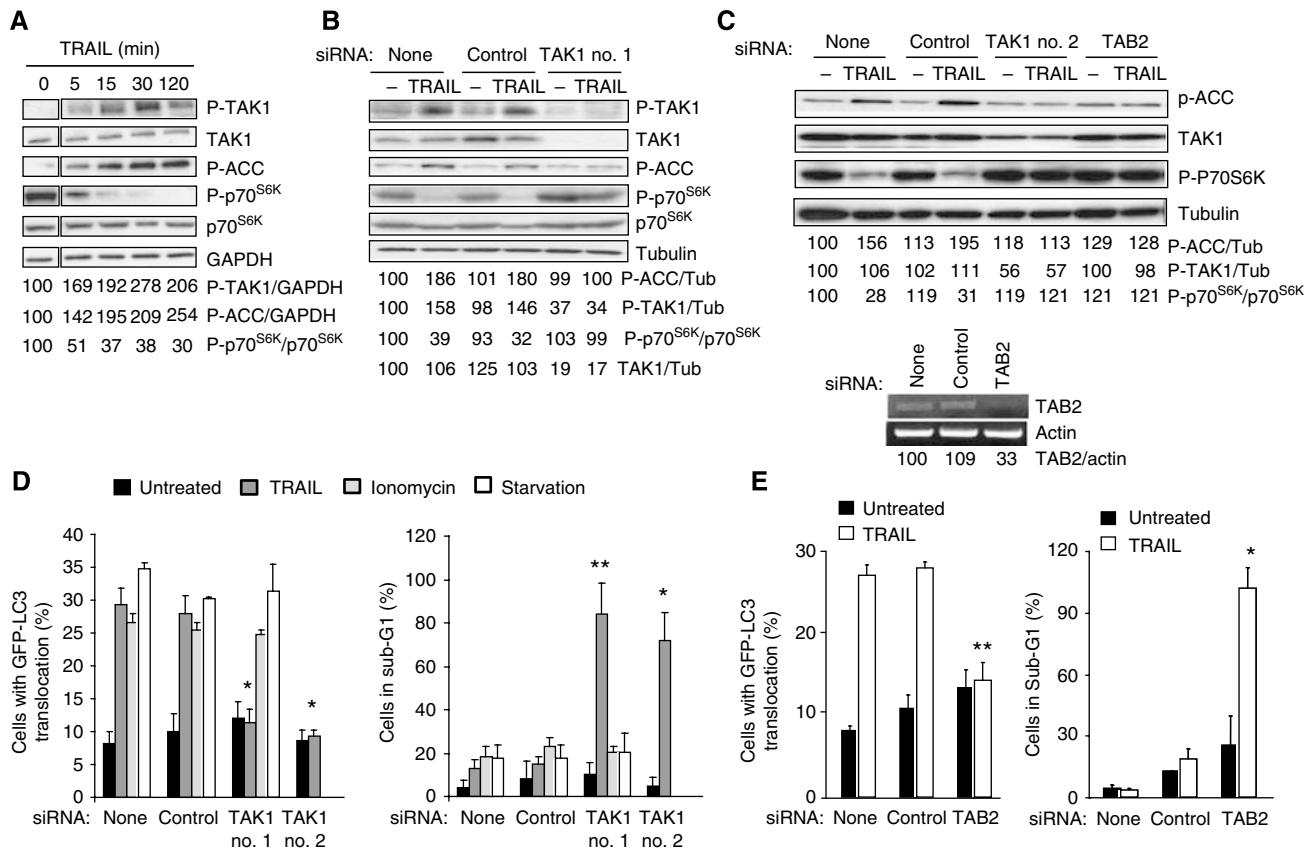


**Figure 3** LKB1 and CaMKKβ do not have an important function in TRAIL-induced AMPK activation and autophagy. (A) MCF10A-eGFP-LC3 cells were transfected with indicated siRNAs for 48 h and analysed for the indicated mRNAs (top) and proteins (bottom by RT-PCR and immunoblotting, respectively). Similar results were obtained in three independent experiments. (B) MCF10A-eGFP-LC3 cells transfected with indicated siRNAs for 48 h, and left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 2 h, 10 μM ionomycin for 24 h or starved for amino acids and glucose for 24 h (starvation) were analysed for P-ACC and tubulin (loading control) expression by immunoblotting. Similar results were obtained in two independent experiments. (C) Cells transfected as in (B) and left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL, 10 μM ionomycin or starved for amino acids and glucose for 24 h were analysed for LC3 translocation. The values represent mean ± s.d. of three independent experiments. \*\*\**P*-value <0.001 as compared with cells treated in a same way, but transfected without siRNA.

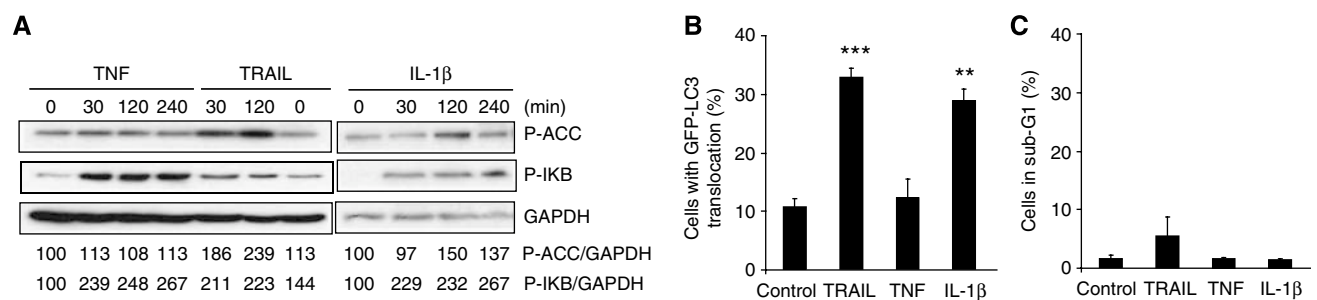
autophagosome accumulation and inhibited mTORC1 activity in a TAK1-dependent manner also in these cells (Figure 6A and B). Importantly, the inhibition of AMPK activation and autophagosome accumulation by TAK1 and AMPKα1 siRNAs greatly sensitized the hTERT-RPE-1 cells to TRAIL-induced cell death (Figure 6B). Akin to MCF10A cells, TRAIL-induced AMPK activation and autophagosome accumulation were independent of LKB1 and CaMKKβ, whereas the depletion of these kinases effectively inhibited both events induced by starvation and ionomycin, respectively (Figure 6C and D). Moreover, knock-in of a dominant-negative TAK1 mutant in murine embryonic fibroblasts (MEFs) reduced the TRAIL-induced activation of AMPK observed in wild-type MEFs and sensitized the cells to TRAIL-induced cell death (Figure 6E and F). These data further emphasize the function of TAK1 as an activator of AMPK and are in concordance with recent data showing that TAK1-deficient MEFs fail to activate AMPK in response to oligomycin, metformin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (Xie *et al*, 2006). On the basis of data showing that these drugs fail to activate the AMPK kinase LKB1 in TAK1-deficient cells, Xie *et al* have suggested that TAK1 functions upstream of LKB1 rather than as a direct AMPK kinase. It should be noted that this study did not test whether TAK1 could activate AMPK1 and LKB1 in parallel. Furthermore, another pharmacological AMPK activator (A-769662) activates AMPK in LKB1-deficient cervix

carcinoma cells, but fails to activate it in LKB1-deficient skeletal muscle cells, suggesting that the requirements for the AMPK activation may be cell type specific (Goransson *et al*, 2007). Our data showing that TRAIL-induced AMPK activation was not affected by an effective depletion of LKB1 indicate that in TRAIL-treated MCF10A and hTERT-RPE-1 cells, TAK1 activates AMPK independent of LKB1. It remains, however, to be studied whether TAK1 is a direct activator of AMPK in this model system. However, its ability to mediate AMPK-mTORC1 autophagy pathway independent of the two known AMPK kinases together and its previously shown ability to directly activate AMPK *in vitro* support the idea that it may function as an AMPK kinase in TRAIL-treated cells (Momcilovic *et al*, 2006). It should, however, be noted that TAK1 might not be sufficient to activate AMPK. This is supported by our data showing activation of TAK1 (phosphorylation of IκB) in the absence of AMPK activation (phosphorylation of ACC) in TNF-treated MCF10A cells.

The AMPK sits at a unique position as a proposed energy and stress sensor that can interact with diverse signalling molecules and control processes ranging from macromolecule synthesis to cell polarity and autophagy (Brennan, 2007; Hardie, 2007; Høyer-Hansen and Jäätelä, 2007). Hitherto, LKB1 and CaMKKβ have been identified as AMPK kinases in response to low AMP levels and an increase in the  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , respectively. Our data add TRAIL-induced TAK1 activation as



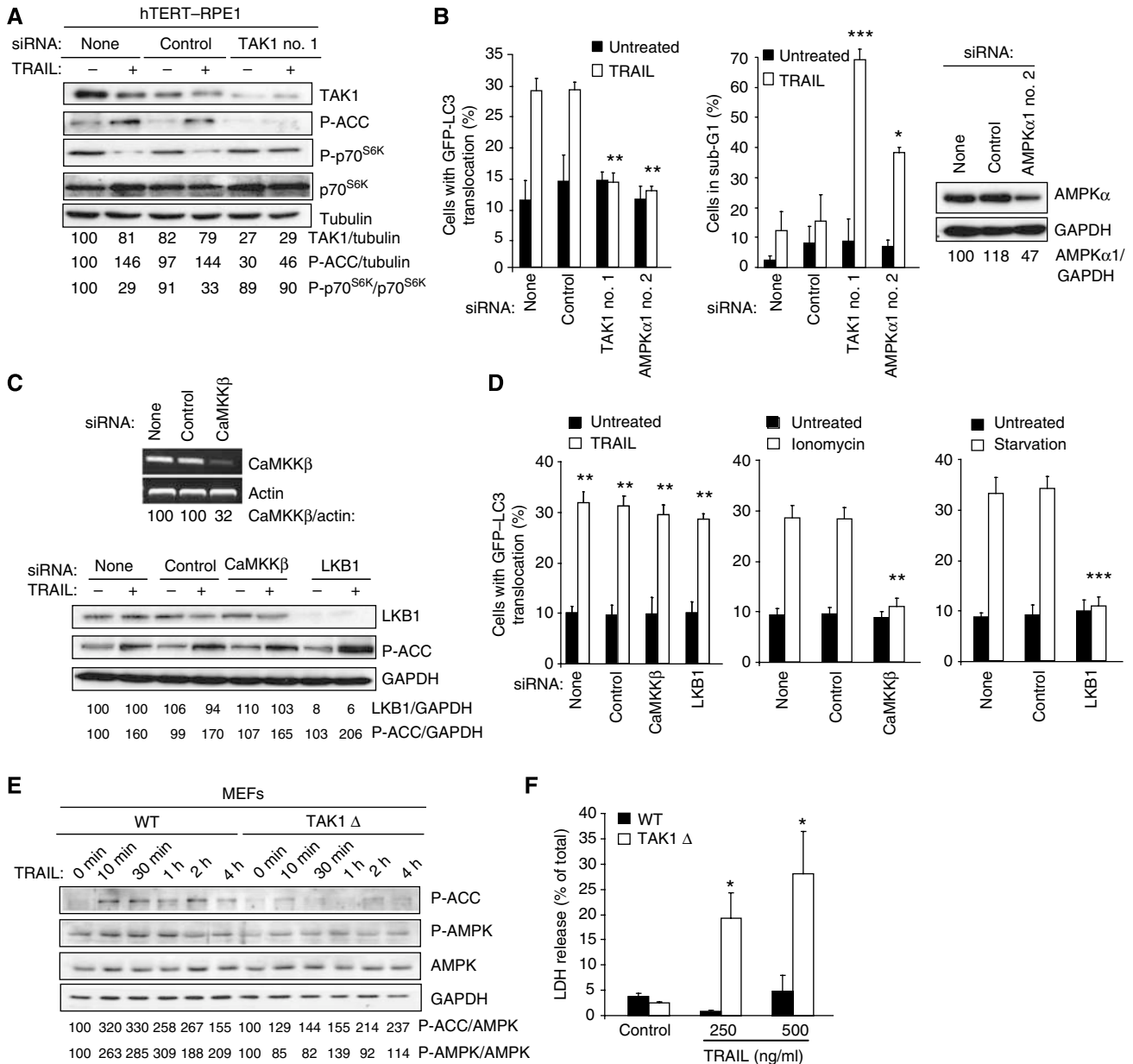
**Figure 4** TAK1 mediates TRAIL-induced AMPK activation and autophagy. (A) The lysates of MCF10A cells treated with 500 ng/ml TRAIL for the indicated times were analysed by immunoblotting. The control lane (0 min TRAIL) originates from the same blot and has been treated and exposed identically. Similar results were obtained in three independent experiments. (B, C) The lysates of MCF10A-eGFP-LC3 cells transfected with indicated siRNAs for 48 h and left untreated (-) or treated with 500 ng/ml TRAIL for 2 h were analysed by immunoblotting. (C, lower panel) MCF10A-eGFP-LC3 cells were transfected with indicated siRNAs for 48 h and analysed for the indicated mRNAs by RT-PCR. Similar results were obtained in two independent experiments. (D, E) MCF10A-eGFP-LC3 cells were transfected with indicated siRNAs for 48 h, treated as in Figure 3C and analysed for LC3 translocation (left) and sub-G1 DNA content (right). The values represent mean  $\pm$  s.d. of a minimum of three independent experiments except for the right panel in E (two experiments). \**P*-value <0.05 and \*\**P*-value <0.01 as compared with cells treated in a same way, but transfected without siRNA.



**Figure 5** IL-1 $\beta$  activates AMPK and autophagy. (A) Protein lysates from MCF10A cells left untreated (0) or treated with 50 ng/ml TNF, 500 ng/ml TRAIL (positive control) or 10 ng/ml IL-1 $\beta$  for indicated times were analysed by immunoblotting for phosphorylated ACC (P-ACC), phosphorylated I $\kappa$ B (P-I $\kappa$ B) and GAPDH (loading control). The values show the P-ACC/GAPDH and P-I $\kappa$ B/GAPDH ratios as percentages of the ratios in untreated cells (left lanes) and are representative of two independent experiments. (B, C) MCF10A-eGFP-LC3 cells left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL, 50 ng/ml TNF or 10 ng/ml IL-1 $\beta$  for 24 h were analysed for LC3 translocation (B) and the DNA content (C). The values represent mean  $\pm$  s.d. for two independent experiments. \*\**P*-value <0.01 and \*\*\**P*-value <0.001 as compared with untreated cells.

a third independent signalling pathway able to activate AMPK. Interestingly, all three signalling pathways leading to AMPK activation can induce autophagy, suggesting that AMPK functions as a universal autophagy activator that can integrate information from various environmental and developmental cues through at least three different signalling pathways (Figure 7).

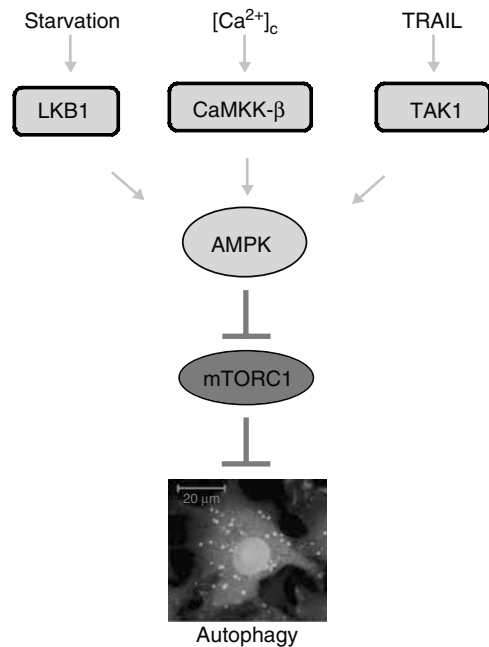
Despite the potential of TRAIL receptors as targets for cancer therapy, little is known about the mechanisms regulating the differential sensitivity of normal and tumour cells to TRAIL-induced cytotoxicity (Ashkenazi and Herbst, 2008). The data presented above suggest that the TRAIL-induced TAK1-AMPK signalling pathway leading to an increase in autophagic activity contributes to the protection of normal



**Figure 6** TRAIL induces TAK1-dependent AMPK activation and autophagy in retinal pigment epithelial cells. (A) The lysates of hTERT-RPE1 cells transfected with indicated siRNAs for 48 h and left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 2 h were analysed by immunoblotting. (B) hTERT-RPE1-eGFP-LC3 cells transfected with indicated siRNAs for 48 h were left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 24 h and analysed for LC3 translocation (left) and sub-G1 DNA content (middle) and AMPK $\alpha$  expression (right). (C) hTERT-RPE1-eGFP-LC3 cells were transfected with indicated siRNAs for 48 h and analysed for the indicated mRNAs (top). After 48 h, cells were left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL for 2 h, and analysed for P-ACC and GAPDH (loading control) expression by immunoblotting. Similar results were obtained in two independent experiments. (D) Cells transfected as described in (C) and left untreated or treated with 500 ng/ml TRAIL, 10  $\mu$ M ionomycin or starved for amino acids and glucose for 24 h were analysed for LC3 translocation. (E) Lysates of wild-type (WT) MEFs and MEFs with an inactive TAK1 knock-in (TAK1 $\Delta$ ) treated with 500 ng/ml TRAIL were analysed by immunoblotting. Similar results were obtained in two independent experiments. (F) WT and TAK1 $\Delta$  MEFs left untreated and treated with 250 or 500 ng/ml TRAIL were analysed for cell death by the LDH release assay. Similar results were obtained in two independent experiments (A, C and E). The values represent mean  $\pm$  s.d. for two (D) or a minimum of three independent experiments (B, F). \**P*-value < 0.05, \*\**P*-value < 0.01 and \*\*\**P*-value < 0.001 as compared with cells treated in the same way, but transfected without siRNA (B, D) or the wild-type cells (F).

epithelial cells against TRAIL-induced cell death. This is strongly supported by data showing that transformation of MCF10A cells by activated oncogenes is sufficient to inhibit TRAIL-induced autophagy and to sensitize them to TRAIL-induced apoptosis (our unpublished data). Recent data showing that TRAIL can induce cytoprotective autophagy also in apoptosis-defective cancer cells suggest that TRAIL-induced

apoptosis overrides the ability of TRAIL to trigger autophagy in cancer cells (Han *et al*, 2008). Alternatively, the TRAIL-resistant cancer cells able to cause autophagy induction might have retained the autophagy-competent phenotype normally killed during the transformation process (Hoyer-Hansen and Jäättelä, 2008). As the TRAIL-induced cytoprotective autophagy in apoptosis-resistant cancer cells may



**Figure 7** A schematic presentation of various signalling pathways leading to AMPK activation and AMPK-dependent autophagy.

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

## Materials and methods

### Cell culture and treatments

The MCF10A breast epithelial cells expressing an ecotropic receptor and eGFP-LC3 fusion protein were described previously (Høyer-Hansen *et al*, 2007). The human hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cell line hTERT-RPE-1 was kindly provided by Dr RM Ríos (CABIMER, Sevilla, Spain) and transfected with pEGFP-LC3 plasmid (Høyer-Hansen *et al*, 2007) to generate a stable pool of hTERT-RPE1-GFP-LC3 cells. The immortalized MEFs from knock-in mice expressing an inactive TAK1 mutant (TAK1 $\Delta$ ) together with the appropriate wild-type MEFs were kindly provided by Dr S Akira (Osaka University, Osaka, Japan) (Sato *et al*, 2005).

Recombinant human TRAIL was produced as described previously (Harper *et al*, 2001). TNF and IL-1 $\beta$  were purchased from Peprotech, rapamycin, ionomycin, pepstatin-A, E64d and 3-MA from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada), Hank's balanced salt solution starvation medium from GIBCO (CA, USA) and monoclonal antagonist antibody to TRAIL-R2 (HS201, preservative free) from Alexis Biochemicals Corp. (San Diego, CA, USA).

### RNA interference

Cells were transfected with indicated siRNAs at 50 nM (except for TAK1 siRNA that was used at 10 nM) using DharmaFECT transfection agent (Dharmacon Research, CO, USA) according to the manufacturer's guidelines. siRNAs corresponding to the human cDNA sequences were as follows: Beclin-1 (5'-CAGTTTGGCACAATCAATAtt-3'), LKB1 (5'-CUGGUGGAUGUGUUUACAtt-3') and a control siRNA (5'-CGACCGAGACAAGCGCAAGt-3') from Dharmacon Research; CaMKK $\beta$  (5'-GGAUCUGAUCAAAGGAUCt-3') and TAK1 no. 1 (5'-GGAGAUCGAGGUGGAAGAGt-3') from Ambion (CA, USA); TAK1 no. 2 (5'-UGGCUUUAUCUUACACUGGAtt-3'), AMPK $\alpha$ 1

no. 1 (5'-UGCCUACCAUCUCAUAAUAtt-3'), AMPK $\alpha$ 1 no. 2 (5'-CCUC AAGCUUUUCAGGCAUtt-3') and control siRNA (5'-CUUUGGGUGAU CUACGUUAtt-3') from Sigma Proligo (St Louis, MO, USA); Atg7 no. 1 (5'-CAGUGGAUCUAAAUCUCAAACUGAUtt-3') and Atg7 no. 2 (5'-AAGGAGUCACAGCUCUUCUtt-3') from Invitrogen and TAB2 from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA; sc-41049).

### Autophagy and cell death detection

The percentage of cells with eGFP-LC3 translocation into dots (a minimum of 100 cells/sample) was counted in eGFP-LC3 expressing cells fixed in 3.7% formaldehyde and 0.19% picric acid (vol/vol) applying Zeiss Axiovert 100 M Confocal Laser Scanning Microscope. Cross-sections with over five dots were considered positive. Long-lived protein degradation assay was performed as described previously (Høyer-Hansen *et al*, 2005).

Hypodiploid apoptotic cells (sub-G1) were detected by flow cytometry as described previously (Ruiz-Ruiz and Lopez-Rivas, 2002), and cell death was detected by lactate dehydrogenase (LDH) release assay (Roche) essentially as described previously (Foghs-gaard *et al*, 2001).

### Immunoblotting

Immunoblot analyses were performed according to standard protocols. For the immunoblot detection of LC3-I and LC3-II, the samples were treated with 10  $\mu$ g/ml pepstatin A and 10  $\mu$ g/ml E64d for the last 4 h before the lysis. Quantification of western blot signals was performed by densitometry with ImageQuant TL software after scanning the films on ImageScanner II (GE Healthcare). The relative expression of proteins was normalized to that of loading controls. The values are expressed as percentages of the expression levels in control cells that were arbitrarily set to 100%. The primary antibodies used for immunoblot analysis included murine monoclonal antibodies against beclin-1 (clone 20; Becton Dickinson) from Transduction Laboratories (NJ, USA), GAPDH from Biogenesis (Poole, UK), P-p70S6K (no. 9206) and P-I $\kappa$ B from Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA), LKB1 from Santa Cruz Biotechnology, LC3 from NanoTools (Germany) and tubulin from Sigma as well as rabbit polyclonals against p70S6K (no. 9202), AMPK (no. 2603), p-AMPK (no. 2535), p-ACC (no. 3661), p-TAK1 (no. 4508), and TAK1 (no. 4505) from Cell Signaling Technology Inc. and Atg7 from ProSci Incorporated (Poway, CA, USA). Appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from DAKO A/S (Glostrup, Denmark) and ECL immunoblotting reagents were obtained from Millipore Corporation (Billerica, MA, USA).

### RT-PCR

RT-PCR analyses were performed according to standard protocols. The following human primers were applied for the RT-PCR: CaMKK $\beta$ : 5'-AGACCAGGCCGTTTCTACT-3' and 5'-GAAGATCTT GCGGGTCTCAG-3'; actin: 5'-TGACGGGTCACCCACACTGTGCC ATCTA-3' and 5'-CATGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'; TAB2: 5'-CTGACTTGAGCAGTGGGTGA-3' and 5'-AACGTAAGG CTTTGGGTCT-3'.

### Statistical analysis

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

### Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

## Acknowledgements

We thank K Grøn Henriksen, J Henrichsen, A López and D Sánchez for excellent technical assistance and A Cerami and RM Ríos for invaluable research tools. We are grateful to R Yerbes, G Ortiz-Ferrón, M Pozuelo, A Vela, C Palacios and M Rohde for stimulating discussions. The work was supported by grants from the Danish Cancer Society and Novo Nordisk Foundation (MJ and MHH); Danish National Research Foundation, Danish Medical Research Council, European Commission FP7 (APO-SYS) and Meyer

Foundation (MJ); and Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) grant SAF2006-00633, Junta de Andalucía grant CTS-211 and Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer grant RD06/0020/

0068 (AL-R). GH-R and CG-G were supported by fellowships from MEC and Consejo Superior de Investigaciones Científicas, respectively. We have no conflicting financial interests.

## References

- Adhikari A, Xu M, Chen ZJ (2007) Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* **26**: 3214–3226
- Ashkenazi A, Herbst RS (2008) To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest* **118**: 1979–1990
- Brennan JE (2007) AMPK/LKB1 signaling in epithelial cell polarity and cell division. *Cell Cycle* **6**: 2755–2759
- Codogno P, Meijer AJ (2005) Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* **12** (Suppl 2): 1509–1518
- Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, Guan KL (2004) Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz–Jeghers syndrome. *Genes Dev* **18**: 1533–1538
- Delaney JR, Mlodzik M (2006) TGF-beta activated kinase-1: new insights into the diverse roles of TAK1 in development and immunity. *Cell Cycle* **5**: 2852–2855
- Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H (2007) TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 1462–1475
- Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jäättelä M (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**: 999–1009
- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J (2008) Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* **19**: 797–806
- Goransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M, Viollet B, Hardie DG, Sakamoto K (2007) Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **282**: 32549–32560
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **30**: 214–226
- Han J, Hou W, Goldstein LA, Lu C, Stolz DB, Yin XM, Rabinowich H (2008) Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. *J Biol Chem* **283**: 19665–19677
- Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 774–785
- Harper N, Farrow SN, Kaptein A, Cohen GM, MacFarlane M (2001) Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J Biol Chem* **276**: 34743–34752
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* **2**: 9–19
- Høyer-Hansen M, Bastholm L, Mathiasen IS, Elling F, Jäättelä M (2005) Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell Death Differ* **12**: 1297–1309
- Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jäättelä M (2007) Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-β and Bcl-2. *Mol Cell* **25**: 193–205
- Høyer-Hansen M, Jäättelä M (2007) AMP-activated protein kinase—a universal regulator of autophagy? *Autophagy* **3**: 381–383
- Høyer-Hansen M, Jäättelä M (2008) Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy* **4**: 574–580
- Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**: 577–590
- Kamada Y, Sekito T, Ohsumi Y (2004) Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**: 73–84
- Kroemer G, Jäättelä M (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* **5**: 886–897
- Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* **9**: 218–224
- Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 439–448
- Meley D, Bauvy C, Houben-Weerts JH, Dubbelhuis PF, Helmond MT, Codogno P, Meijer AJ (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J Biol Chem* **281**: 34870–34879
- Mills KR, Reginato M, Debnath J, Queenan B, Brugge JS (2004) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3438–3443
- Momcilovic M, Hong SP, Carlson M (2006) Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase *in vitro*. *J Biol Chem* **281**: 25336–25343
- Ruiz-Ruiz C, Lopez-Rivas A (2002) Mitochondria-dependent and independent mechanisms in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis are both regulated by interferon-gamma in human breast tumour cells. *Biochem J* **365**: 825–832
- Sakurai H, Miyoshi H, Mizukami J, Sugita T (2000) Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* **474**: 141–145
- Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**: 1087–1095
- Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC (2004a) The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**: 91–99
- Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurler RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC (2004b) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3329–3335
- Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, Bussey C, Steckel M, Tanaka N, Yamada G, Akira S, Matsumoto K, Ghosh S (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways *in vivo*. *Genes Dev* **19**: 2668–2681
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D (2005) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* **2**: 21–33
- Xie M, Zhang D, Dyck JR, Li Y, Zhang H, Morishima M, Mann DL, Taffet GE, Baldini A, Khoury DS, Schneider MD (2006) A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 17378–17383
- Xie Z, Klionsky DJ (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**: 1102–1109