

## Mecanismos moleculares de la muerte celular inducida por privación de glucosa

Alfredo Caro Maldonado

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Doctorado en Inmunología Molecular y  
Celular

Tesis Doctoral:

**MECANISMOS MOLECULARES  
DE LA MUERTE CELULAR  
INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE  
GLUCOSA**

Doctorando: **Alfredo Caro Maldonado**

Directora de Tesis: **Cristina Muñoz Pinedo**



*A los que luchan, a los utópicos, a mis padres.*

Ella está en el horizonte. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos.  
Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. Por mucho que  
yo camine, nunca la alcanzaré. ¿Para qué sirve la utopía?

Para eso sirve: para caminar.

Eduardo Galeano. La Utopía



## CITA

*Los filósofos (científicos) no han hecho más que interpretar de diversos modos el mundo, pero de lo que se trata es de transformarlo.*

*Carlos Marx, (Modificación) de la Tesis 11 sobre Feuerbach.*

## AGRADECIMIENTOS

*Echo en falta en el reglamento de la tesis la posibilidad de plasmar sobre el papel lo que ha significado para mí hacer la tesis, por eso lo iré escribiendo aquí mismo, en los "agradecimientos". "¿Y por qué entre comillas?" Porque es necesaria un poco de ironía en esto de la ciencia, sin humor e ironía difícilmente se puede llegar cuerdo al final del camino.*

*Agradezco a la tesis la posibilidad que me ha dado de aprender, de superarme, de transformar lo imposible en realizable, conocer mundo y gente, de hacer lo que me gusta.*

*"Agradezco" a la tesis el mileurismo, la precariedad, la incertidumbre, las frustraciones, la burrocracia y demás obstáculos de la selección artificial que supone una tesis doctoral en nuestro país.*

*"Agradezco" a la administración todos sus obstáculos, su empeño en que no me licenciara y después que no hiciera esta tesis porque no era válido. Aún así parece que lo he conseguido.*

*En todas las tesis aparece en los agradecimientos el jefe. Pero en muchas, y me consta, la sinceridad no es mucha y el merecimiento aún menos. Ésta no es el caso. Confianza, respeto, sinceridad, honestidad, aprendizaje, interacción, apoyo, complicidad frente a la mediocridad... esto es lo que ha representado mi relación con Cris. Apenas unos años mayor que yo, pero a años luz en ciencia. Ha sido un verdadero placer ser su primer predoc, que no becario.*

*Agradezco a la FJI-Precarios, a Drecerca (muy especialmente a Elena, Bárbara y Noe) y a todos los representantes de predocs del IDIBELL por demostrarme que luchar sí que sirve, que otra ciencia, y por ende, otro*

*mundo es posible. La FJI demuestra que la dignidad, la lucha, el tesón y la excelencia científica pueden ir de la mano. Es más, sin crítica no puede haber ciencia, sin ánimo de progreso tampoco.*

*La FJI durante más de cuatro años me ha enseñado la capacidad de innovación, el corazón, la capacidad de sacrificio, los ideales, las ganas de aprender, etc. de gentes no posicionadas políticamente, sin manuales ni doctrinas. Ellos demuestran que todo es posible.*

*Agradezco muchísimo a mi maestra, la que compensó mi rama anarquista con unas dosis de soviétismo científico, orden, limpieza y disciplina. María, nunca olvidaré lo que me enseñaste, otra cosa es que sea capaz de seguir con esas prácticas y Bakunin no campe a sus anchas por los "benchís" de mi vida. Eso sí, buena parte de esta tesis la debo a ella, sin duda.*

*Hace años me preguntaron por qué hacía biología y no ciencias políticas. Bueno, me lo han preguntado muchas veces. Yo dije que hacía biología para hacer la revolución. Y por qué he hecho la tesis, por lo mismo, para aportar mi granito de arena a esa transformación urgentemente necesaria. Por eso tengo que agradecer a todos esos personajes que me acercaron a la ciencia marxista, con los que maduré, espero no dejarme ninguno: Ale, Jose Juan, Valentín, Carlos Enríquez, Luis Domingo, Varico, David, Manolo Valle, Amanda, etc. Y "agradecer" a todos aquellos que me hicieron alejarme de la rama burro-institucional y más amarilla, y por tanto del positivismo y mecanicismo científico: Manuel, Jorge, Puenteadura, Joseví y un desgraciado y larguísimo etc.*

*Hay gente sin la que me hubiera sido mucho más difícil terminar esto, tirar pa´lante, mis amigos Javi, Matías, Adolfo y Jesús. Javi, Matías y Moha me inspiraron en los últimos días de la carrera, vivir con ellos hizo que sintetizara Biología, ciencia y política en uno.*

*A mi familia, padres y hermano. Sin ellos no habría llegado hasta aquí. Me han dado valor y valores. A veces demasiados...Espíritu de sacrificio, honestidad y seriedad tan necesarios para terminar una carrera en las condiciones en las que lo hice, y ser capaz de mudarme de ciudad sin pensármelo dos veces. Por apoyarme en todo lo que he hecho, en todas las decisiones, y lo seguirán haciendo.*

*Realmente alguien que me hizo muchísimo más fácil volver a empezar fue Mónica. Otro elemento clave en esta tesis y en mi vida.*

*Agradezco a todos aquellas estudiantes (estos sí) de prácticas que han pasado por el laboratorio, especialmente a Marcela. Me han enseñado un poco a enseñar. También a que se puede ser "jefecillo" y no explotar, ridiculizar, acosar ni maltratar como tanto se estilaba en esta profesión.*

*Pero si alguien ha influido enormemente en esta tesis ha sido Silvia. ¡Me ha enseñado tantas cosas! La más importante de todas es que no sólo de ciencia vive el "hombre". Buena parte del trabajo es también suyo, durante meses hemos trabajado y algo más, codo con codo. Silvia es un presente continuo, un gerundio. Me ha descubierto el mundo de las emociones, y de lo necesarias que son para la revolución y la ciencia. Ella me ha hecho ver que mi camino es el correcto, me ha hecho mirar hacia adentro sin tener demasiado miedo al vacío, nadie como ella ha sabido infundirme ánimos y autoestima, aunque también algún cabreo. Su sinceridad y su crítica mordaz son tan necesarias en este mundo de hipocresías, de demostrar más de lo que se es. Silvia no necesita demostrarle a nadie lo que sabe, o lo que no. ¡qué cunda el ejemplo! Gracias, te quiero.*



*También quiero agradecer a María que me ayude a entender quién soy, de dónde vengo y a disfrutar un poco más de la vida.*

*Agradezco a todos los que me acompañaron en mis dos estancias. A Lluís y a Xavi por enseñarme a surfear y no morir en el intento (aunque por poco), a Cintia por su dulzura y compañía en tierras australes. A Guillermo, Amanda, Víctor, Miguel y Mar por todo su cariño y ayuda. Desde luego que sin ellos mi estancia en Memphis hubiera sido una pesadilla, con ellos fue un sueño. Agradezco especialmente a Stephen Tait, Doug, John, Nufi y demás "nativos" que fueron hospitalarios, pacientes, maestros y hasta "chóferes". Ellos no leerán esto.*

*Además de agradecer quiero animar. A todas esas personas que hay a mi alrededor tan especiales y que tienen tantas dificultades. Mireia, Eder, Violeta, Diana, Laia, Olga, Joana y un desgraciado etc. Sufren el mundo de la irracionalidad dentro del "racionalismo científico". Sufren la mediocridad dentro de la "excelencia". Años de experiencia por fin me han hecho entender que el ejemplo no cambia conciencias, pero sí terminar una tesis en menos de 4 años, gracias a Cristina, puede servir para al menos despertar un pequeñísimo remordimiento en la almohada, bienvenido sea. ¡difundida sea la buena nueva!*

*Con la excelencia no sé, pero **nuestra** tesis (no es sólo mía), demuestra que la calidad no está reñida con el bienestar. Creo sinceramente que hemos hecho un buen trabajo, que Cristina tendrá un futuro duro, pero algún día este sistema científico de m..... le permitirá situarse donde le toca.*

*Espero no dejarme a nadie, pero ¡son tantas personas las que han hecho esto posible!*



*“Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas”. Einstein.*

## **ÍNDICE:**

I. <b>ABREVIATURAS</b> .....	5
II. <b>RESUMEN</b> .....	7
III. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1 <b>METABOLISMO Y CÁNCER</b> .....	11
1. <b>METABOLISMO ENERGÉTICO</b> .....	11
• Glucosa:.....	11
• Glutamina (Gln):.....	14
• Adaptaciones a la escasez de nutrientes .....	15
2. <b>AUTOFAGIA</b> .....	19
2.1. <b>REGULACIÓN Y MECANISMOS</b> .....	21
2.2. <b>DETECCIÓN DE LA AUTOFAGIA</b> .....	23
3. <b>MUERTE CELULAR</b> .....	25
3.1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	25
3.2. <b>APOPTOSIS</b> .....	27
3.3. <b>CASPASAS</b> .....	29
• <b>CASPASAS INICIADORAS:</b> .....	31
• <b>CASPASAS EFECTORAS:</b> .....	33
3.4. <b>MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS</b> .....	33
3.4.1. <b>RUTA EXTRÍNSECA - REGULACIÓN</b> .....	34
a) <b>RECEPTORES DE MUERTE</b> .....	34
b) <b>CASPASA-8</b> .....	38
c) <b>DIFERENCIAS ENTRE APOPTOSIS TIPO I Y II</b> .....	41
d) <b>SENSIBILIZACIÓN A LA VÍA EXTRÍNSECA</b> .....	42
3.4.2. <b>VÍA INTRÍNSECA - REGULACIÓN</b> .....	46
3.4.3. <b>PERFORINA – GRANZIMA</b> .....	49
3.5. <b>APOPTOSIS INDUCIDA POR ESCASEZ DE NUTRIENTES</b> .....	49

3.6. APOPTOSIS Y AUTOFAGIA .....	53
3.7. NECROSIS.....	55
3.7.1.  NECROPTOSIS.....	56
4.  MUERTE CELULAR Y CÁNCER .....	57
IV. <b>OBJETIVOS</b> .....	59
V. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	61
1  MATERIALES .....	61
1.1.  LÍNEAS CELULARES .....	61
1.2.  REACTIVOS.....	61
2.  METODOLOGÍA.....	69
2.1.  CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS .....	69
2.2.  TRANSFECCIONES TRANSITORIAS .....	69
Disminución de los niveles de proteína mediante ARN de interferencia.....	69
Expresión de ADN exógeno. ....	70
2.3.  TRANSFECCIONES ESTABLES. ....	70
Retrovirus: .....	70
•  Expresión de proteínas.....	<b>70</b>
•  Disminución de los niveles de proteína mediante ARN de interferencia.....	71
Transfecciones estables por selección. ....	71
2.4.  MEDICIÓN DE LA MUERTE CELULAR: .....	71
2.4.1.  MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD POR CRISTAL VIOLETA. ....	72
2.4.2.  DETECCIÓN DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO: .....	72
2.4.3.  ACTIVIDAD CASPASA-3.....	74
2.5.  WESTERN BLOT: .....	75
2.6.  RT-PCR: .....	76
2.7.  MICROSCOPÍA. ....	76

<b>VI. RESULTADOS</b> .....	79
1. LAS CÉLULAS DEFICIENTES EN BAX Y BAK SON SENSIBLES A DIFERENTES TRATAMIENTOS.....	79
ANTECEDENTES.....	79
2. LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA PUEDE INDUCIR APOPTOSIS O NECROSIS DEPENDIENDO DE LA LÍNEA CELULAR.....	81
3. LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA INDUCE ACTIVIDAD CASPASA EN FIBROBLASTOS MURINOS INMORTALIZADOS.....	85
4. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA EN CÉLULAS DKO TIENE UN FENOTIPO ATÍPICO.....	88
5. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE GLUCOSA ES INDEPENDIENTE DE LA VÍA INTRÍNSECA .....	91
5.1. La apoptosis inducida por privación de glucosa en fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak no es dependiente de la ruta mitocondrial.....	91
5.2. Fibroblastos murinos sobre-expresando establemente Bcl-2 mueren por apoptosis tras privarlos de glucosa. ....	93
5.3. Líneas celulares que sobre-expresan Bcl-xL mueren en ausencia de glucosa.....	94
6. LA CASPASA INICIADORA DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE GLUCOSA ES LA CASPASA-8 .....	97
6.1. La proteína viral CrmA protege de la retirada de glucosa. ....	97
6.2. La reducción de los niveles de caspasa-8 protege de la privación de glucosa.....	98
7. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE GLUCOSA ES INDEPENDIENTE DE LA INTERACCIÓN DE LOS LIGANDOS DE MUERTE CON SUS RECEPTORES.....	101
7.1. La muerte inducida por privación de glucosa en DKO no está mediada por TNF.....	101
7.2. La muerte inducida por privación de glucosa en células DKO no es mediada por FasL. ....	104

7.3. TRAIL tampoco está implicado en la muerte por privación de glucosa en células DKO.....	105
<b>8. LOS COMPONENTES DEL DISC NO SON NECESARIOS PARA LA MUERTE POR PRIVACIÓN DE GLUCOSA .....</b>	<b>107</b>
8.1. La sobreexpresión de c-FLIPL no protege de la privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak.....	107
8.2. Estudio de la implicación de FADD en la muerte por privación de glucosa.....	109
8.3. No hay sinergismo entre la falta de cIAP1 y la muerte inducida por privación de glucosa.....	111
8.4. RIPK1 no está implicado en la apoptosis inducida por privación de glucosa.....	113
<b>9. METABOLISMO Y MUERTE .....</b>	<b>116</b>
9.1. La privación de glucosa induce agregación de GFP-LC3.....	116
9.2. La 3-metiladenina reduce significativamente el porcentaje de células hipodiploides.....	118
9.3. Fibroblastos murinos deficientes en ATG7 son más resistentes a la privación de glucosa que células que la expresan. ....	119
9.4. La cloroquina no altera el porcentaje de apoptosis inducida por privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak. ....	121
9.5. No se observan membranas de autofagosomas por microscopía electrónica tras la privación de glucosa. ....	122
9.6. A pesar de acumularse, la proteína p62 no está implicada en la muerte inducida por privación de glucosa.....	124
<b>VII. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>127</b>
1. LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA INDUCE APOPTOSIS O NECROSIS DEPENDIENDO DE LA LÍNEA CELULAR.....	127
2. LA CASPASA INICIADORA ES LA CASPASA-8 PERO INDEPENDIEMENTE DE LA VÍA CLÁSICA DE RECEPTORES DE MUERTE ..	132
3. METABOLISMO Y MUERTE CELULAR.....	137
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>IX. REFERENCIAS .....</b>	<b>143</b>

# I. ABREVIATURAS

3-MA: 3-Metiladenina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AICAR: 5-amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleósido.

AMP: Adenosina monofosfato.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

Atg: Genes relacionados con autofagia (*del inglés*, Autophagy-related genes)

ATP: Adenosín trifosfato.

BH: Dominio de homología a Bcl-2 (*del inglés*, Bcl-2 homology domain)

BIR: (*del inglés*, Baculoviral IAP repeat)

CARD: Dominios de reclutamiento y activación de caspasas (*del inglés*, Caspase activation and recruitment domain)

CHX: Cicloheximida.

DAPI: Diaminofenilindol.

DD: Dominio de muerte (*del inglés*, Death domain)

DED: Dominio efector de muerte (*del inglés*, Death effector domain)

DISC: Complejo inductor de muerte (*del inglés*, Death-inducing signaling complex)

DKO: Doble Knock out. Hace referencia a las células deficientes en Bax y Bak.

DMEM: (*del inglés*, Dubelco's modified Eagle's medium)

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNA: ADN (*del inglés*, Deoxyribonucleic acid)

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

EDTA: Etilendiaminetetraacetato.

EM: Microscopía electrónica (*del inglés*, Electron microscopy)

FACS: Citometría de flujo (*del inglés*, Fluorescence activated cell sorting)

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

GFP: Proteína fluorescente verde (*del inglés*, Green fluorescent protein)

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



IFN: Interferón

LDH: Lactato deshidrogenasa.

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón (*del inglés*, Murine embryonic fibroblasts)

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

MPT: Transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (*del inglés*, Mitochondrial membrane permeability transition)

NK: (*del inglés*, Natural killer)

PBS: Solución salina fosfato (*del inglés*, Phosphate-buffered saline)

PE: Fosfatidiletanolamina (*del inglés*, Phosphatidylethanolamine)

PI: Yoduro de propidio (*del inglés*, Propidium iodide)

PMM: Potencial de membrana mitocondrial.

PS: Fosfatidilserina (*del inglés*, Phosphatidylserine)

PTP: Poro transitorio de permeabilidad.

PVDF: (*del inglés*, Polyvinylidene difluoride)

RE: Retículo endoplásmico o endoplasmático

RING: (*del inglés*, Really interesting new gene)

RNA: ARN (*del inglés*, Ribonucleic acid)

Rnase: Ribonucleasa.

ROS: Especies reactivas de oxígeno (*del inglés*, Reactive Oxygen Species)

RT-PCR: Transcripción reversa de ARN y amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (*del inglés*, Reverse transcriptase polymerase chain reaction)

SDS: Sodium dodecyl sulfate.

shRNA: (*del inglés*, Short hairpin RNA).

siRNA: ARN de interferencia (*del inglés*, Small interfering RNA).

SV40: (*del inglés*, Simian vacuolating virus 40).

TAE: Tris acetato EDTA.

TBS: Solución salina de Tris (*del inglés*, Tris-buffered saline)

TCR: Receptor de células T (*del inglés*, T-cell receptor)

TE: Tris EDTA.

TEMED: Tetrametiletileno diamina (*del inglés*, N-N'-N'-Tetramethylethylene diamine)

TRIS: (*del inglés*, Trishydroxymethylaminomethane)

WT: Fenotipo silvestre (*del inglés* Wild Type).

z-VAD-fmk: (*del inglés*, Z-Val-Ala-Ala-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone)

## II. RESUMEN

La apoptosis es una forma de muerte controlada por unas proteasas llamadas caspasas. La activación de las caspasas lleva a la desintegración controlada de la célula y a su fagocitación por parte de macrófagos. De esta manera, se evita la salida de material citoplasmático al medio extracelular, lo que evita la inflamación. Sin embargo, la necrosis es una forma de muerte que no depende de caspasas, pero que sí que puede tener un control y ser homeostático. La necrosis sí que genera una extravasación del material intracelular al exterior.

Buena parte de los tumores presentan la característica de tener un metabolismo glicolítico superior al de la mayoría de los tejidos. Además, esta gran dependencia en la glucosa hace a las células bastante sensibles tanto a su ausencia como a la inhibición del metabolismo glicolítico. Esta característica es usada tanto en diagnóstico como en tratamientos en pruebas: la 2-deoxiglucosa se está utilizando en ensayos clínicos. Sin embargo se sabe poco de cómo la inhibición del metabolismo de la glucosa mata a las células.

Otra característica de las células tumorales es la de ser resistentes a muchos inductores de muerte, tanto de apoptosis como de necrosis. Estas células han tenido que escapar de los mecanismos fisiológicos de control anti-neoplásico del organismo: tanto los controles intracelulares (inducción de apoptosis), como sistémicos (sistema inmunológico). Además, muchos tumores sólidos pueden sufrir ambientes con escasez de nutrientes. Se da la coincidencia de que muchos oncogenes están a su vez relacionados con el metabolismo.

En células sanas, en general, los ambientes con escasez de nutrientes llevan a la inducción de proteínas BH3 y a la bajada de los niveles de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 que desencadenan apoptosis por la vía mitocondrial o intrínseca. Sin embargo, muchos tumores tienen bloqueada esta vía de activación de apoptosis, lo que, como decía más arriba, les hace ser resistentes a diversos ambientes estresantes.

Todos estos datos hacen interesante el estudio del efecto de la privación de glucosa sobre varios tipos celulares. Por un lado, caracterizar los efectos de la privación de glucosa en células que tienen bloqueada la vía mitocondrial de la apoptosis al ser deficientes en las proteínas Bax y Bak (DKO). Por otro, estudiar los efectos de la privación de glucosa en células tumorales humanas.

Dentro de esta caracterización, es importante averiguar si se mueren por apoptosis o necrosis. Qué elementos reguladores están implicados, protectores o sensibilizadores. Si es apoptosis, y la muerte depende de caspasas, averiguar qué caspasas son las iniciadoras y cómo se están activando. Y cuál es el papel del metabolismo en general y de la autofagia en particular en esta muerte.

En esta tesis se muestra cómo la privación de glucosa induce actividad caspasa en células deficientes en Bax y Bak. Y que esta actividad caspasa es dependiente de la caspasa iniciadora 8. La caspasa-8 es la caspasa responsable de la activación de la ruta extrínseca de la apoptosis.

Aquí enseñamos que la apoptosis inducida por la privación de glucosa en células DKO induce actividad caspasa, degradación del ADN, condensación atípica de la cromatina, externalización de la fosfatidilserina y demás rasgos típicos de apoptosis como el corte de sustratos específicos de caspasas. Todo esto, excepto la condensación de la cromatina es inhibido por inhibidores de caspasas. Nosotros hemos demostrado que la privación de glucosa no induce apoptosis al sensibilizar a la célula a los ligandos de muerte, sino que es independiente de la interacción de ligandos y receptores de muerte. Asimismo, hemos demostrado que la activación de caspasa-8 no se inhibe por FLIP, y probablemente FADD no es la molécula adaptadora o reclutadora de caspasa-8. Aunque esto último necesita de confirmación.

Hemos intentado ver si otros mecanismos de activación de la caspasa-8 que han sido publicados en los últimos años podrían ser la causa. Ni p62, ni FLIP están implicados en la muerte inducida por privación de glucosa. Un posible reclutamiento de la caspasa-8 al complejo formado por RIPK1 no es el responsable, ni tampoco la actividad kinasa de RIPK1 ya que la necrostatina no protege de la muerte.

El estudio del papel de la autofagia da resultados contradictorios. Por un lado, la autofagia sería un proceso que sensibilizaría a las células a la privación de glucosa, ya que la 3-metil-adenina protege, y las células deficientes en Atg7 están también protegidas. Pero por otro lado, la autofagia no tendría un papel importante, porque la presencia de cloroquina no afecta a la privación de glucosa. Aunque no hemos podido clarificar ni siquiera si se está induciendo autofagia, o si esta al menos se resuelve completamente. A pesar de que vemos acúmulos de GFP-LC3 por microscopía confocal, no vemos vesículas con doble

membrana al microscopio electrónico ni desaparición de p62. Más bien al contrario, la privación de glucosa induce una acumulación de p62, que como se decía más arriba no parece ser la causa de la activación de la caspasa-8..

Por último indicar que la caspasa-8 también está implicada en la muerte por privación de glucosa en las células HeLa, que mueren de forma dependiente de caspasas. Pero que otras líneas celulares, por ejemplo las células de rhabdomyosarcoma (RH30) o las de tumor de mama (MCF7) sufren necrosis tras la privación de glucosa.



# III. INTRODUCCIÓN

## 1 METABOLISMO Y CÁNCER

### 1. METABOLISMO ENERGÉTICO

Todos los organismos vivos son sistemas abiertos que necesitan un constante flujo de elementos del exterior, incluidos nutrientes, y necesitan librarse de los deshechos de su metabolismo.

Para evitar la necesidad de disponer continuamente de nutrientes, los organismos desarrollan mecanismos de almacenamiento tisular y celular.

¿Pero cuáles son los principales nutrientes con los que las células obtienen el ATP? A nuestra mente viene en seguida la glucosa como principal fuente de energía de la mayor parte de los seres vivos. Pero si se mira con detenimiento, en muchos tipos celulares y especialmente en tumores, la glutamina puede ser la principal fuente de energía y nitrógeno de las células (DeBerardinis and Cheng 2009). En cualquier caso, la glucosa es uno de los nutrientes esenciales de la mayoría de los seres vivos, tanto para la producción de ATP, como para su transformación en otros nutrientes esenciales como ácidos grasos.

- Glucosa:

La glicolisis es la ruta metabólica que convierte la glucosa en piruvato. Es común a la mayoría de los seres vivos con ligeras variaciones. Y el que una célula utilice la glicolisis es independientemente de su estado oxidativo. La primera parte es común a la ruta anaeróbica y aeróbica. La glucosa es convertida en piruvato, con la producción de 2 ATPs. En condiciones anaeróbicas, el piruvato será transformado en ácido láctico o etanol (glicolisis anaeróbica); mientras que en condiciones aeróbicas el piruvato es convertido en acetil-coA (acetil coenzima A) por la piruvato deshidrogenasa. Este acetil-coA entra en el ciclo de las pentosas fosfato (ciclo de Krebs), donde se producen 34 moléculas de ATP por acetil-coA. La conversión anaeróbica del piruvato en etanol o lactato es mucho menos eficiente en la producción de ATPs.

En condiciones normales, en organismos aeróbicos, conviven ambos sistemas, con un peso importante de la ruta oxidativa de la mitocondria. En situaciones de baja presión de oxígeno, por ejemplo

en los músculos de los velocistas, las células musculares tienen la capacidad de virar rápidamente su producción de ATP hacia la glicolisis anaeróbica, con la consecuente producción de lactato.

**Efecto Warburg: realidad o fantasía.** Hace más de 80 años que Warburg describió que las células tumorales tienden a utilizar mucha más glucosa que los tejidos sanos (Warburg, Wind et al. 1927). Se conoce como efecto Warburg el que los tumores utilicen preferencialmente la ruta anaeróbica de la glicolisis en vez de la ruta oxidativa. Esto ocurre incluso en ambientes con alta presión de oxígeno como en tumores sanguíneos.

Hoy día el efecto Warburg se utiliza como un marcador del cáncer, llegándose a utilizar para diagnóstico clínico. El PET (tomografía de emisión de positrones), utiliza la 2-[18F] fluoro-2-desoxi-D-glucosa, que preferencialmente va a células con un alto requerimiento de glucosa, de manera que los tumores son así fácilmente detectables.

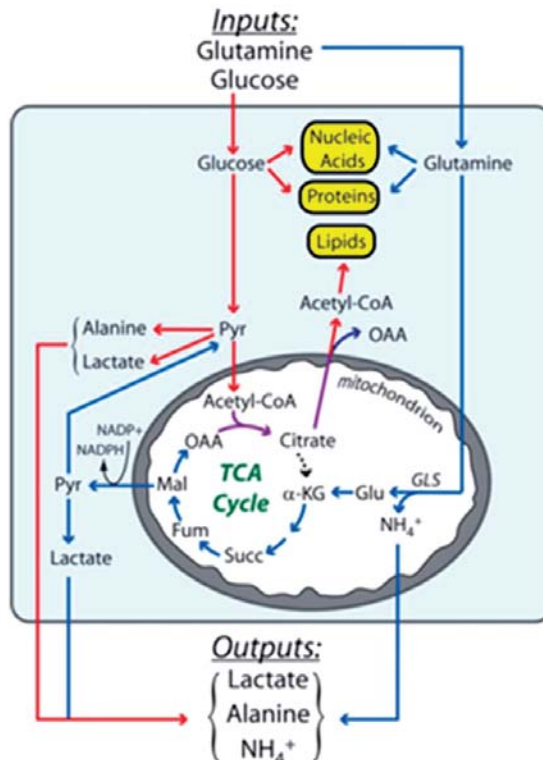
Pero como decíamos, la glicolisis anaeróbica es energéticamente ineficiente. ¿Entonces por qué los tumores la utilizan produciendo gran cantidad de lactato? ¿Utilizan la glicolisis únicamente para la producción de ATP?

Realmente, las células tumorales todavía mantienen un grado de fosforilación oxidativa que es variable entre tumores. Y la contribución de la glicolisis al ATP celular puede ir de un 50% como describió Warburg a menos de un 5% en otras líneas tumorales (DeBerardinis and Cheng 2009).

Además, no todos los tumores son “PET- positivos”, ni todas las transformaciones neoplásicas están asociadas con un incremento de la glicolisis anaeróbica. De hecho, hay tumores con una función mitocondrial aumentada.

Para algunos investigadores como Craig Thompson, la transformación neoplásica lleva asociada necesariamente el cambio metabólico a glicolisis anaeróbica. Según otros, es un “epifenómeno” de la transformación más que una causa (Garber 2004).

Lo que parece estar claro es que no es la adaptación a ambientes hipóxicos lo que hace que una célula sea glicolítica, ya que tumores sanguíneos o pulmonares siguen siendo glicolíticos y crecen en ambientes muy oxigenados.



**Figura 1: Rutas de metabolización de la glucosa y la glutamina.**  
(DeBerardinis and Cheng 2009)

Difícilmente se puede explicar la causa del efecto Warburg por una cuestión de demanda energética o porque los tumores sufran hipoxia. Probablemente es el hecho de que en la glicolisis, en la primera parte, no sólo se produce ATP y NADH, sino piruvato, que es un intermediario necesario para la producción de esqueletos carbonados: ácidos grasos, nucleótidos y glúcidos. Imprescindibles para una célula en rápido crecimiento como las tumorales, más que el ATP. Pero los intermediarios de esos elementos se producen en el ciclo de los carbonos, en la mitocondria (Figura 1). Por tanto, aunque la célula sea glicolítica, es imprescindible que el ciclo de los carbonos siga funcionando (DeBerardinis and Cheng 2009).

Según el Dr. C. Thompson (Jones and Thompson 2009), una serie de mutaciones desregulan la ingesta de nutrientes por parte de la célula, que la hace más autónoma al medio, y facilita su transformación neoplásica.

Muchos oncogenes están relacionados con el metabolismo. Por ejemplo, c-Myc actúa como un oncogén. Ya en 1997 se vio que la



lactato deshidrogenasa (LDH) era regulada por c-Myc (Dang and Lewis 1997). La enzima LDH está implicada en la glicolisis anaeróbica.

De todas maneras el que las células tumorales tengan incrementada hasta 200 veces la glicolisis anaeróbica sea una causa o consecuencia de la transformación no resta importancia al hecho de que este “efecto Warburg” hace a estas células más sensibles a la inhibición del metabolismo glicolítico.

Y es que esta característica no se usa sólo para el diagnóstico, sino que en la actualidad se está utilizando con éxito el inhibidor 2-deoxiglucosa que está en fase clínica (Raez, Langmuir et al. 2007). La 2-deoxiglucosa es fosforilada por la hexoquinasa a la que queda unida, bloqueándola. De esta forma la 2-deoxiglucosa reduce el ATP intracelular (Zhong, Xiong et al. 2009) e inhibe la proliferación celular (Kang and Hwang 2006).

Pero la glucosa no sólo es utilizada como fuente energética o de “materia prima”, sino que es necesaria para la modificación post-traduccional de proteínas, la glicosilación. Por lo que la 2-deoxiglucosa induce estrés del retículo endoplásmico por acumulación de células no glicosiladas debido a la falta de glucosa-6P (Kang and Hwang 2006).

Pero faltan piezas en el puzle. No se puede entender el metabolismo energético y biosintético de las células en crecimiento sin tener en cuenta que mientras que el reemplazamiento de acetil-coA viene de la glicolisis, la mayor parte del reemplazamiento (anapleurosis) del oxalacetato es producto de la glutaminólisis.

No está claro entonces por qué esa gran dependencia de las células tumorales por la glucosa, y lo que es más interesante, por qué son especialmente sensibles a su falta. ¿Es el efecto Warburg causa o consecuencia? ¿Realmente la mayoría de los tumores tienen bloqueada la ruta de los carbonos mitocondrial?

Otros elementos han resurgido también como importantes tanto en el metabolismo energético como anabólico, la Glutamina.

- Glutamina (Gln):

Aunque la Gln contribuye sólo al 4% de la masa muscular, supone el 20% de los aminoácidos de la sangre.

La Gln es utilizada para síntesis de nucleótidos o para reacciones de glicosilación por un lado, o para la producción de glutamato. El

glutamato es un elemento escaso en la sangre y muy necesario para células proliferantes, por ello los tumores tienen mucha actividad glutaminasa, que convierte la Gln en glutamato. Este es utilizado para la producción de glutathione, antioxidante imprescindible, que permite a las células tumorales resistir al estrés oxidativo derivado del intenso metabolismo. El glutamato es también utilizado como un sustrato de la respiración. La oxidación del esqueleto carbonado del glutamato, que pasa a convertirse en  $\alpha$ -cetoglutarato, es uno de las principales fuentes de energía para células proliferando, incluidas no sólo células tumorales, sino linfocitos, enterocitos, fibroblastos, etc. (DeBerardinis and Cheng 2009) .

Sin embargo, parece que en células tumorales en proliferación, el uso de la glutamina, al igual que el de la glucosa parece ser también ineficiente. Buena parte del nitrógeno y el esqueleto carbonado es liberado sin metabolizar completamente, lo que podría ser otra marca de los tumores, al igual que el efecto Warburg (DeBerardinis and Cheng 2009).

Pero la glutamina también se utiliza como un mecanismo de señalización celular, por ejemplo en glioma. Las células gliales secretan glutamato, y el grado de secreción es proporcional a su capacidad de crecimiento (DeBerardinis and Cheng 2009).

Receptores del glutamato (mGLUR) expresados en las células del glioma activan PI3K induciendo proliferación y supervivencia.

- Adaptaciones a la escasez de nutrientes

Los organismos vivos están continuamente sujetos a periodos de escasez en la naturaleza. La disponibilidad de nutrientes determina la expansión de especies y la colonización de nuevos nichos. Los nutrientes también dictan el momento de la reproducción, de la esporulación, hibernación o diferenciación, desde organismos fotosintéticos unicelulares a mamíferos. Nuestra especie sufre periodos de escasez nutricional que pueden ser temporales en el recién nacido o durante el sueño, o persistentes debido a la escasez de comida disponible en el entorno. Nuestro desarrollo como especie viene marcado en buena medida por la escasez de nutrientes. Tanto a nivel cultural como metabólico. Incluso el ayuno forma parte de numerosas terapias.

También las células y los tejidos sufren privación de nutrientes, por ejemplo en situaciones patológicas como la isquemia, donde hay escasez de nutrientes y oxígeno. Las células tumorales también suelen sufrir escasez debido a que los tumores suelen crecer más rápido que los vasos sanguíneos. Esto lleva a menudo a la formación de “centros necróticos”, que son áreas del tumor con gran cantidad de células muertas debido a la falta de irrigación sanguínea.

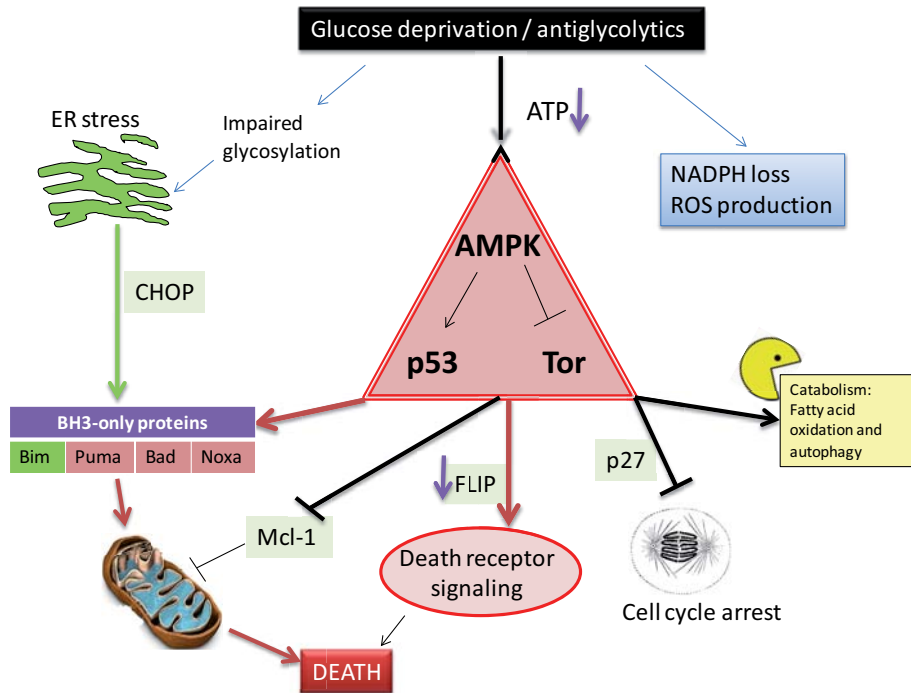
Mientras que los organismos unicelulares han desarrollado formas de resistencia para sobrevivir a los periodos de escasez, los animales utilizan hormonas para movilizar las reservas energéticas. A nivel celular, la escasez de nutrientes provoca diferentes respuestas dependiendo del tejido. Estas respuestas generalmente llevan a la movilización de nutrientes almacenados y a la adaptación a esa reducción en la cantidad de nutrientes. Cuando esa escasez es aguda o crónica lleva a la muerte de la célula. Pero en un primer momento la célula responde parando todo su metabolismo anabólico: disminución de la síntesis de proteínas, y ribosomas o parada del ciclo celular. Y un aumento en la expresión de genes relacionados con la absorción y con el catabolismo: transportadores de membrana, inducción de autofagia, etc.

Las respuestas son más complejas debido a que los aminoácidos, la glucosa y los ácidos grasos son, además de nutrientes energéticos, fuentes de esqueletos carbonados para la síntesis de estructuras celulares.

La principal manera en la que la célula detecta escasez es a través del ATP y los aminoácidos. De esa manera se está detectando escasez energética o nutricional. La célula, ante la escasez, lo primero que hace es adaptarse a ella, reduciendo el gasto e intentando aumentar la absorción y la degradación del esqueleto de la célula que ha servido como estructura pero que puede convertirse en energía.

La falta de energía (ATP) es detectada por la célula a través de la activación de la AMPK (proteín quinasa activada por AMP) (Hardie 2007). Es una proteína que forma un complejo trimérico, con actividad quinasa, que es activado alostéricamente por el ratio AMP/ATP. La activación de la AMPK permite a la célula reaccionar a la falta de ATP regulando procesos como el transporte de glucosa (incrementando la expresión del transportador de glucosa GLUT4). La AMPK también regula la transcripción, por ejemplo inhibiendo los genes implicados en

biosíntesis. Bajos niveles de ATP y la activación de AMPK también inhiben la proliferación celular a través de la activación de p53 y la estabilización de p27 (Jones and Thompson 2009), (Liang, Shao et al. 2007).



**Figura 2: La inhibición del metabolismo de la glucosa induce diferentes respuestas en las células.**

El AMP se une a la subunidad gamma de la AMPK, que es donde está la actividad quinasa. Hay algunas proteínas que parecen actuar por encima de AMPK. Una de ellas, LKB1, es una quinasa considerada un supresor de tumores que está mutado en el síndrome de "Peutz-Jeghers". LKB1 actuaría como activadora de AMPK aunque siempre junto a la señal de AMP (Hardie 2007).

Otro elemento clave para el mantenimiento de la homeostasis nutricional de la célula es TORC1. En mamíferos es un complejo multiprotéico que contiene mTOR, acrónimo en inglés de "diana de la rapamicina en mamíferos". Es activado por hormonas y factores de crecimiento, y también se activa con la presencia de aminoácidos. Aunque no se sabe si los aminoácidos activan mTOR directa o indirectamente. Algunas proteínas que parecen tener un rol en la

activación de mTOR son MAP4K3 y Rag A y B (Wang and Proud 2009).

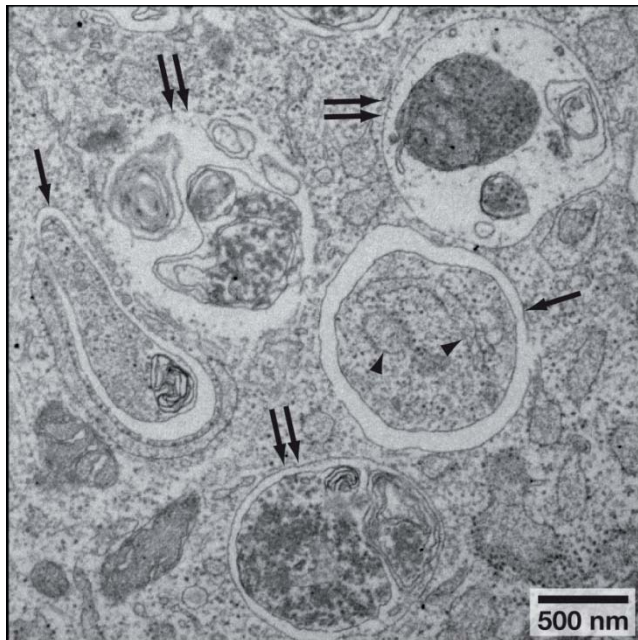
No se conocen a fondo los mecanismos de activación de mTOR por falta de aminoácidos, pero en definitiva su activación por el aminoácido leucina induce proliferación celular y síntesis proteica. La glutamina también es un aminoácido esencial para la activación de mTOR. Esto es especialmente importante en tumores, ya que el alto flujo de Gln activa mTOR que induce proliferación.

Por tanto, estos son los dos elementos claves que la célula utiliza para sentir su estado nutricional y energético. Cuando los nutrientes son abundantes, la célula se activa e induce proliferación o anabolismo según el tipo celular. Cuando, al contrario, los nutrientes escasean, mTOR se inactiva, y AMPK se activa induciendo en un principio mecanismos de adaptación como parada del ciclo celular, inducción de catabolismo y autofagia, esperando tiempos mejores.

Si esta escasez se hace crónica, la célula terminará muriendo. Esto sigue siendo un mecanismo adaptativo, que en determinados tejidos puede ser una medida “desesperada” como en músculo cardíaco, o adaptativa y “beneficiosa” para el resto del organismo, como la atrofia muscular.

## 2. AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso homeostático fundamental para las células eucariotas. Permite a las células degradar orgánulos y componentes dañados, y transformarlos, reciclándolos, en elementos esenciales. Es un proceso catabólico por el que la célula consigue principalmente aminoácidos y renovación de estructuras. Por autofagia entendemos cualquier proceso celular por el que contenido citoplasmático es de una u otra forma digerido en el interior de lisosomas.



**Figura 3: Los autofagosomas poseen dobles membranas. Fotografía de microscopio electrónico. De Mizushima et al. (Mizushima, Yoshimori et al. 2010)**

Las células eucariotas tienen dos mecanismos principales de degradación de proteínas: el proteosoma y los lisosomas. El proteosoma es un complejo de proteasas multicatalítico que degrada la mayoría de las proteínas endógenas mal plegadas, dañadas o inservibles, para mantener una función celular normal. Este mecanismo de degradación juega un papel importante en múltiples procesos como progresión del ciclo celular, proliferación, apoptosis o angiogénesis.

El segundo mecanismo de degradación, mediado por lisosomas, degrada proteínas extracelulares internalizadas por endocitosis, fagocitosis o pinocitosis. Pero también degradan componentes citoplasmáticos intracelulares que provienen de autofagia.

La autofagia realmente engloba muchos procesos: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia o macroautofagia.

La diferencia entre micro y macroautofagia radica en que en la microautofagia el lisosoma engloba directamente el contenido citoplásmico a degradar (Kunz, Schwarz et al. 2004). Sin embargo, la macroautofagia implica la formación de vesículas de doble membrana citosólicas, que secuestran contenido del citoplasma y lo degradan tras fusionarse con lisosomas (Levine and Kroemer 2008). A diferencia de otras vesículas, los autofagosomas tienen doble membrana con un tamaño de entre 300 y 900 nm. y son sintetizadas "de novo" en el citoplasma.

Mientras que el proteosoma principalmente degrada de manera específica proteínas de vida media corta, la autofagia es el mecanismo catabólico por el que las células degradan proteínas de vida media larga, otras macromoléculas e incluso orgánulos (Mortimore and Poso 1987).

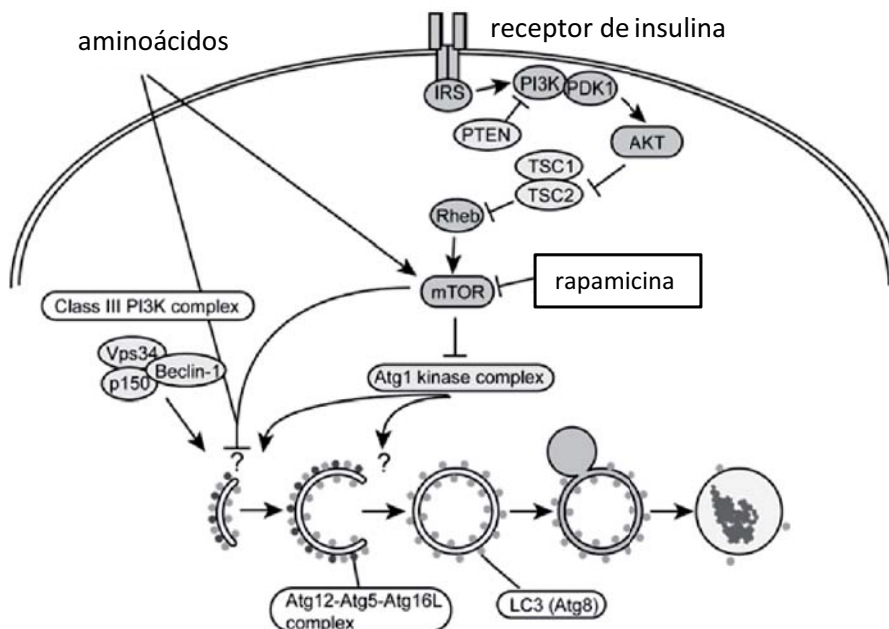
Al principio se pensaba que la autofagia era un proceso de degradación citoplasmática aleatorio, sin especificidad. Sin embargo, es un proceso muy controlado y bastante específico. Por ejemplo, la degradación de proteínas ubiquitiniladas a través de SQSTM1/p62 (Kirkin, McEwan et al. 2009). El proteosoma tiene el problema de que no es eficiente degradando grandes complejos proteicos. Sin embargo, la autofagia, a través de este complejo SQSTM1/p62, puede degradar desde complejos proteicos "marcados" hasta orgánulos o incluso microorganismos (Kirkin, McEwan et al. 2009). En células y tejidos deficientes en autofagia se ha visto que se induce la formación de inclusiones de proteínas ubiquitiniladas. El silenciamiento de p62 lleva a la desaparición de esas inclusiones. Además, p62 se ha identificado como un substrato específico que es degradado a través de la ruta autofágica (Komatsu and Ichimura). Esto sucede debido a que interacciona con LC3 en la membrana del autofagosoma. Cuando la autofagia está inhibida, p62 se acumula. De hecho su acumulación parece ser la responsable de algunas de las patologías derivadas de la inhibición de la autofagia. A su vez p62 funciona como un

transportador de proteínas ubiquitiniladas a los autofagosomas (Komatsu and Ichimura).

La autofagia sirve como una respuesta común al estrés extracelular (hipoxia, altas temperaturas, falta de nutrientes) e intracelular (daño de orgánulos), permitiendo a los organismos eucariotas sobrevivir bajo estas condiciones mediante el reciclado.

Es evidente que un proceso catabólico como este debe estar limitado, no puede ser crónico. Si la señal que lo induce no revierte, la degradación masiva de orgánulos, especialmente mitocondrias (mitofagia) llevaría a que la autofagia en vez de ser protectora sea perjudicial. La célula se encontraría con materias primas pero sin fábricas para transformarlas en energía. De hecho su desregulación es causa de varias enfermedades como cáncer, cardiomiopatías, enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (Levine and Kroemer 2008).

## 2.1. REGULACIÓN Y MECANISMOS



**Figura 4: Esquemmatización de la ruta molecular de la autofagia.**

Como decía, la autofagia es un proceso homeostático, por lo que ocurre constantemente en la célula. Existe una autofagia basal. Sin embargo, este proceso se regula rápidamente cuando las células



necesitan nutrientes, en periodos de escasez, por ejemplo en ambientes con una baja concentración de aminoácidos (Sato, Tsuchihara et al. 2007). También cuando hay disminución de factores de crecimiento (Lum, Bauer et al. 2005) y cuando se produce una acumulación de componentes citoplasmáticos dañados en la célula (orgánulos dañados o formación de agregados de proteínas que se acumulan en la célula). En estos casos, el proceso se conoce como “autofagia inducida”. Además, tras una infección (Kirkegaard, Taylor et al. 2004) o durante otros tipos de estrés las células también aumentan los niveles de autofagia.

La autofagia es fuertemente inhibida por la quinasa mTOR, parece ser que hiper-fosforilando a Atg13 se impide la formación del complejo Atg1, necesario para la formación del autofagosoma. También lo puede hacer inhibiendo eEF2 (Kamada, Funakoshi et al. 2000). Aunque se ha sugerido que se puede inducir autofagia independientemente de mTOR (Mordier, Deval et al. 2000), (Kochl, Hu et al. 2006).

Y las señales de PI3K/AKT, que responden a receptores tirosín quinasa, activan a TOR. Por tanto, la insulina, los aminoácidos y factores de crecimiento activan a TOR, inhibiendo la autofagia y activando la síntesis de proteínas a través de la activación de la proteína quinasa p70S6K, entre otras funciones.

Por otro lado existen varios elementos que la inactivan: AMPK, eIF2a que responde a privación de nutrientes, ARN de doble cadena, estrés del retículo endoplásmico, p53 y un largo etcétera (Levine and Kroemer 2008).

Hasta ahora se han descrito unas 30 proteínas relacionadas con la autofagia, la mayoría nombradas Atg. Estas proteínas tienen diversas funciones, desde implicadas en el sistema de conjugación de ubiquitinas, sistema de lipidación, proteínas quinasa o complejos PI3K específicos de autofagia (Hamasaki and Yoshimori).

Todo empieza con un centro reclutador, son estructuras “pre-autofagosoma” o fagóforos. Lo que no está claro es cómo se sintetiza la doble membrana, sobre todo en un momento de parada en la síntesis de nuevas estructuras y es difícil estudiar si esas membranas provienen de otras estructuras como Golgi o retículo endoplásmico. Existen estudios que indican ambas estructuras como las responsables. Una de las proteínas esenciales en este fagóforo es Atg14L, que recluta a Atg16L o LC3 a la incipiente membrana.

Un paso fundamental es la unión covalente de fosfatidiletanolamina a LC3, formándose LC3-II. Esta unión es catalizada por una cascada de reacciones implicando a varias proteínas Atg: 7, 3 y 12-5. Este LC3-II, localizado en las membranas del autofagosoma y esencial en su biogénesis, es al final degradado.

Mucho queda por dilucidar del proceso de formación del autofagosoma. Por ejemplo, se sabe que Beclina-1, un homólogo en mamíferos de Atg6, esencial para la autofagia, forma un complejo con actividad quinasa. En mamíferos, Beclina-1 cuando se une a unas proteínas activa autofagia y cuando se une a Bcl-2 la inhibe. Pero el mecanismo es desconocido.

Cuando la membrana del fagosoma se ha cerrado uno o varios lisosomas se fusionarán, generando un fagolisosoma. En él todo el contenido que ha quedado englobado junto con la membrana interna será degradado por las hidrolasas lisosomales. De él saldrán aminoácidos y ácidos grasos que podrán ser utilizados por la célula.

## **2.2. DETECCIÓN DE LA AUTOFAGIA**

El hecho de que la autofagia sea un proceso tan complejo y con varias etapas claves, hace que su detección y medición sea objeto de controversia.

El método utilizado durante más tiempo es la microscopía electrónica, y aunque se han desarrollado métodos moleculares de detección, sigue siendo el más fiable. Con la microscopía electrónica se detectan la formación de estructuras intracelulares rodeadas de doble membrana.

Otro método muy utilizado es la agregación de LC3, que unido a GFP, puede ser detectado por microscopía. Efectivamente, cuando se genera el autofagosoma, el LC3 está en la membrana y esto puede ser visualizado. Pero esto no necesariamente indica que la autofagia está discurriendo con normalidad. Puede ocurrir que la degradación de los autofagosomas esté impedida, por ejemplo es lo que hace la cloroquina. Por ello se percibe una acumulación de autofagosomas que puede inducir a creer que la autofagia está aumentada cuando en realidad está inhibida.

El LC3 sufre una lipidación, y ésta, por el cambio de tamaño puede ser detectada por western blot, aunque aquí hay una paradoja. El LC3 lipidado resuelve más rápidamente en el gel que el LC3-I. Sin embargo, la proporción LC3-II/LC3 no siempre será indicativa del

grado de autofagia debido a que no se conoce bien la cinética de formación, lipidación, “delipidación”. Además de que, como se decía antes, influye también la cinética de fusión del lisosoma y degradación del autofagolisosoma. De hecho, la acumulación de LC3-II no necesariamente indica un incremento de la autofagia, puede ser, como en el caso de p62, que realmente se esté inhibiendo en un paso final. Por ejemplo, la bafilomicina es un potente inhibidor de la bomba de protones de los lisosomas, lo que impide su fusión efectiva con los autofagosomas. Este inhibidor genera una acumulación de LC3-II en una situación en la que la autofagia no es funcional.

La implicación de varias proteínas en el proceso puede hacer muy útil las técnicas de silenciamiento génico como el siRNA, para detectar si la autofagia está o no implicada en las consecuencias del tratamiento. Es por tanto frecuente utilizar fibroblastos deficientes en los genes Atg5 o Atg7, o silenciarlos mediante siRNA. Debido a que lo que entendemos por autofagia, la degradación de contenido citoplasmático dentro de vacuolas, probablemente sea consecuencia de varios procesos independientes y regulados de manera diferente, es posible que estos abordajes de silenciamiento sean insuficientes. De hecho, se ha descrito que existe una ruta de macroautofagia independiente de Atg5 y Atg7 (Nishida, Arakawa et al. 2009).

No existe un método perfecto para medir autofagia. Por ello a la hora de detectar autofagia es necesario asegurarse de que todas las etapas del proceso son funcionales, utilizando diferentes técnicas que analicen el estatus y las funciones de la autofagia en un tratamiento y condición determinada (Mizushima, Yoshimori et al.).

### 3. MUERTE CELULAR

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

La definición de vida y muerte ha sido históricamente un reto filosófico y científico. ¿Es un virus un ser vivo o no? ¿Está una espora de un hongo que lleva cientos de años en el hielo viva o no?

La cosa se complica cuando nos referimos a nuestra especie. ¿En qué momento del desarrollo de un feto éste es considerado un ser vivo? ¿Y cuándo morimos? En principio sería cuando nuestro corazón deja de latir, ¿pero qué pasa entonces con el mantenimiento de la “vida” artificialmente?

Estas parecen reflexiones banales con respecto al tema de esta tesis, sin embargo no lo son. ¿Cuándo una célula muere? Si pretendemos estudiar muerte celular, especialmente en el tratamiento de tumores, más resistentes que muchas células, tendremos que encontrar una definición común de muerte para saber de qué estamos hablando.

Como se explicará más adelante, se han descrito varios tipos de muerte, clasificación que viene dada por el proceso y las consecuencias del mismo.

Se suele medir “muerte celular” como la incapacidad de la célula de mantener la integridad de la membrana, por eso se vuelve permeable a distintos colorantes. Pero una población de células aparentemente viva, negativa para esos colorantes como el yoduro de propidio, puede haber dejado de ser viable. Y aquí entra un nuevo concepto, la *viabilidad*. Podríamos definirla como la capacidad de las células de seguir creciendo. Esto no lo definiríamos como muerte, la célula sigue estando viva, íntegra, consume energía, respira y libera desechos y factores al medio. Sin embargo, para nosotros, el hecho de que una célula no sea viable es tan importante o más que el que esté “muerta”. Una célula que no es capaz de multiplicarse “no existe” en un organismo de miles de millones de células. Esto es muy importante en el caso del tratamiento antitumoral. Por supuesto la mayoría de las células de un organismo no tienen la capacidad de dividirse, función que recae sobre unos pocos tipos celulares. Sin embargo esas células tienen una función determinada.

Como todo, la muerte celular es un proceso, y en ese discurrir existe un punto de no retorno, en el que la célula todavía no está “muerta”,

pero tampoco puede dar marcha atrás. Esto también ha de ser tenido en cuenta a la hora de estudiar este fenómeno.

El comité de nomenclatura en muerte celular dice que una célula está muerta cuando ha perdido la integridad de la membrana plasmática, cuando el núcleo se ha fragmentado o cuando los cuerpos apoptóticos han sido fagocitados (Kroemer, Galluzzi et al. 2009). Ellos consideran que células senescentes han de ser consideradas como vivas, aunque hayan perdido la viabilidad, la capacidad clonogénica.

Sea como fuere, la muerte celular en un sentido amplio es muy importante para la homeostasis de los organismos multicelulares y para las poblaciones de organismos unicelulares (Prindull 1995).

Es necesaria para eliminar células innecesarias, envejecidas, dañadas, perjudiciales, etc.

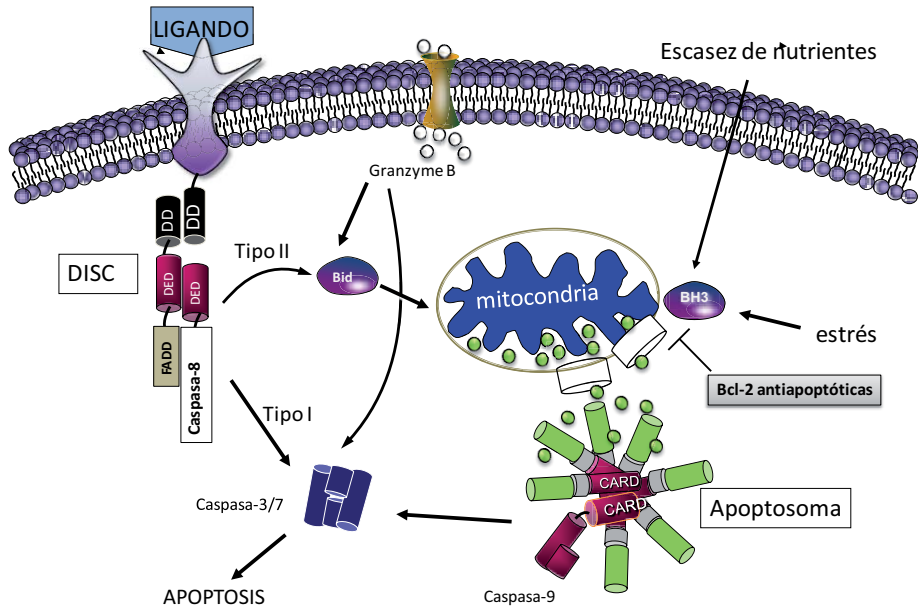
En el sistema inmunológico, después de la proliferación clonal ante una infección, es necesario volver al estado basal, para ello los linfocitos que habían proliferado tienen que desaparecer.

Durante el desarrollo embrionario, para la formación tridimensional de los tejidos, es necesario que determinadas zonas desaparezcan. Un ejemplo universalmente conocido es el de la metamorfosis del renacuajo a la rana. Al renacuajo la cola no se le cae, sino que va desapareciendo gradualmente, esas células sufren apoptosis (R.Kerr, Harmon et al. 1974).

En nuestro ánimo por clasificarlo todo, hemos separado la muerte celular en varios tipos dependiendo del estímulo, del proceso y de las consecuencias.

Nosotros vamos a clasificar la muerte celular en apoptosis y necrosis. E incluiremos dentro de cada apartado otros procesos que por sus características podrían ser clasificados aparte, pero esta clasificación nos parece más realista.

### 3.2. APOPTOSIS



Muñoz-Pinedo 2010, "Ancient Origin of Self Recognition Systems in Nature", 1st ed.

**Figura 5: Esquema de las distintas rutas de inducción de apoptosis.**

Al principio esta muerte fue definida por criterios morfológicos (Kerr, Wyllie et al. 1972). Pero se ha ido viendo que estas características morfológicas no son universales, y que lo único que se mantiene constante en todas las condiciones es la actividad de unas proteasas llamadas caspasas. Pero sí hay una serie de características bioquímicas y fenotípicas que la caracterizan: presencia de actividad caspasa y proteólisis de sus substratos, fragmentación de ADN y condensación de la cromatina.

También se le ha venido llamando muerte celular programada, en contraposición a lo que se creía como una muerte incontrolada, "espontánea" o pasiva que era la necrosis.

Esta denominación pierde su sentido cuando se empieza a ver que existen circunstancias en la que se induce muerte con características necróticas pero de manera controlada, en el sentido en el que existe una ruta determinada implicada.

Parece ser que la mayoría de los procesos que suceden en una célula que sufre apoptosis están relacionados con la necesidad de que esta célula sea rápida y eficientemente fagocitada por un macrófago.

El proceso que tiene lugar en una célula en apoptosis puede dividirse en 4 fases secuenciales:

1) Estímulo.

Son diversos, y deben superar un umbral determinado. Se dividen en estímulos de la vía intrínseca o de la vía extrínseca.

2) Fase de Inducción.

El estímulo induce la activación de caspasas, si el estímulo y la activación superan un umbral. Existen dos puntos de control principales donde se decidirá si se entra en apoptosis o no. Por un lado, si la unión del ligando de muerte genera suficiente actividad caspasa, o por otro, si la liberación de citocromo C induce suficiente agregación de la caspasa-9.

3) Fase de Ejecución.

En esta fase, el ADN es fragmentado por la acción de las endonucleasas (cariorexix), originando una serie de fragmentos oligonucleosomales múltiples de la unidad básica de 180-200 pares de bases (Cohen, Sun et al. 1994). También se produce el procesamiento de sustratos intracelulares por proteólisis (Martin and Green 1995) y la externalización a la superficie de la célula del fosfolípido fosfatidilserina, que es la señal para la acción de los macrófagos (Martin, Reutelingsperger et al. 1995).

La acción de las caspasas lleva a la célula a sufrir un fenómeno llamado burbujeo. Éste consiste en la formación de burbujas a partir de la membrana plasmática. Finalmente, la célula se fragmenta, originando los cuerpos apoptóticos.

4) Fase de Reconocimiento y Fagocitosis.

Este proceso está bastante bien conservado en los organismos multicelulares. Esto es debido a que de esta manera la muerte es un proceso ordenado, eficiente y controlado. El resultado de esta fase es que la célula, ya fragmentada en trocitos (cuerpos apoptóticos), rápidamente será fagocitada por los macrófagos (Savill and Fadok 2000), evitando su lisis y expulsión del contenido al medio extracelular.

Cuando los investigadores en el laboratorio inducimos apoptosis en ausencia de macrófagos, esas células apoptóticas sufren necrosis secundaria. Algo parecido puede ocurrir "in vivo" si la apoptosis es

masiva o la fagocitosis insuficiente. Las células apoptóticas, si no son inmediatamente fagocitadas, se lisan.

### 3.3. CASPASAS

Antes de empezar a explicar el proceso, hay que explicar qué son las caspasas, que como se decía, son los elementos esenciales y que definen este tipo de muerte. Se denominan caspasas por el acrónimo en inglés (cysteine aspartyl-specific proteases) (Thornberry 1997).

Las caspasas están en la célula en forma de zimógenos inactivos, procaspasas. Por lo tanto necesitan siempre una señal que las active. Estos zimógenos están formados por tres dominios: un prodominio en el extremo aminoterminal y los dominios p20 (subunidad larga) y p10 (subunidad corta), que se encuentran en la enzima activa (Hengartner 2000). En todos los casos conocidos, las caspasas activas están compuestas por heterotetrámeros, que contienen dos heterodímeros p20/p10 y dos sitios activos de catálisis (Earnshaw, Martins et al. 2003). Sin embargo, es posible que pueda haber caspasas en forma de monómeros activos bajo determinadas condiciones. Una vez activas, las caspasas son capaces de cortar gran variedad de sustratos celulares. Existe una base de datos de libre acceso con los sustratos de las caspasas (<http://www.casbah.ie>). Estos sustratos tienen en común un motivo tetrapéptido.

En este momento se han descrito 11 caspasas en humanos. No todas tienen funciones apoptóticas. Por ejemplo, la caspasa-1, 4 y 5 están implicadas en inmunidad y maduración de citoquinas.

Dentro de la familia de las caspasas, las que tienen una función apoptótica se suelen dividir en caspasas iniciadoras y ejecutoras. Sin embargo, muchas de estas caspasas tienen más funciones que las apoptóticas.

<b>Tabla 1: Representación esquemática de la función y papel de las caspasas así como las consecuencias de su deficiencia.</b>			
<b>Caspasa</b>	<b>Fenotipo Knock-out</b>	<b>Papel en apoptosis</b>	<b>Función no apoptótica</b>
<b>Caspasa-1</b>	Los ratones se desarrollan con normalidad	Papel en piroptosis.	Inmunidad innata, secreción de proteínas



<b>Caspasa-2</b>	Los ratones tienen un exceso de oocitos. Envejecimiento prematuro.	Caspasa iniciadora/ejecutora  Iniciador de apoptosis tras el daño al ADN, durante catástrofe mitótica y shock térmico.	No determinado
<b>Caspasa-3</b>	Mortalidad perinatal. Hiperplasia cerebral.	Caspasa ejecutora	Inmunidad adaptativa, proliferación celular y diferenciación de trofoblastos placentarios. Mantenimiento de células precursoras (Stem cells).
<b>Caspasa-6</b>	Los ratones se desarrollan con normalidad.	Caspasa ejecutora	Inmunidad innata.
<b>Caspasa-7</b>	Mortalidad perinatal.	Caspasa ejecutora	No determinada
<b>Caspasa-8</b>	Letal en el embrión. Problemas en el desarrollo del corazón y bajos niveles de precursores hematopoyéticos. En humanos, mutaciones familiares llevan a inmunodeficiencias.	Caspasa iniciadora de la ruta extrínseca.	Inmunidad innata y adaptativa. Proliferación de linfocitos y diferenciación de macrófagos.
<b>Caspasa-9</b>	Mortalidad perinatal. Exceso de tejido cerebral	Caspasa iniciadora de la ruta intrínseca.	No determinada

<b>Caspasa-10</b>	En humanos, una mutación familiar está ligada al síndrome autoinmune linfoproliferativo de tipo II.	Posible caspasa iniciadora de la ruta extrínseca	No determinada
<b>Caspasa-11</b>	Los ratones se desarrollan normalmente. Los linfocitos tienen un defecto en la depolimerización de la actina.	Implicada en muerte celular neuronal inducida por MPTP y otros estímulos patológicos.	Inmunidad innata, migración de macrófagos.
<b>Caspasa-12</b>	Los ratones se desarrollan normalmente	Caspasa iniciadora en apoptosis inducida por estrés reticular.	No determinada
<b>Caspasa-14</b>	La piel de los ratones presenta baja hidratación y alta sensibilidad a UVB.	Desconocida	Diferenciación de queratinocitos.

- **CASPASAS INICIADORAS:**

Las caspasas iniciadoras tienen un prodominio (DED) o card (figura 5) que les permite unirse a moléculas adaptadoras y formar un complejo activador.

Son capaces de auto-activarse e iniciar el proceso proteolítico, cortando y activando otras caspasas. La dimerización que induce la activación es necesaria, suficiente y reversible.

Las caspasas iniciadoras 8 y 10 tienen dos dominios DED, (dominio efector de muerte en inglés), que les sirve para unirse a otras proteínas que contienen los mismos motivos. La caspasas iniciadoras, caspasas 2 y 9, contiene un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD). Estos motivos les sirven para unirse a otras proteínas o "plataformas de activación", que al reclutar moléculas de caspasas, las acercan permitiendo su activación.

Las caspasas 8 y 9 las trataremos más en profundidad más adelante. Brevemente veremos el papel de caspasa-2.

El papel fisiológico de caspasa-2 es menos conocido que del resto de caspasas iniciadoras. Su función es controvertida, parece claro que tienen un papel apoptótico y no inflamatorio, aunque también se le han atribuido funciones en el ciclo celular y proliferación. Revisado en (Kitevska, Spencer et al. 2009).

Parece que su localización celular es nuclear, aunque también ha sido detectada en Golgi, e incluso en algunos experimentos con microscopía confocal la sitúan en la mitocondria (Kitevska, Spencer et al. 2009).

Por su homología con CED-3 (la principal caspasa efectora en *C. elegans*), y porque al sobre-expresarla induce apoptosis, se creyó que ese era su papel.

Los ratones deficientes en caspasa-2 no tienen un fenotipo dramático. Las hembras tienen más oocitos que los ratones silvestres. Otro rasgo parece ser que estos ratones muestran un envejecimiento prematuro, especulándose que la deficiencia en caspasa-2 impediría la eliminación de células con un alto estrés oxidativo.

También se cree que caspasa-2 pueda tener un papel en el ciclo celular. Fibroblastos murinos deficientes en caspasa-2 crecen mucho más rápido que su contraparte. Caspasa-2 es inducida bajo oncogenes como E1A. Sin embargo, este papel en proliferación no ha podido ser probado in vivo.

Hay bastantes pruebas de su implicación en reparación del ADN. Y aunque células deficientes en caspasa-2 fallen en la reparación del ADN tras radiación, no se han encontrado sustratos de la enzima que puedan ser responsables de esta función. (Kitevska, Spencer et al. 2009)

Su implicación en otras rutas de apoptosis es también muy controvertida. Por ejemplo, su implicación en apoptosis inducida por "shock térmico". Mientras existen estudios que muestran su dimerización y activación tras shock térmico (Bouchier-Hayes, Oberst et al. 2009), otros ven que se induce apoptosis sin caspasa-2 (Milleron and Bratton 2006).

- **CASPASAS EFECTORAS:**  
(tabla 1)

A diferencia de las iniciadoras, no son capaces de auto-activarse, necesitan ser cortadas y activadas por aquellas. Las caspasas efectoras cortan una gran cantidad de sustratos. Se conocen las caspasas 3, 6 y 7. No tienen un prodominio como las iniciadoras. Y están en forma de dímero inactivas. Al contrario que las iniciadoras, el corte de una subunidad de unión las activa, y este es un proceso imprescindible e irreversible.

En general, las caspasas, por su función y actividad, tienen que estar muy bien controladas. Una activación descontrolada lleva a enfermedades neurodegenerativas, mientras que una disminución de su actividad puede llevar al desarrollo de tumores. Iremos explicando la regulación de las mismas a lo largo del texto.

### **3.4. MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS**

La inducción de apoptosis es como generar una figura con fichas de dominó. Una vez que la primera ficha ha caído, no hay vuelta atrás. La primera ficha es la caspasa iniciadora, y el estímulo (empujar la ficha) debe ser lo suficientemente fuerte. A diferencia del efecto dominó, cada ficha sólo puede ser tumbada por la/s que le preceden.

Aunque nosotros los representemos de manera lineal, nada más lejos de la realidad. Las propias características de las caspasas hacen a la inducción de apoptosis una intrincada red de activaciones e inhibiciones. Y si bien existen dos rutas claramente definidas por función, mecanismos y protagonistas, estas se comunican continuamente. Podemos dibujar un modelo de inducción de apoptosis sobre el papel que difícilmente podremos ver en la realidad.

Para desenredar esta madeja, dividiremos las rutas en 2, ruta extrínseca e intrínseca que son las mejor caracterizadas. Y después hablaremos de otras vías de activación de caspasas. Entre ellas una de las más importantes desde el punto de vista adaptativo, la inducida por la granzima B por los linfocitos T citotóxicos.

### 3.4.1. RUTA EXTRÍNSECA - REGULACIÓN

También llamada de ligandos de muerte. En esta ruta participan los receptores de muerte y la caspasa iniciadora es la 8 (y la caspasa-10 en humanos).

#### a) RECEPTORES DE MUERTE

Los receptores de muerte son miembros de la familia de los receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Son proteínas transmembrana tipo-I (extremo aminoterminal expuesto en la cara externa para su unión al ligando) y se caracterizan por contener entre dos y cuatro dominios extracelulares ricos en cisteínas (CRD), para la unión de los ligandos, y un dominio intracelular de muerte de unos 80 aminoácidos (DD), que sirve para reclutar proteínas adaptadoras como TRADD o FADD (Ashkenazi and Dixit 1998).

La homotrimerización de los receptores en la membrana se produce por la unión de ligandos específicos de la familia de TNF.

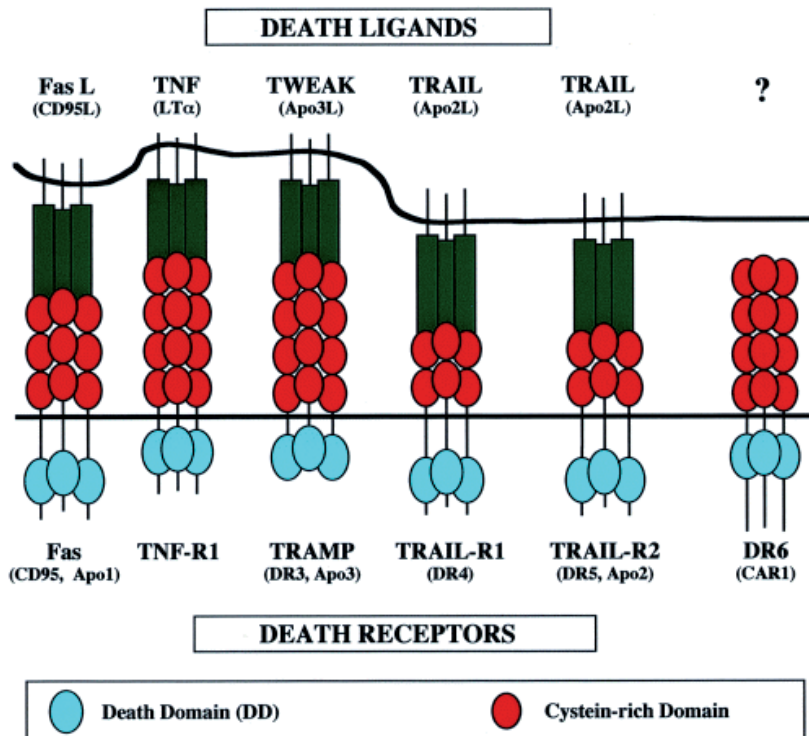


Figura 6: Esquema de los ligandos y los receptores de la familia del TNF (Wehrli, Viard et al. 2000)

Los receptores de la familia del TNF, pueden transmitir señales contrapuestas. Se llaman ligandos de muerte, pero además de apoptosis pueden transmitir una señal prosupervivencia, proliferativa, inflamatoria a través de la activación de NF- $\kappa$ B.

Cuando la señal es de muerte, al interactuar el ligando con su receptor, se induce un rápido ensamblaje de un “complejo inductor de la señal” (DISC). El DISC contiene principalmente a la caspasa-8 (y 10 en humanos), a la molécula adaptadora FADD que interactúa con Fas a través del dominio de muerte DD (revisado en (Strasser, Jost et al. 2009)). Así como a una molécula inhibidora, análoga a caspasas pero sin el dominio activo, c-FLIP.

Además, dependiendo del estado del receptor, de las moléculas co-estimuladoras o inhibidoras puede darse una señal u otra. Receptores que carecen del dominio de muerte, pueden funcionar como inhibidores de la señal, como señuelo (decoy) (Marsters, Sheridan et al. 1997).

Aunque hay más (figura 6), aquí vamos a tratar los receptores y ligandos de muerte más importantes o mejor estudiados

- FAS:

El receptor Fas juega un papel muy importante en el sistema inmunitario. Se identificó en 1991 (Itoh, Yonehara et al. 1991). Forma parte de la familia de TNF. Aunque puede encontrarse soluble debido a un splicing alternativo (Cheng, Zhou et al. 1994), normalmente es una proteína transmembrana, con un dominio intracitoplasmático de muerte (DD). Se expresa ampliamente, y es regulado por citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  o TNF (Zimmermann, Bonzon et al. 2001). Sin embargo, la expresión del ligando, FasL, está más restringida a células inmunes, y a testículos, hígado, pulmón, intestino y ojo.

La unión de FasL a su receptor induce la activación de caspasa-8. Y generalmente está asociado a apoptosis. Sin embargo, está clara la función de Fas en proliferación en linfocitos, activación o diferenciación (Strasser, Jost et al. 2009). No sólo en células inmunes sino incluso en otros tejidos como hígado estimula la proliferación (Desbarats and Newell 2000)

La función apoptótica de Fas necesita de modificaciones posttraduccionales como palmitoilización (Feig, Tchikov et al. 2007). Esto lleva al receptor activado a zonas llamadas lipid rafts que son

resistentes a la disociación por SDS. Es ahí donde parece que es activada la caspasa iniciadora.

- TRAIL:

Fue definida como una citoquina inductora de apoptosis de la familia del TNF. Es importante en la respuesta inmune innata y del sistema inmune en general.

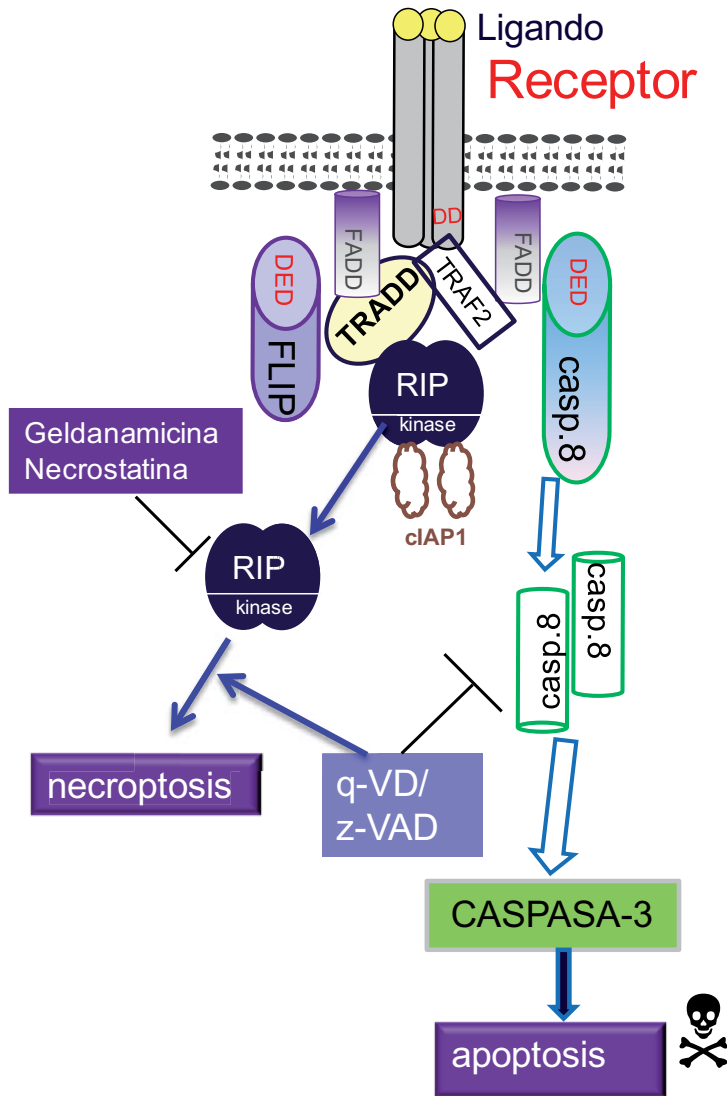
Tiene varias funciones, y buena parte de las células sanas son resistentes a este ligando, si bien la transformación tumoral parece sensibilizar a las células. Se cree que la capacidad de TRAIL de inducir autofagia protectora en células no transformadas a través de una ruta que implica a TAK1 (TGF- $\beta$  activating kinase 1), AMPK y mTORC1. Sin embargo, en células transformadas por activación de oncogenes son incapaces de inducir esa autofagia protectora tras el tratamiento con TRAIL y mueren por apoptosis (Herrero-Martin, Hoyer-Hansen et al. 2009) y (Han, Hou et al. 2008).

- TNF

El factor de necrosis tumoral es una citoquina pleiotrópica, con funciones pro apoptóticas o proinflamatorias. Tiene dos receptores para transmitir la señal. El receptor 1 (TNFR1) tiene un dominio de muerte en su porción intracelular, mientras que el receptor 2 no. Aún así, parece que el TNFR2 puede transmitir una señal de muerte, bien a través del estímulo del TNFR1, ya sea porque la señal de TNFR2 induce la producción de más TNF que induce la producción de TNFR1, o por un efecto de “transmisión” del TNF. TNFR2 tiene mucha afinidad por la citoquina, y actuaría pasando el TNF al TNFR1. Pero otros autores han visto que el TNF puede inducir muerte independientemente de TNFR1 (Depuydt, Van Loo et al. 2005).

Existen indicios de que los receptores pueden inducir señal independientemente del TNF (Rao, Hsu et al. 1995).

Cuando el TNF se une al receptor, se forma un complejo trimérico, que recluta a diferentes proteínas como TRADD, TRAF2, RIPK1, FADD Y CASPASA-8, o cIAP y FLIP.



**Figura 7: Esquema de la ruta extrínseca de la apoptosis.**

Cuando hay suficientes niveles de las proteínas inhibitoras cIAP1 y 2 y c-FLIPL, estas impiden el reclutamiento de RIPK1, y de caspasa-8 a FADD, permitiendo que la señal sea a través de IKK que induce la activación de NF-κB. Esta es una señal (figura 8) (Chen and Goeddel 2002) prosupervivencia que induce proliferación e inflamación en el ámbito del sistema inmunológico.

Cuando los niveles FLIP y/o cIAP1 bajan por alguna razón se induce el reclutamiento de caspasa-8 y/o RIPK1 y se induce muerte, ya sea a través de la activación de caspasa-8 (apoptosis), o de la actividad



kinasa de RIPK1, induciéndose entonces necroptosis. Vamos a ir viendo estos elementos uno a uno.

## b) CASPASA-8

- FUNCIÓN

Si bien su principal función es la de inducir la apoptosis como caspasa iniciadora, también está envuelta en otras funciones no apoptóticas, revisadas por Maelfait y Beyaert (Maelfait and Beyaert 2008).

Lo primero que llama la atención es que la deficiencia en caspasa-8 es letal en ratones a nivel embrionario. Los embriones mueren por problemas en el desarrollo: hiperemia, eritrocitosis y defectos en el desarrollo del músculo cardiaco son algunos de los rasgos (Varfolomeev, Schuchmann et al. 1998). Experimentos hechos en ratones deficientes en caspasa-8 específicamente en el músculo cardiaco indica que esta proteasa tiene funciones no apoptóticas en el desarrollo embrionario. Además de caspasa-8, parece que para estas funciones son necesarias las moléculas adaptadoras como FADD o cFLIPL. Estas anomalías en el desarrollo no se producen en humanos con mutaciones en caspasa-8, probablemente debido al papel redundante de caspasa-10, proteasa no presente en ratones (Maelfait and Beyaert 2008).

También es necesaria para la diferenciación de los monocitos en macrófagos. La diferenciación a macrófagos necesita de reajustes citoplasmáticos en los que parece ser necesaria la actividad de caspasa-8 sin la inducción de apoptosis. Esto debe estar regulado a más niveles, por ejemplo caspasa-3 tiene que estar fuertemente regulada. Pero también debe estar inhibida la señal proliferativa que impediría la diferenciación, mediante la degradación de RIPK1 por caspasa-8.

Linfocitos T en proliferación se ha visto que tienen aumentada la actividad de la caspasa-8, pero no sufren apoptosis.

En relación a esto, caspasa-8 está implicada en la activación de NF- $\kappa$ B en linfocitos T-CD8 que sobre-expresan cFLIPL.

- ACTIVACIÓN

Caspasa-8, junto a la caspasa-10 en humanos, es la caspasa iniciadora de la ruta extrínseca de la apoptosis (Medema, Scaffidi et al.

1997). Forma parte del complejo proteico DISC y su activación ocurre en dos pasos. Primero, el reclutamiento de FADD a la región intracelular de FAS promueve la dimerización y cambio de conformación de la caspasa-8 dentro del DISC lo que permite la activación total de la caspasa-8. A continuación la caspasa-8 sufre un procesamiento autoproteolítico que permite a la enzima liberarse del DISC. El dímero no proteolizado es activo pero muy inestable, una vez cortada, la caspasa-8 como monómero es inactiva, pero con mucha afinidad por otro monómero (Pop, Fitzgerald et al. 2007) o a proteínas proapoptóticas como Bid.

Existen otros mecanismos de activación de caspasa-8.

Parece ser que caspasa-3 cortada puede a su vez cortar y activar caspasa-8 en un mecanismo de retroalimentación, aunque no se sabe si este proceso tiene un papel determinante en la apoptosis, ya que ni el corte, ni la dimerización son por sí solos suficientes para activar caspasa-8 (Oberst, Pop et al.).

Pero puede que el reclutamiento de caspasa-8 por el DISC no sea suficiente para inducir una actividad que desencadene apoptosis. Existen otros elementos y modificaciones de la misma caspasa que influyen en su actividad:

Jin et al. (Jin, Li et al. 2009) describieron que tras la formación del DISC se induce poly-ubiquitinización de la caspasa-8 a través de una interacción previamente desconocida entre el DISC y una E3 ligasa llamada Culina-3. Esta ubiquitinización requería una proteína llamada RBX1, y era un equilibrio entre ubiquitinización y de-ubiquitinización por la A20 deubiquitinasa. A continuación entraba en juego otra proteína, p62/sequestosoma-1, una proteína de unión a ubiquitina. P62 agregaría a la caspasa-8 modificada por culina-3 en determinados focos.

Estos datos mostrarían que la activación de caspasa-8 está fuertemente regulada por muchos factores, incluidos los metabólicos. La unión del ligando induce la ubiquitinización de la caspasa-8, señal que suele indicar la degradación de la proteína, que en este caso es activadora. Además de la señal química, parece que existen también compartimentos donde se dan los procesos de activación. En este caso la caspasa-8 se encuentra en "lipids rafts" de la membrana citoplasmática.

Se sabe que caspasa-8 puede ser activada por repeticiones de poli-glutamina (Sánchez, Xu et al. 1999). La acumulación de péptidos que

acumulan series de glutamina parece ser tóxica para neuronas. Esta toxicidad viene por la inducción de apoptosis por caspasa-8, su activación es inhibida por la proteína viral antiapoptótica CrmA, por un dominante negativo de FADD y por Bcl-xL y Bcl-2. Esta activación parece ser independiente de FasL y los autores observaron que FADD está en la fracción no soluble cuando se induce la expresión de esos péptidos de poli-glutamina. Además de que en las fracciones insolubles de cerebros afectados por la enfermedad de Huntington, existe una acumulación de caspasa-8. Estos resultados podrían indicar que una agregación de FADD y caspasa-8 independiente de los receptores de muerte es posible.

Existen más ejemplos de activación de caspasa-8 independiente de los receptores de muerte. Gröbner et al. (Gröbner, Adkins et al. 2007) describieron que la proteína P de *Yersinia* inducía la producción de un DISC atípico en células dendríticas que activa caspasa-8 y recluta RIPK1, induciendo una mezcla de apoptosis y necrosis. Ellos conjeturan que esta proteína acetila a la MAP kinasa inhibiéndola. Esta MAP kinasa sería la responsable de la expresión de FLIP.

Se han descrito incluso otras formas de activación de caspasa-8 independientemente de FADD. La proteína viral HPV18 E2 induce la agregación de caspasa-8 en unas estructuras filamentosas. A pesar de que esta proteína E2 no tiene ningún dominio de muerte. Además, el análogo viral de FLIP es capaz de inhibir la interacción entre caspasa-8 y E2, protegiendo a la célula de la proteína viral (Thierry and Demeret 2008).

Por último indicar el estudio de Suzuki et al. (Suzuki, Kusakai et al. 2003) del 2003. Ellos describen una forma de muerte por privación de glucosa a la que llaman necrótica, pero dependiente de caspasa-8. Además de observar corte de caspasa-8 y degradación de Bid por la privación de glucosa, ven que no es dependiente de FADD y es parcialmente inhibida por FLIP. Ellos concluyen que es necrosis porque no ven algunos rasgos como fragmentación nuclear o presentación de fosfatidilserina. Pero la muerte inducida por privación de glucosa en sus células es inhibida por el inhibidor de caspasas z-VAD además de por la sobre-expresión de ARK5, que es el objeto de su estudio. Ellos concluyen que ARK5 protegería de la privación de glucosa al impedir la activación de caspasa-8 porque impide la degradación de FLIP.

### c) DIFERENCIAS ENTRE APOPTOSIS TIPO I Y II

Como decíamos, la caspasa iniciadora tiene diversos substratos, entre ellos están las caspasas efectoras y la proteína “sólo BH3” Bid. Esta es cortada a tBid, y una acumulación de tBid induce activación de la ruta intrínseca o mitocondrial como luego veremos.

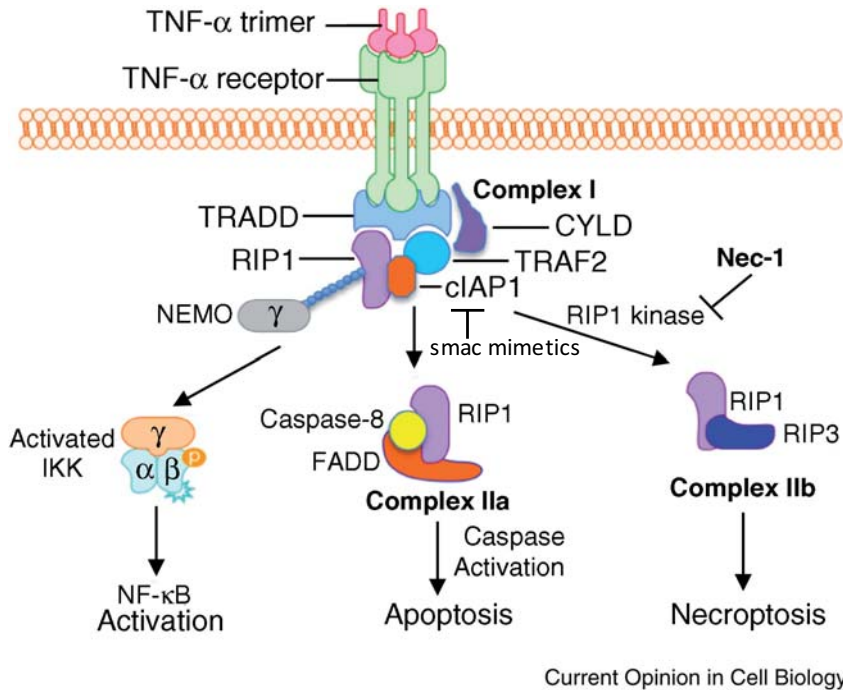
Entonces, una vez que la caspasa iniciadora está activa y se ha superado el umbral de la señal, pueden pasar dos cosas: que la caspasa iniciadora corte y active a caspasa-3, desencadenándose apoptosis, o que sea necesario la acumulación de tBid para la inducción de apoptosis. Serían el tipo I y II respectivamente.

Parece ser que lo que hace que una célula sea tipo I o II es la actividad de XIAP (Jost, Grabow et al. 2009). Esta proteína es un inhibidor de la caspasa-3, lo que impide que caspasa-8 la pueda activar. Para ello es necesario la liberación de la mitocondria de proteínas como SMAC, que interaccionan con XIAP, liberándola de caspasa-3. Por ello, en las células en las que la actividad de XIAP es suficientemente alta, será necesaria la liberación de SMAC para inducir apoptosis, estas son células tipo II.

Aunque hay indicios de que existen otros elementos diferentes entre ambas rutas. Por ejemplo se ha visto que FAS está presente constitutivamente en las células tipo I en estructuras de membrana resistentes a detergentes (rafts) donde colocan con “estructuras señalizadoras de oligomerización de proteínas” (SPOTS en inglés), pero esto no ocurre en células tipo II (Feig, Tchikov et al. 2007).

También se ha visto que el patrón de corte de la caspasa-8 es diferente en ambos tipos de muerte. Mientras que el fragmento p10 de la caspasa sólo puede ser detectado en las células tipo I, el fragmento p18 podía ser detectado en los tipos I y II (Li, Qi et al. 2009).

Esto indicaría que existen más elementos que regulan el que en una célula pueda morir tras la unión de ligandos de muerte de manera independiente de mitocondria o no además de la actividad de XIAP



**Figura 8: Representación de las tres vías que pueden ser activadas por TNF:** Modificada de (Christofferson and Yuan 2010).

#### d) SENSIBILIZACIÓN A LA VÍA EXTRÍNSECA

Los ligandos de muerte, como decíamos, tienen un papel dual. Ya pueden inducir proliferación y supervivencia, como muerte o diferenciación. Algunos elementos que condicionan una u otra respuesta han sido escuetamente apuntados.

La unión del ligando a su receptor induce la formación del complejo I. Por ejemplo, la unión del TNF al receptor induce la agregación de TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1 and cIAP2. Este complejo es el que induce la activación de NF-κB. Normalmente las células no mueren cuando son tratadas con TNF, sino que hace falta silenciar la actividad de NF-κB, ya sea mediante mutantes o por ejemplo con el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida.

Además, el que los ligandos de muerte señalicen a muerte depende a su vez de dos rutas, una que es regulada por cFLIPL y la otra por cIAP1 y 2 (Figura 8).

Aquí nos detendremos para ver varios elementos importantes en esta dualidad.

- **RIPK1**

“Receptor-interacting protein kinase I” (RIPK1) (Stanger, Leder et al. 1995) es una proteína kinasa con una función dual. Promueve, a través de su unión al receptor, supervivencia o muerte. Ratones deficientes en RIPK1 nacen normales, pero mueren después de tres días por una masiva apoptosis. Curiosamente, fibroblastos de ratones deficientes en RIPK1 fueron más sensibles a apoptosis inducida por TNF que los ratones silvestres.

Además las células deficientes en RIPK1 tenían reducida la actividad NF-κB. Aunque para rizar el rizo, RIPK1 no es totalmente indispensable para activar a NF-κB a través de TNFR1 (Wong, Gentle et al. 2009).

Al igual que la caspasa-8, el que RIPK1 sea proapoptóticas o no, depende, entre otras cosas, de su ubiquitinización.

Resumiendo, RIPK1 tiene 3 funciones principales. Induce la expresión de NF-κB, por tanto supervivencia y proliferación; colabora en el reclutamiento de caspasa-8 y en su activación, llevando a apoptosis; y por último, debido a su actividad kinasa, y en ausencia de actividad caspasa, puede inducir necroptosis que será analizada en detalle más adelante.

- **FLIP:**

cFLIPL es un homólogo de caspasa-8 porque posee dos dominios de muerte, pero le falta el sitio activo de la enzima por una mutación que cambia una cisteína por una tirosina en el dominio enzimático (Irmmler, Thome et al. 1997). Tiene alrededor de 11 isoformas, aunque en la mayoría de las células sólo se detectan la isoforma larga (cFLIPL) y la corta (cFLIPS) que está relacionada con una proteína viral FLIP.

De esta manera FLIP actúa como un inhibidor competitivo de caspasa-8 al competir por FADD.

Pero FLIP también puede unirse a otras moléculas adaptadoras como RIPK1 o TRAF2 actuando no sólo como un inhibidor de la apoptosis, sino como elemento necesario para la activación de NF-κB, por ejemplo en linfocitos T CD8+ (Dohrman, Kataoka et al. 2005).

- **IAPs**

Como su nombre indica, son proteínas inhibidoras de apoptosis. En un principio se identificaron en baculovirus, así evadían la muerte de la célula. Se caracterizan por tener un dominio BIR (*baculoviral IAP repeat*). También contienen dominios RING (*really interesting new gene*), y actúan como ubiquitín ligasas. El dominio RING funciona como una ubiquitinasa E3, y señala a las proteínas para su degradación por el proteosoma.

Se ha visto que el dominio BIR les da afinidad por caspasas, aunque cIAP1 y 2 tiene el dominio que le permitiría inhibir a caspasa-3 y 7, aunque se ha visto que no inhiben la actividad caspasa directamente (Eckelman and Salvesen 2006). Estas proteínas inhiben la ruta extrínseca a través de su capacidad de unirse a TRAF2 y de ubiquitinar proteínas, induciendo su degradación. Y sólo XIAP tendría capacidad de inhibir caspasa 3 y 7 a través de interacción directa.

Se han diseñado análogos de SMAC/diablo, proteína que es liberada durante la permeabilización mitocondrial, que interfieren con los IAPs, induciendo su ubiquitinización y degradación por el proteosoma. Estos “análogos de SMAC” sensibilizan a las células a los ligandos de muerte como el TNF de manera dependiente de RIPK1 (Geserick, Hupe et al. 2009) y (Wang, Du et al. 2008). La pérdida de cIAP lleva a un aumento en el reclutamiento de RIPK1 y de la formación del complejo II del DISC. Esta muerte dependiente de la desaparición de cIAPs tiene componentes necróticos y apoptóticos. De hecho, para inhibir la muerte inducida por FasL, es necesario tratar en presencia de necrostatina (un inhibidor específico de la actividad kinasa de RIPK1) y de inhibidores de caspasas como z-VAD (Geserick, Hupe et al. 2009). En ausencia de FADD, de la caspasa-8 o actividad caspasa, se induce muerte independiente de caspasas llamada necroptosis.

Entonces lo paradójico aquí es que la expresión de cIAP1 y 2, teóricamente inhibidores de apoptosis, en estas circunstancias fomentan una muerte de tipo apoptótico, dependiente de caspasa-8 y que puede ser inhibida por FLIP. Su desaparición, induce el reclutamiento de RIPK1 que induce necroptosis y apoptosis cuando caspasa-8 es funcional, necroptosis sólo cuando caspasa-8 no lo es. Pero hay que apuntar que RIPK1 también es sustrato de caspasa-8, por lo que en células que son insensibles a los análogos de SMAC, los

niveles de RIPK1 en el complejo II del DISC pueden estar controlados por la actividad caspasa-8. Llama la atención que otro típico inhibidor de apoptosis, cFLIPL (pero no cFLIPs), también sea capaz en este caso de inhibir la muerte dependiente de RIPK1 en presencia de análogos de SMAC (figura 8) (Geserick, Hupe et al. 2009) cuando son tratadas con FasL. Sin embargo, Wang et al. (Wang, Du et al. 2008) describieron que la muerte inducida por el tratamiento con TNF más el mimético de SMAC no es inhibido por FLIP.

Probablemente existan otros elementos en juego como diferencias entre Fas y el receptor de TNF, o diferencias en la sensibilidad a necroptosis de cada línea celular.

- **Sensibilización a receptores de muerte por privación de glucosa.**

Como decíamos más arriba, el que la formación del DISC induzca muerte o no, depende del estado de varios elementos del mismo, especialmente de FLIP o cIAP. Por tanto, el ambiente de la célula puede influir en la sensibilidad a ligandos de muerte.

Los tumores sólidos suelen sufrir escasez de nutrientes en su crecimiento, debido al desequilibrio entre angiogénesis y crecimiento del tumor. Pero además, los tumores tienen alta dependencia en glucosa. Para ver cómo afecta la escasez de nutrientes a la sensibilidad a ligandos, se estudió si la privación de glucosa sensibilizaba a TRAIL. Efectivamente, la privación de glucosa bajaba los niveles de FLIP sensibilizando a las células a TRAIL (Nam, Amoscato et al. 2002).

Pero no sólo a TRAIL. La inhibición del metabolismo de la glucosa por baja concentración de glucosa o por tratamiento con 2-deoxiglucosa, sensibiliza a diversas líneas tumorales a apoptosis inducida por FasL, TRAIL y TNF. Esta sensibilización fue debida a un cambio de niveles de FLIP en algunas líneas, pero no en otras (Munoz-Pinedo, Ruiz-Ruiz et al. 2003). Hay drogas que imitan la escasez de glucosa, y sensibilizan a FasL. Por ejemplo la fasentina inhibe la internalización de glucosa por su transportador GLUT4, disminuyendo sus niveles dentro de la célula y sensibilizando a FasL (Wood, Dalili et al. 2008).

La privación de glucosa también puede sensibilizar a las células con apoptosis tipo II al tratamiento con ligandos. Esto es debido a que la escasez de glucosa lleva a la bajada de los niveles de Mcl-1 (Pradelli,



Beneteau et al. 2010). Esta inhibición de la expresión de Mcl-1 es debida a la activación de AMPK y la consecuente inhibición de mTOR.

### **3.4.2. VÍA INTRÍNSECA - REGULACIÓN**

Otra ruta bien conservada para inducir apoptosis es la ruta mitocondrial o intrínseca. Como su nombre indica, el eje central de control de esta vía es la mitocondria. La palabra intrínseca no indica exactamente que los estímulos son siempre internos a la célula. Multitud de estímulos pueden activar esta ruta: privación de nutrientes o factores de crecimiento, daño en el ADN por agentes químicos, físicos o biológicos; u otros tipos de estrés.

Las proteínas fundamentales en la vía intrínseca son las proteínas de la familia Bcl-2. Dentro de esa familia hay proteínas anti o proapoptóticas. De esta manera, la vía intrínseca está fuertemente regulada en una serie de puntos clave que iremos desgranando. Primero haremos un resumen de la ruta, y a continuación nos extenderemos en cada una de las etapas.

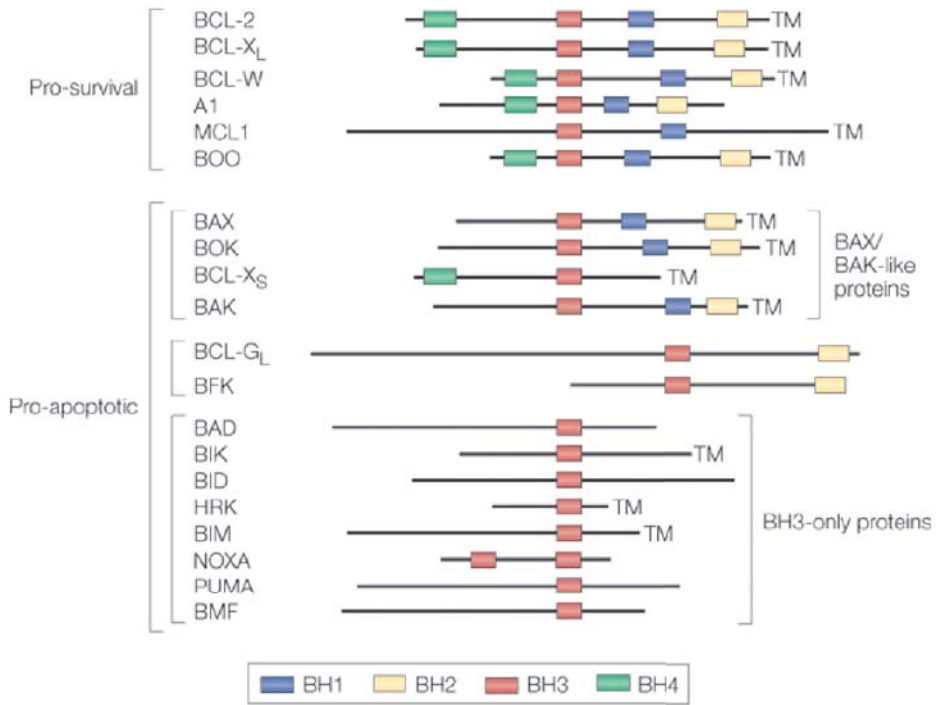
Cuando el estímulo supera un umbral determinado, las proteínas Bax y Bak se activan y polimerizan en la membrana mitocondrial externa. Este proceso está inhibido por las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL o Mcl-1).

La polimerización de Bax y Bak induce la formación de un poro por el que saldrán proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria, entre las que está el citocromo C. Cuando el citocromo C difunde, se une a una proteína llamada APAF1, que a su vez recluta a la caspasa iniciadora de la vía intrínseca, la caspasa-9. Cuando esta se activa, corta sus substratos, entre los que están otras caspasas ejecutoras como caspasa-3 y 7. Desde este momento el proceso es irreversible.

#### **PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE Bcl-2:**

Esta familia está compuesta por unas 20 proteínas parcialmente homólogas. En este grupo hay proteínas pro y antiapoptóticas. Su función se define por su estructura, que se caracteriza por tener los dominios BH, hasta 4.

Sus niveles y estado están fuertemente regulados. De hecho su desregulación es fuente de enfermedades neurodegenerativas o cáncer.



Nature Reviews | Immunology

Figura 9: Los miembros de la familia de Bcl-2 en mamíferos (Strasser 2005)

## PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓTICAS

Las proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 más importantes son: Bcl-2, Bcl-XL, y Mcl-1. Poseen al menos 3 de los 4 dominios BH. Estos les permiten unirse a otras proteínas Bcl-2, especialmente al dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas de la misma familia (Sattler, Liang et al. 1997).

## PROTEÍNAS PROAPOPTÓTICAS MULTIDOMINIO:

En este caso, estas proteínas contienen los dominios BH1, 2 y 3, pero no el BH4. Son las proteínas Bax, Bak y Bok.

Bax y Bak son dos proteínas fundamentales para la señalización de la apoptosis (Lindsten, Ross et al. 2000), mientras que Bok parece estar restringido a tejidos reproductores (Hsu, Kaipia et al. 1997).

Bax en estado inactivo se encuentra en el citoplasma, pero su activación, que conlleva la retracción de su extremo carboxiterminal, da lugar a que Bax se una a la membrana mitocondrial, polimerizando y formando un canal por donde podrán salir proteínas del espacio intermembrana.

Los ratones deficientes en Bax son viables, aunque los machos son estériles. Los ratones deficientes en Bak no presentan rasgos fenotípicos apreciables. Sin embargo, sólo un 10% de los deficientes en ambas proteínas llegan a desarrollarse (Lindsten, Ross et al. 2000). Y estos ratones presentan múltiples anomalías, por ejemplo mantienen las membranas interdigitales, vaginas no perforadas, anomalías neurológicas, células indiferenciadas, un elevado número de progenitores hematopoyéticos, granulocitos y linfocitos, etc. Las células deficientes en una de las proteínas son sensibles a los estímulos que inducen apoptosis por la vía intrínseca, mientras que las dobles negativas son bastante resistentes a la radiación ultravioleta y radiación gamma y al etopósido. Las proteínas Bax y Bak parecen ser redundantes e imprescindibles para la inducción de apoptosis por la mitocondria.

Pero Bax y Bak no sólo tienen funciones en apoptosis. También participan en la morfología de la mitocondria. Karbowski et al. (Karbowski, Norris et al. 2006) describieron que las mitocondrias de ratones deficientes en Bax y Bak estaban más fragmentadas y eran más cortas que en presencia de Bax y Bak. Además de en la morfología mitocondrial tienen un papel en los mecanismos de fisión y fusión de la mitocondria.

**PROTEÍNAS PROAPOPTÓTICAS SÓLO BH3:** Este grupo sólo comparte el dominio BH3. Entre sus miembros están Bid, Bad, Bim o Bmf.

Hay proteínas BH3 que forman parte de otras rutas. Por ejemplo Beclina 1, una proteína en principio reguladora de autofagia, es inhibida por Bcl-xL.

### **3.4.3. PERFORINA – GRANZIMA**

Una de las vías de muerte más importantes desde el punto de vista fisiológico, pero que pasa a veces desapercibida para los que estudiamos apoptosis, es la muerte inducida por las células T citotóxicas y las “Natural Killers” (NK). Esta muerte es un mecanismo de inmunidad innata que elimina células infectadas por virus, o transformadas.

Los linfocitos T citotóxicos son activados en los órganos linfoides por una célula presentadora de antígenos. Las células NK, sin embargo, no necesitan activarse para producir granzimas. Reconocen células infectadas con un virus o tumorales. Una vez se genera la sinapsis inmunológica entre el linfocito y la célula diana, se liberan lisosomas que contienen perforinas y granzimas.

La perforina forma el poro por el que entrarán las granzimas, serín-proteasas, que a diferencia de las caspasas, tienen un menor espectro de sustratos, por lo que parecen ser más específicas.

Una vez que la granzima B está en el citoplasma, induce muerte a través de dos vías: a través del corte de Bid a tBid, induciendo la activación y polimerización de Bax y Bak, y la ruta intrínseca de la apoptosis. Y por otro lado, aunque esto es objeto de controversia, la granzima B puede procesar a las caspasas efectoras 3 y 7, pudiendo activarlas directamente. Revisado por Cullen y Martin (Cullen and Martin 2008).

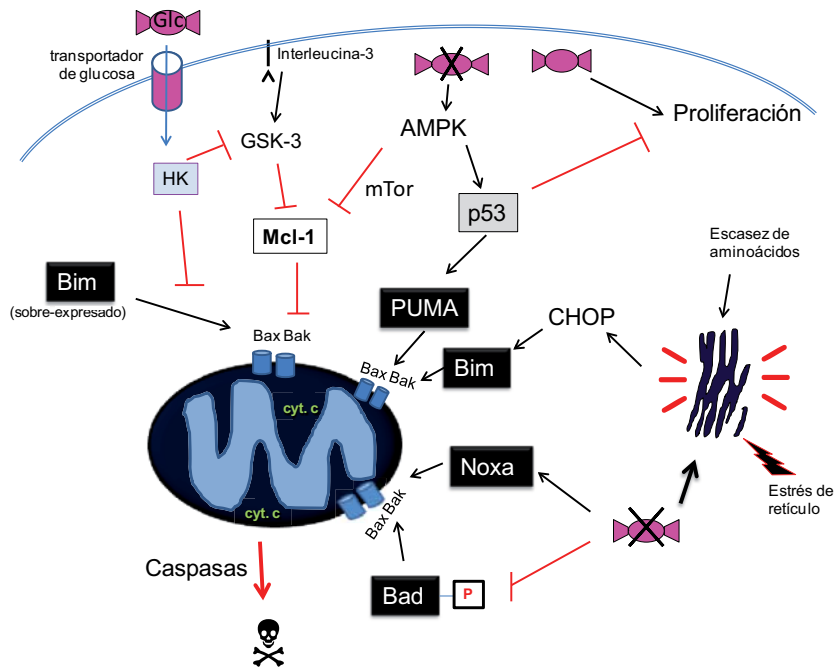
De esta manera, aparte de la ruta extrínseca e intrínseca, el sistema inmunológico utiliza otro mecanismo de inducción de apoptosis para el control de células infectadas y/o transformadas.

### **3.5. APOPTOSIS INDUCIDA POR ESCASEZ DE NUTRIENTES**

Numerosos estudios indican que la muerte inducida por escasez de nutrientes, especialmente privación de glucosa, es mediada por la vía mitocondrial. Por ejemplo, en las células hematopoyéticas FL5.12, bajos niveles de glucosa inducen la translocación de Bax a la membrana mitocondrial, caída del potencial de membrana mitocondrial y liberación de citocromo C (Vander Heiden, Plas et al. 2001).

Otro ejemplo, la privación de glucosa induce muerte que puede ser inhibida por Bcl-2 en células MCF-7 (Lee, Galoforo et al. 1997).

La glutamina es otro nutriente esencial, y puede ser un nutriente energético, especialmente en células tumorales. De hecho, la actividad de la glutaminasa correlaciona con el crecimiento tumoral (Perez-Gomez, Campos-Sandoval et al. 2005).



**Figura 10: La escasez de nutrientes induce la activación de las proteínas sólo BH3.**

Hay estudios que indican que la privación de glutamina induce apoptosis que puede ser inhibida por la sobre-expresión de Bcl-2 o un dominante negativo de caspasa-9 (Yuneva, Zamboni et al. 2007). Además, demostraron que la caspasa-8 no estaba implicada porque la expresión de un inhibidor viral de caspasa-8 no protegía de la privación de glutamina.

También se han descrito varias proteínas “sólo BH3” implicadas en la muerte por escasez de nutrientes. Entre estas, Bad se ha visto implicada en la muerte por privación de glucosa además de estar implicada en el metabolismo de la glucosa en sí (Danial 2009). Bad

está presente en un complejo de la mitocondria en el que está la enzima glucokinasa (hexoquinasa IV). Además de actuar como un sensor de glucosa en sangre y ayudar a retirar glucosa de la sangre. La privación de glucosa lleva a la de-fosforilación de BAD y a una muerte celular dependiente de Bad.

El hecho de que la misma región de la proteína esté implicada en ambas funciones, la BH3 y la del metabolismo de la glucosa, hace que no se sepa si la implicación de Bad en la muerte por privación de glucosa sea a través de su efecto en las proteínas Bcl-2 o indirectamente a través de su efecto en la glicolisis.

PUMA es otra proteína “sólo BH3” que se induce con la privación de factores de crecimiento. Además se ha visto recientemente que PUMA es inducida tras privación de glucosa en células murinas hematopoyéticas (Zhao, Coloff et al. 2008). Los autores describen que la inducción de PUMA es a través de la actividad de p53 y que un aumento en el metabolismo de la glucosa puede contrarrestar e inhibir la actividad de p53.

Bim es una de las mejor estudiadas proteínas BH3. Bim es esencial para la ejecución de algunos estímulos apoptóticos que pueden ser inhibidos por Bcl-2. Entre estos estímulos está la privación de factores de crecimiento o la supresión de las células T autorreactivas.

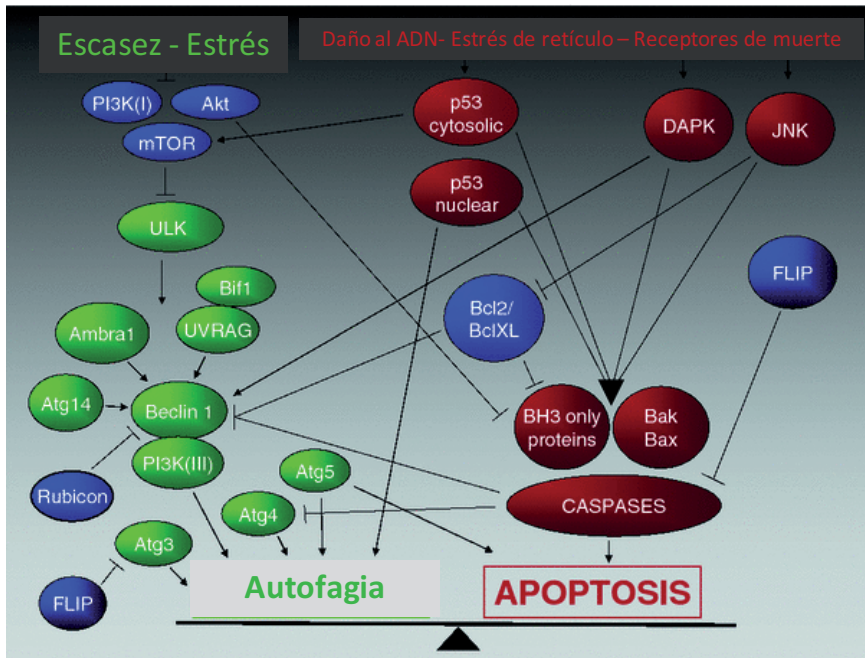
Uno de los efectos de la privación de nutrientes en general y de glucosa en particular es el estrés reticular. Los aminoácidos son necesarios para la síntesis de proteínas y glucosa para la glicosilación. Un malfuncionamiento de alguno de los procesos lleva a acumulación de proteínas mal plegadas que induce estrés reticular. Además se ha descrito que Bim está envuelto en la activación de la ruta mitocondrial de la apoptosis tras privación de glucosa, probablemente por estrés reticular inducido por la inhibición de la glicolisis (Zhao, Coloff et al. 2008). Así como por privación de aminoácidos (Bruhat, Jousse et al. 1997). En ambos casos parece ser a través de la inducción de la proteína CHOP.

Noxa es otra proteína “sólo BH3” que puede mediar apoptosis inducida por estrés reticular (Li, Lee et al. 2006) y por privación de glucosa. Se ha visto que Noxa está envuelta en apoptosis de células Jurkat tras privarlas de glucosa, además el silenciamiento de Noxa confirió ventaja selectiva a linfocitos T en medio de cultivo con baja

concentración de glucosa (Alves, Derks et al. 2006). Noxa es un antagonista del análogo de Bcl-2, "Mcl-1". Los autores creen que la acción de Noxa en estas condiciones es a través de la inhibición de Mcl-1, ya que al silenciar Mcl-1, las células se hacen más sensibles a la privación de glucosa. Además, Mcl-1 es regulado por el metabolismo glicolítico, lo que sugiere que la bajada de los niveles de Mcl-1 puede ser relevante para la apoptosis inducida por la falta de glucosa.

Mcl-1 es esencial para el desarrollo embrionario. El estrés causa la inactivación de eIF-2a, lo que baja los niveles de Mcl-1. Por otro lado, diferentes quinasas pueden inducir la estabilización de Mcl-1 fomentando su actividad antiapoptótica. GSK3 es una proteína que es negativamente inhibida por AKT y PKC, y positivamente regulada por JNK. En células con alta tasa glicolítica, como tumores o linfocitos, GSK3 está inhibida incluso casi en ausencia de factores de crecimiento, manteniendo así bajos niveles de PUMA y estable la presencia de Mcl-1 (Zhao, Coloff et al. 2008). Se ha visto que muchos tumores inactivan al supresor de tumores PTEN, generando resistencia a la privación de suero. Esta resistencia se debe a una sobre-expresión de Mcl-1 (Austin and Cook 2005). Considerando al oxígeno un nutriente, la anoxia, o sea la falta de oxígeno, suele matar a las células por la ruta intrínseca de la apoptosis. Esto se sabe porque la sobre-expresión de Bcl-2 y Bcl-xL, o la deficiencia en caspasa-9 o Apaf1, protege de la anoxia. De hecho la anoxia induce muerte debido a la degradación de Mcl1 a través del proteosoma (Shroff, Snyder et al. 2007).

### 3.6. APOPTOSIS Y AUTOFAGIA



**Figura 11: Esquema de las relaciones entre las rutas de la apoptosis y la autofagia.** (modificada de (Fimia and Piacentini 2010))

Durante mucho tiempo, a la hora de describir los diferentes tipos de muerte celular, se ha clasificado a la autofagia como una forma de muerte, llamada de tipo II. Nosotros no la vamos a clasificar como muerte celular. Es evidente que una célula con una masiva autofagia, terminará auto-digiriéndose o la mitofagia masiva dejará sin ATP a la célula. Porque al contrario de lo que se dice en numerosos artículos, la autofagia no es una fuente de ATP, más bien al contrario, necesita de ATP para su correcto funcionamiento. Por ejemplo, es necesario el mantenimiento de un pH de 4.5 en el interior del lisosoma para que las enzimas estén activas. Para ello, en la membrana del lisosoma existen unas bombas de protones que son dependientes de ATP.

Si como digo, la mitofagia es masiva, la capacidad de generar ATP se verá muy afectada, por lo que ante una autofagia crónica o masiva, la células morirá. Pero lo hará no por autofagia, sino por los mecanismos que este estrés desencadene. Si se produce activación de caspasas hablaremos de apoptosis, si no, de necrosis.



Como decíamos en el capítulo dedicado a la autofagia, este es un proceso homeostático, necesario para el reciclaje de componentes y nutrientes en la célula, y una respuesta ante la escasez de nutrientes. Que conlleva la digestión de componentes intracelulares por enzimas lisosomales.

Esto que decimos no quiere decir que no haya una comunicación y una relación estrecha entre la apoptosis y la autofagia. Vamos a poner varios ejemplos revisados por Fimia et al (figura 10) (Fimia and Piacentini 2010).

AKT regula negativamente tanto apoptosis, a través de la fosforilación de proteínas sólo BH3, y la autofagia, a través de la activación de mTOR.

Una de las interacciones más llamativas es la de Bcl-2 y Beclina-1. A través del dominio BH3 de la última. Por lo tanto Bcl-2 estaría inhibiendo dos procesos, la apoptosis y la autofagia. Y por otro lado, una excesiva inducción de autofagia, o de Beclina, generaría que Bcl-2 fuera secuestrado por Beclina, dejando libre al resto de BH3. Esto podría llevar a apoptosis, en este caso promovida por la inducción de autofagia. Además Beclina es sustrato de caspasas. De esta manera, durante la apoptosis se vería inhibida una posible acción protectora de la autofagia.

Atg5 es una proteína esencial para la autofagia. Fibroblastos murinos deficientes en Atg5 son más sensibles a ligandos de muerte y privación de nutrientes pero por otro lado son más resistentes a radiación ultravioleta y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como a estrés del retículo endoplásmico. También se ha descrito que el corte de Atg5 por calpaína, sensibilizaría a las células a apoptosis (Yousefi, Perozzo et al. 2006) al interaccionar la proteína procesada con Bcl-xL, lo que conlleva la activación de Bax y Bak y la liberación del citocromo C de la mitocondria. En el sistema inmunológico, después de una infección es necesaria una rápida eliminación de todos los linfocitos que han tomado parte. Se ha descrito que en linfocitos T se crea un complejo formado por elementos del DISC, junto con proteínas relacionadas con la autofagia como Atg5, Atg12 and Atg16L (Bell and Walsh 2009) Bell et al. sugieren que la formación del autofagosoma estaría induciendo actividad caspasa-8.

### 3.7. NECROSIS

Se la clasificó como una forma de muerte no controlada, en el que se produce la rotura de la membrana citoplasmática y el contenido es liberado al exterior. Esto se ha relacionado con inflamación, ya que el contenido citoplasmático liberado puede generar una respuesta inmunológica.

La eliminación de las células muertas por apoptosis es diferente a las por necrosis. Las células apoptóticas son engullidas por los macrófagos de manera rápida y eficiente sin liberación del contenido citoplasmático. Sin embargo, durante la necrosis las células se hinchan y explotan, y los restos son sólo parcialmente “recogidos” por los macrófagos por macropinocitosis (Krysko, Denecker et al. 2006).

Esta característica es importante en el desarrollo de los tumores. Existe la idea de que la necrosis induce inflamación, y que esto es negativo en el tratamiento antitumoral debido a que la inflamación genera angiogénesis. Sin embargo, otros autores afirman que esa inflamación es beneficiosa, debido a que lo que hace es activar al sistema inmunológico que atacaría al tumor. Entraremos en esto con más detalle más adelante.

Golstein y Kroemer (Golstein and Kroemer 2007) revisaron el concepto de necrosis. Su planteamiento es que la necrosis, en condiciones fisiológicas, no es una forma descontrolada de muerte. Descontrolada en el sentido de que no ha evolucionado, no forma parte de la fisiología de los organismos, sino que es estocástico. La necrosis puede ser indiscriminada, sin rutas de activación y señalización claras, y pasiva. Esto lo vemos in vitro cuando añadimos una gota de lejía a las células. Pero también puede tener una serie de elementos comunes y ser fisiológica. Por ejemplo, la necrosis ocurre durante el desarrollo en la muerte de los condrocitos durante el desarrollo del hueso. O en el adulto, en las células epiteliales del intestino. Además puede ser desencadenada por ligandos como el TNF (necroptosis). Esto indica que existen rutas que al ser activadas desencadenan necrosis y no apoptosis. Y estas rutas pueden ser impedidas mediante la inhibición de algún elemento clave de la misma.

En ocasiones, el que el resultado del estímulo sea necrosis y no apoptosis, es debido a que la segunda forma de muerte está impedida. Por ejemplo, un estímulo como la isquemia, que produciría apoptosis en células normales, en ausencia de Bax y Bak, y con la

autofagia inhibida, se induce necrosis (Degenhardt, Mathew et al. 2006). Esto puede parecer poco fisiológico, pero muchos tumores bloquean tanto la apoptosis como la autofagia. En otras ocasiones, simplemente con inhibir las caspasas se sensibiliza a las células al estímulo que inducía apoptosis. O sea, si el TNF inducía apoptosis, en presencia del inhibidor de caspasas z-VAD, hace falta menos TNF para matar a las células por necrosis (Vercammen, Beyaert et al. 1998).

Se han descrito varias proteínas implicadas en la inducción de necrosis:

- **RIPK1** que induce necrosis dependiente de TNF, o necroptosis, que veremos en detalle más adelante.
- **Ciclofilina D**: Es una proteína de la matriz mitocondrial, que parece ser responsable de la apertura de canales en la membrana mitocondrial que la despolarizan.
- **Otras proteasas**: En ocasiones el estímulo que induce necrosis provoca un aumento del calcio intracelular, que conlleva la activación de las calpaínas y las catepsinas tras la permeabilización de los lisosomas. Estas proteasas en el citoplasma pueden a su vez inducir muerte de varias maneras.

¿Significa esto que la necrosis es un fenómeno fisiológico, utilizado por los organismos en su desarrollo y supervivencia? Probablemente sí, pero hacen falta más estudios que demuestren un programa genético y molecular, más proteínas que participen en la necrosis, cuya inhibición proteja de la misma y sobre-expresión sensibilice. Aunque difícilmente estas moléculas formarán parte únicamente de un tipo de muerte, sino probablemente de más de uno.

### 3.7.1. NECROPTOSIS

Poco a poco se han ido descubriendo elementos característicos de la necrosis, que la pueden definir como un proceso común y conservado. La necroptosis se define como necrosis dependiente de la actividad kinasa de RIPK1 (Degterev, Hitomi et al. 2008).

La estimulación de los receptores Fas y de TNF por sus ligandos en un estado competente para la apoptosis, genera la activación de la caspasa-8. Sin embargo, si la apoptosis no se puede dar por alguna razón, se puede producir necroptosis. Se han descubierto unos 432

genes que pueden regular necroptosis, 32 de ellos reguladores de RIPK1. Existen genes como Bmf, una proteína BH3, que están implicados en apoptosis y necroptosis (Hitomi, Christofferson et al. 2008).

El descubrimiento de un inhibidor específico de la actividad kinasa de RIPK1, la necrostatina, ha ayudado al estudio de esta forma de muerte, y a descubrir que está asociada a varias patologías como daño cerebral por isquemia, infarto de miocardio o toxicidad por quimioterapia.

Hace años que se conoce que los ligandos de muerte como Fas-L pueden inducir una muerte independiente de caspasas en linfocitos T, tanto activados como no activados.

Esta muerte independiente de caspasas que se da en linfocitos no transformados además de no ser inhibida por z-VAD, es dependiente de FADD y de RIP, pero independiente de caspasa-8 ya que ni un dominante negativo de caspasa-8, ni CrmA, una proteína viral que bloquea su activación, podían proteger a las células de Fas-L.

Pero Holler et al. (Holler, Zaru et al. 2000) analizaron que otros ligandos como TNF y TRAIL también podían inducir esta necrosis dependiente de la actividad kinasa de RIPK1.

#### **4. MUERTE CELULAR Y CÁNCER**

Se asume que una desregulación de la muerte celular, un fallo en los mecanismos que controlan que células dañadas, infectadas por virus, proliferando descontroladamente, etc.; mueran, es una de las causas de los tumores.

Por ello, es imprescindible conocer en profundidad todos los mecanismos de muerte celular, tanto en células sanas como tumorales, para encontrar tratamientos contra el cáncer.

Aquí existe una polémica sobre si la inducción de necrosis en los tratamientos antitumorales es contraproducente o no. La necrosis, al liberar contenido celular, genera inflamación, que parece facilitar la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

La apoptosis se considera inmunosupresora. Esta inhibición del sistema inmune ocurre a través de rutas del TGF $\beta$  y de prostaglandinas E2 así como la presentación del fosfoinositol en membrana. Sin embargo, la necrosis libera moléculas estimuladoras

como citoquinas que estimulan a fibroblastos, macrófagos y células dendríticas.

Inflamación y necrosis se relaciona con mal prognosis en cáncer (Sasi, Hwang et al. 2009).

Por otro lado, la inflamación generaría una activación del sistema inmunológico innato que podría ser beneficiosa al activar células como las NK o las dendríticas (Hagemann, Balkwill et al. 2007). De hecho las células necróticas liberan HMGB1, proteína que también secretan macrófagos o células NK.

Por tanto no está claro qué tipo de muerte sería más beneficiosa para el tratamiento de tumores sólidos.

En cualquier caso hay que tener en cuenta que cualquier monoterapia puede tener consecuencias negativas a medio o largo plazo. Una población tumoral es muy variable en cuanto a sensibilidad a los tratamientos. Por ejemplo, TRAIL no induce muerte en todas las células de una población, y esa variabilidad no necesariamente es genética, ya que se ha demostrado que una población puede responder de manera diferente al tratamiento con TRAIL, y esto es debido a una variabilidad genética (Spencer, Gaudet et al. 2009). Pero si esa selección se mantiene en el tiempo, la rápida capacidad de mutación y de sufrir modificaciones epigenéticas, hace que los tratamientos con una sola droga puedan ser contraproducentes.

## IV. OBJETIVOS

Las células deficientes en Bax y Bak son resistentes a multitud de estímulos, ya que no pueden sufrir apoptosis por la vía mitocondrial. Además se había descrito que mueren de forma independiente de caspasas ante estímulos de muerte mitocondriales. Muchos tumores emplean la estrategia de bloquear la ruta mitocondrial de apoptosis para escapar de la muerte programada. Pero aún así los tumores suelen ser muy sensibles a la inhibición del metabolismo de la glucosa. Además, se había descrito que la privación de glucosa podía inducir una muerte que en principio no era apoptótica, pero en la que estaba implicada la caspasa-8.

Por último, resultados previos del grupo indicaban que las células deficientes en Bax y Bak podían morir de forma dependiente de caspasas cuando eran privadas de glucosa, porque el inhibidor z-VAD las protegía.

Por todo ello, consideramos importante:

1. Caracterizar la muerte inducida por la privación de glucosa tanto en fibroblastos murinos como en líneas tumorales humanas.
2. Averiguar cuál es la caspasa iniciadora implicada, si efectivamente era apoptosis
3. Estudiar el mecanismo de activación de la muerte inducida por privación de glucosa.
4. Investigar la relación entre el metabolismo de la glucosa, la autofagia y la apoptosis.



# V. MATERIALES Y MÉTODOS

## 1 MATERIALES

### 1.1. LÍNEAS CELULARES

- MEFs:

Se han utilizado fibroblastos murinos inmortalizados mediante SV-40. Estos fibroblastos proceden de ratones silvestres (WT) o deficientes en los genes Bax y Bak (DKO). Ambas líneas celulares provienen de la misma inmortalización (Wei, Zong et al. 2001).

- MCF7:

Línea celular tumoral, derivada de una efusión pleural de adenocarcinoma mamario humano (Soule, Vazquez et al. 1973). Estas células son deficientes en caspasa-3.

- HeLa.

Línea celular humana que originalmente provenía de un cáncer cervical de Henrietta Lacks. Fue aislada por George Otto Gey en 1951. Posteriormente la línea celular ha sufrido una serie de contaminaciones de otras líneas tumorales humanas.

- RH30

Línea de rhabdomyosarcoma alveolar, cortesía del Dr. Martínez.

- PHOENIX-ECO:

Línea celular derivada de las HEK293, que son células embrionarias de riñón humanas. Se utilizan como empaquetadoras de retrovirus.

### 1.2. REACTIVOS

#### a) MEDIOS DE CULTIVO

DMEM de Gibco. Sin piruvato y alta concentración de glucosa.

DMEM sin glucosa de Gibco y sin piruvato.



b) LIGANDOS DE MUERTE:

<b>Tabla 2: LIGANDOS DE MUERTE Y REACTIVOS BLOQUEANTES DE LOS LIGANDOS O RECEPTORES</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>COMPAÑÍA</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> : Factor de necrosis tumoral alpha	Preprotech	1ng/ml donde no se indique lo contrario
<b>Jo2</b> : Es un antiFas murino	BD Pharmingen	0,1 $\mu$ g/ml
<b>FasL</b> : Ligando de Fas	Enzo Life Sciences	En pie de figura
<b>TRAIL</b> : Es una citoquina de la familia del TNF	Preprotech	En pie de figura
<b>Anti receptor tipo I de TNF /p55</b>	BD Pharmingen	“
<b>Anti ligando de Fas</b> (clon MFL3)	BD Pharmingen	“
<b>FasFc</b> : Antagonista de Fas	BD Pharmingen	“
<b>TRAIL-R-Fc</b> : Antagonista del receptor I de TRAIL	(R&D)	“
<b>anti-TRAIL</b> (N2B2). Anticuerpo frente a TRAIL murino.	Donado por Edith Janssen	“
<b>TNF-R-Fc</b> (Enbrel®/etanercept). Proteína recombinante resultado de la fusión del receptor II de TNF y el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. Es muy estable, se une a TNF específicamente, impidiendo su unión con el receptor de membrana.	Wyeth	“

c) DROGAS E INHIBIDORES

<b>Tabla 3: Drogas e inhibidores, su función y proveedor</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>COMPAÑÍA</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>Cicloheximida</b>	Sigma	Inhibidor de la síntesis de proteínas en organismos eucariotas. Producida por la bacteria <i>Streptomyces griseus</i> . Interfiere con la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S. En los experimentos con TNF- $\alpha$ se utiliza a 5 $\mu$ M en todos los experimentos excepto cuando se indique lo contrario, siempre pre incubando al menos 30 minutos.
<b>Cloruro de cobalto</b>		Imita el tratamiento con hipoxia e induce la expresión de HIF-1 (Wang and Semenza 1993). Se utilizó a 0.3mM.
<b>3-Metil Adenina</b>	Sigma	Es un inhibidor de la PI3K clase-I utilizado normalmente para inhibir la autofagia.
<b>Tapsigargina</b>	Sigma	Aumenta los niveles de Ca <sup>2+</sup> intracelular al bloquear los transportadores de Ca <sup>2+</sup> al retículo.
<b>Cloroquina</b>	Sigma	Lo usamos para inhibir la autofagia porque bloquea la fusión del autofagosoma con el lisosoma, al inhibir la acidificación del lisosoma.
<b>Geldanamicina</b>	Donado por el laboratorio del Dr. John Silke.	Inhibidor de la proteína HSP90 (Proteína del shock térmico).
<b>Necrostatina</b>	Donado por el laboratorio del Dr. John Silke.	Inhíbe la actividad kinasa de RIPK1.
<b>Estaurosporina</b>	Sigma	Inhibidor de la Proteinkinasa C (PKC).
<b>Etopósido</b>	Sigma	Inhibidor de la enzima topoisomerasa II, causando rotura de la hebra de ADN y por tanto estrés por daño en el ADN.
<b>Compuesto A</b>	Donado por el laboratorio del Dr. John Silke.	Un compuesto sintético análogo de SMAC, antagonista de cIAP. Se utilizó a 500nM.

d) INHIBIDORES QUÍMICOS DE CASPASAS:

**q-VD-OPH:** 20  $\mu$ M, **z-VAD-fmk:** 50  $\mu$ M, **VDVAD-fmk:** 50  $\mu$ M, **IETD-fmk:** 50  $\mu$ M y **LEHD-fmk:** 50  $\mu$ M.

e) ANTIBIÓTICOS:

Antibióticos de selección: Higromicina (Invivogen), Puromicina, Geneticina (G418) de Gibco, Zeocina de Invivogen.

Antibióticos para prevenir contaminaciones: Penicilina y Estreptomicina. Labclinics

f) OTROS REACTIVOS COMUNES:

**L-glutamina:** Invitrogen.

**Anexina V** –fitc. Immunostep. Es una proteína con alta afinidad por la fosfatidilserina. Se utiliza en el análisis de apoptosis.

**Yoduro de propidio** (PI) Sigma. Se utiliza para estudiar muerte celular, entra sólo en células permeabilizadas.

**RNAsa.** Invitrogen.

**Bromuro de etidio.** Sigma. Se utiliza para detectar ADN en electroforesis.

**Agarosa.** Pronadisa condalab. Se utiliza para hacer geles para electroforesis de ADN.

**Acrilamida.** BioRad. Para hacer geles de electroforesis (proteína y ADN).

**ECL.** ThermoScientific. Emite luz al reaccionar con la peroxidasa de rábano unida a los anticuerpos secundarios para western blot.

**Polybrene.** Sigma. Aumenta la eficiencia de la infección.

**Ac-DEVD-AMC:** BD Pharmingen, es un tetrapéptido sintético fluorogénico que contiene la secuencia de aminoácidos del sitio de corte de PARP en Asp-216. Se utiliza como indicador de la actividad de la caspasa-3.

**Lipofectamina 2000.** Invitrogen.

**Dharmafect.** Dharmacon

**Cóctel de antiproteasas.** Roche.

g) ANTICUERPOS

Anticuerpos utilizados para Western Blot:

**Actina** (ICN clone C4), **Bid** (R&D af860), **Caspase-8** (Alexis clone 3B10, BD Pharmingen- 518125 KC), **Caspase-3** (Cell Signaling, 9661 y 9662); **co-chaperone p23** (Affinity Bioreagents-MA3-414), **Bcl-xL** (BD Pharmingen cat.556361), **Fadd**: Immunotech (MBL). **PARP**: (Cell Signaling, 9542). **clAP1** (AF817 RD y otro generado en el laboratorio del Dr. David Vaux en la universidad La Trobe de Melbourne. **RIPK1**: (BD Bioscience, 610458), **p62** (Progen, GP62-C).

Anticuerpos secundarios. Anti-Rabbit y Anti-Mouse de Zymed (Invitrogen). Y anti- guinea pig (Abcam).

h) ARN DE INTERFERENCIA:

<b>Tabla 4: Secuencias de los ARNs de interferencia utilizados</b>	
Caspasa-8	shRNA: AACGACTGCACTGCAAATGAAA
	siRNA: secuencia 1: 5'CAGACAAAGUUUACCAAU[dT][dT] secuencia 2: 5'CUACCGAGAUCCUGUGAAU[dT][dT]
Caspasa-8 humana	ON-TARGETplus siRNA una mezcla de 4 oligos de Dharmacon
FADD	siRNA: secuencia 1: TGGATGGGATTGAGGAGAA secuencia 2: CTGAAAGTCTGGAAGAATG
siRNA Control	pblue: 5-GUAAGACACGACUUAUCGC-3.
RIPK1	ON-TARGETplus siRNA una mezcla de 4 oligos de Dharmacon
P62	ON-TARGETplus siRNA una mezcla de 4 oligos de Dharmacon
Caspasa-9	Secuencia 1 5'-CGCCAGAGGTTCTCAGACCAGA Secuencia 2 5'-CGGCCACTGCCTCATCATCAAC

i) CEBADORES PARA PCR

FasL murino:

5'-GCAAATAGCCAACCCCAGTACAC-3'

5'-GCCACCTTTCTTATACTTCACTCCAG-3'

TRAIL murino:

5'-CCTCTCGGAAAGGGCATTTC-3'

5'-TCCTGCTCGATGACCAGCT-3'

TNF- $\alpha$  murino:

5'-ATCCGCGACGTGGAAGT-3'

5'-ACCGCCTGGAGTTCTGGAA-3'.

j) CONSTRUCCIONES:

- pBABE-puro-Bcl-xL.
- Histone 2B-GFP fue un regalo del Dr. R Agami (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Holanda).
- pMX-IRES-GFP con CrmA cDNA (donado por J. P. Medema).
- LZRS-MS-IRES-eGFP codificando c-FLIPL.
- DN-FADD IRES GFP
- LZRs GFP-LC3 ires zeocine

k) TAMPONES COMUNES.

- **TAE 50 X**

242 gr Tris Base

100 ml EDTA 0.5 M pH 8

57.1 ml Ácido Acético Glaciar (Panreac)

Hasta 1 litro de Agua

- **TAMPÓN LAEMMLI 4x (Sample buffer):**

12.5 ml 4x Tris-CIH/SDS, pH 6.8 (6.05 g Tris base en 40 ml H<sub>2</sub>O, ajustar pH, añadir 0.4 g de SDS, completar hasta 100 ml H<sub>2</sub>O)

10 ml glicerol

2 g SDS (final 8%)  
1 ml 2-ME o 3.1 g DTT  
0.5 mg azul de bromofenol  
H<sub>2</sub>O hasta 25 ml

- **TAMPÓN DE LISIS 4x:**

12.5 ml 4x Tris-ClH/SDS, pH 6.8 (6.05 g Tris base en 40 ml H<sub>2</sub>O,  
ajustar pH, añadir 0.4 g de SDS, completar hasta 100 ml H<sub>2</sub>O)

2 g SDS (final 8%)  
H<sub>2</sub>O hasta 25 ml

- **TBS 10X**

(pH 7.6)

24.2 gr Tris Base (Roche)  
80 gr NaCl (Sigma)  
Hasta 1 litro de agua

- **CRISTAL VIOLETA**

0.2% de polvo de cristal violeta en un 2% de etanol.



## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS

Todas las líneas celulares se han crecido a 37° en placas de petri para cultivo celular (BD), con un 5% de CO<sub>2</sub> en DMEM sin piruvato, alta concentración de glucosa (Gibco), enriquecido con 2mM de glutamina, 200 mg/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina y un 10% de suero bovino fetal inactivado (Invitrogen).

Para los tratamientos se siembran 150.000 células por ml, y se trataban 24 horas después, cuando habían alcanzado 500.000 células/ml. Estos números corresponden con una confluencia celular en el momento del tratamiento de un 80%. Los fibroblastos inmortalizados crecen un poco más de 3 veces al día, por ello las sembramos alrededor del 20-30%, para que al día siguiente esté en un estado “sub-confluente” para tratar.

**Retirada de Glucosa:** Se usa medio de cultivo DMEM sin glucosa ni piruvato, con 2mM de glutamina. Las células se lavan con este medio y se incuban con este DMEM más un 10% de suero bovino fetal inactivado dializado.

La diálisis del FBS consiste en llenar una membrana de diálisis con el suero normal y sumergirla en PBS 3 veces: la 1ª vez 1 hora, la 2ª toda la noche y la 3ª otra hora, siempre a 4°C, de manera que la dilución final sea 1:500. Se filtra y alícuota.

En todos los experimentos en el que el tratamiento está disuelto en DMSO se puso un control con DMSO sólo. A una concentración 1:1000 si no se especifica lo contrario.

### 2.2. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

**Disminución de los niveles de proteína mediante ARN de interferencia.**

Dependiendo de la cantidad de células transfectadas que necesitemos se siembran en placas de 6 o 10 cm de diámetro al 10% de confluencia para transfectarlas al 50%.



Transfección: Depende de si se hace con Lipofectamina 2000, o con Dharmafect.

Lipofectamina: Se lavan las células con medio DMEM sin suero y sin antibióticos. Mientras tanto se mezclan 150  $\mu$ l de DMEM con 3  $\mu$ l de Lipofectamina (1 $\mu$ l/0.5ml) se deja 5 min. Y otros 150ul de DMEM con oligo para una concentración final de 100 nM. Se mezclan los oligos con la Lipofectamina durante 20 minutos y se añaden a las células. Se incuba durante 6 horas y se cambia el medio por medio completo.

Dharmafect. Cuando se transfecta con Dharmafect, se utilizan 2 $\mu$ l/0.5ml y se puede dejar el siRNA hasta el momento de utilizar las células.

### **Expresión de ADN exógeno.**

Para transfectar ADN, las células al 50% de confluencia se lavaron con DMEM sin suero ni antibiótico, y se incubaron 6 horas con una mezcla de 2 $\mu$ l/ml de Lipofectamina 2000 y plásmido (cantidad variable dependiendo del plásmido). Igual que con el siRNA, hay que incubar el ADN y el liposoma en un volumen pequeño durante 20 minutos antes de añadirlo a las células. Se retira este medio a las 6 horas de incubación.

### **2.3. TRANSFECCIONES ESTABLES.**

De manera general, tienen como objetivo introducir ADN exógeno y generar una población de células que lo exprese de manera duradera en el tiempo tras sucesivas replicaciones. Utilizamos dos métodos:

#### **Retrovirus:**

- **Expresión de proteínas.**

El plásmido de interés, con un promotor retroviral, se transfecta en células empaquetadoras de manera transitoria. En estas células se producirán virus, generando un sobrenadante infectivo. Se recogen los sobrenadantes a las 24 y a las 48 horas y se filtra. Se puede alicuotar y congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Con este sobrenadante infectivo, en presencia de 8  $\mu\text{g/ml}$  de Polybrene, se incuban las células a infectar toda la noche. A la mañana siguiente se les cambia por medio fresco, y se vuelve a incubar con el sobrenadante que recogimos a las 48 horas de la transfección. Las células infectadas que expresen el plásmido de

interés serán seleccionadas, bien mediante un antibiótico de selección, o mediante sorting si el plásmido expresa una proteína fluorescente.

- **Disminución de los niveles de proteína mediante ARN de interferencia.**

En primer lugar, se identificaron las secuencias de los siRNAs eficientes en el silenciamiento de las proteínas de interés.

A continuación, se diseñaron oligos para shRNAs, de unos 60 nucleótidos que contenía la secuencia interferente que anteriormente habíamos identificado y cuya composición era apropiada para su inserción en el vector pSUPER. Tras la inserción, se transfectaron las células empaquetadoras Phoenix-Eco. A continuación se infectaron las células de interés.

Clonación.

Para evitar la variabilidad clonal en una población de células, se eligió mediante western blot el conjunto de células infectadas con un oligo determinado que menos proteína expresaba. El cultivo se diluyó a 10 células/ml, 5 cel./ml y 3 cel./ml, sembrándolas en 3 placas de 96 pocillos. De la placa que presentaba alrededor de 40 pocillos positivos se escogieron al azar 12. Éstos se crecieron y se vieron los niveles de proteína por western blot. De esta manera nos aseguramos de que una población de células procede de una sola célula.

### **Transfecciones estables por selección.**

Tras una transfección transitoria, cuando el plásmido tiene un marcador de selección, se tratan las células 24 horas después de la transfección con su antibiótico específico. Así se seleccionarán las células que contengan plásmido.

## **2.4. MEDICIÓN DE LA MUERTE CELULAR:**

Hay infinidad de métodos para medir muerte celular. Muchos de ellos son kits comerciales basados en actividad metabólica. El hecho de que nuestros tratamientos se basen en la alteración del metabolismo nos ha impedido utilizarlos.

Para elegir un método de análisis de la muerte celular tenemos que tener en cuenta qué es lo que esperamos ver, si necrosis o apoptosis,

o una mezcla de ambas. Además de que algunas de estas técnicas no distinguen correctamente entre ambas.

#### **2.4.1. MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD POR CRISTAL VIOLETA.**

EXPERIMENTOS DE CLONOGENICIDAD.

Las células después del tratamiento se tripsinizaron, centrifugaron y fueron resuspendidas en medio completo en el volumen inicial. A continuación se vuelven a sembrar y se dejan crecer el tiempo necesario hasta que sea visible tras teñir con cristal violeta (aproximadamente 3-4 días).

La tinción se lleva a cabo retirando el medio, lavando con PBS, incubando con una dilución de cristal violeta con un 2% de etanol durante unos 15 minutos y lavando con PBS.

#### **2.4.2. DETECCIÓN DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO:**

El citómetro utilizado es un Becton Dickinson (FACS SCALIBUR) en los servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona, Campus de Bellvitge.

- **ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR (SUBG1)**

**(FRAGMENTACIÓN DE ADN)** (Gong, Traganos et al. 1994).

Tras tratar las células, se tripsinizan y centrifugan a 450 rcf., y se fijan y permeabilizan las células con etanol al 70%, de manera que el ADN degradado o fragmentado saldrá de la célula, quedando la cantidad de ADN inferior a  $2n$  (subG1). Antes de analizarlas en el citómetro se incuban media hora a 37°C con una solución de RNAsa (100 µg/ml) y Yoduro de propidio (40 µg/ml).

Las células apoptóticas se detectaron y cuantificaron como la fracción del ciclo celular con menor contenido en ADN que las células que se encuentran en el pico G1 del ciclo celular.

Así es como se visualiza en el citómetro de flujo una población normal y otra en apoptosis.

- **ANÁLISIS POR INCORPORACIÓN DE YODURO DE PROPIDIO**

Tras el tratamiento se recogen las células, se centrifugan y se resuspenden en PBS. 5 minutos antes de analizarlas en el citómetro se les añade 0.5 µg/ml de yoduro de propidio. El yoduro de propidio es internalizado en células muertas, por lo que todas las células positivas para yoduro estarán muertas. Con este método se mide muerte total.

- **ANÁLISIS POR ANEXINA V.**

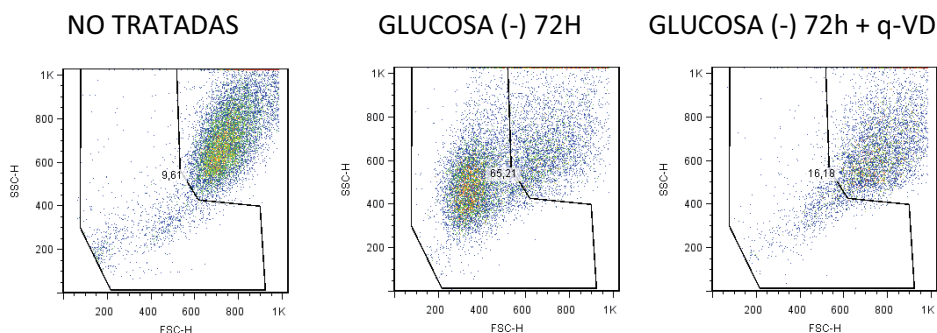
Esta técnica fue descrita en 1994 (Koopman, Reutelingsperger et al. 1994), se basa en la exposición de la fosfatidil serina en las células que están sufriendo apoptosis. Esta externalización se produce antes de que la membrana sea permeable al yoduro de propidio. A diferencia de la necrosis, en la que la rotura de la membrana y su permeabilización a yoduro de propidio se produce al mismo tiempo que la exposición de fosfatidilserina. Por ello, para utilizar la Anexina V como análisis de apoptosis es necesario combinarla con un reactivo de exclusión como el yoduro de propidio o el 7AAD.

Si existe una población positiva para Anexina y negativa para yoduro de propidio es porque hay apoptosis. Al final las células apoptóticas sufren necrosis secundaria y se vuelven positivas para Anexina y yoduro de propidio.

Pero esto tiene el inconveniente de que en poblaciones celulares en la que la muerte no es sincrónica, el número de células que en cada momento está sufriendo apoptosis, pero aún no es permeable a yoduro de propidio es muy bajo.

- **ANÁLISIS POR TAMAÑO CELULAR.**

Existen líneas celulares que a pesar de sufrir apoptosis no inducen corte de ADN, por lo que no es posible medir muerte mediante subG1. En estos casos se puede medir el porcentaje de células muertas a partir del tamaño (FSC) y complejidad (SSC) celular. Como se puede observar en esta figura.



**Figura 1: Representación de la distribución de células fijadas.** Eje horizontal FSC (tamaño). Eje vertical SSC (complejidad).

### 2.4.3. ACTIVIDAD CASPASA-3.

Substrato Ac-DEVD-AMC

El substrato de caspasas Ac-DEVD-AMC (donado por el laboratorio de I. Fabregat) de BD Pharmingen, es un tetrapéptido sintético fluorogénico que contiene la secuencia de aminoácidos del sitio de corte de PARP en Asp-216. Se utiliza como indicador de la actividad de la caspasa-3 porque es la que con más afinidad y más eficientemente corta dicho péptido a las concentraciones utilizadas, pero no es específico de dicha caspasa. Cuando la caspasa corta el tetrapéptido entre D y AMC, se libera el fluoróforo AMC que es cuantificado con un fluorímetro.

<b>Tabla 5: Tampones utilizados en la técnica de actividad caspasa-3</b>	
<b>TAMPÓN de LISIS</b>	<b>Tampón de reacción</b>
5 mM Tris- HCl pH: 8	Hepes 1 M pH: 7.5
20 mM EDTA	Glicerol 87 %
0.5 % TRITÓN- x 100	DTT 1M
Mili Q	Mili Q

Las células tratadas se tripsinizan y lavan en PBS, centrifugando a 4500 rpm, 10' a 4°C. Se lisan con el "Tampón de lisis" (ver tabla), se incuban 10 minutos en hielo, se centrifugan a 13000 rpm 10 min a 4 °C, el sobrenadante se alícuota y se guarda a -80 °C. Se utilizan 20 µg de proteína en un volumen de 150 µl en tampón de reacción más el substrato (AC-DEVD-amc) a una concentración final de 20 µM. Tras incubación dos horas a 37°C en oscuridad, se miden en el fluorímetro.

AMC se excita a una longitud de onda de 300 nm., y emite en el rango de 430-460 nm.

Se define una unidad de actividad Caspasa 3 como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de 1 unidad arbitraria en el fluorímetro después de 2 horas de incubación con la mezcla de reacción. El resultado se expresa en unidades de actividad caspasa-3 por  $\mu\text{g}$  de proteína.

## **2.5. WESTERN BLOT:**

- Preparación de extractos celulares totales.

Tras el tratamiento las células se lisaron en tampón de lisado con un cóctel de antiproteasas y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se descongelaron en hielo, se sonicaron para degradar el ADN y se determinó la concentración de proteína usando el método de BCA (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Electroforesis de proteínas.

Se mezclaron  $40\mu\text{g}$  de proteína con el tampón Laemmli para realizar la electroforesis, y se cargaron  $20\text{-}30\ \mu\text{g}$  de proteína. Las muestras fueron hervidas durante 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . La separación de las proteínas se realizó en función de su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en una mini cubeta para electroforesis de proteínas (Mini-protean, Bio-Rad). El tampón de electroforesis con SDS fue hecho según las instrucciones de Bio-Rad.

- Transferencia de proteínas a membrana.

Las proteínas se electrotransfirieron del gel a la membrana de PVDF (Millipore) siguiendo la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad), a 200 mA por membrana durante una hora. La transferencia se verificó tiñendo la membrana mediante el colorante rojo de Ponceau S. El tampón de transferencia, con un 20% de metanol, se hizo según la receta de Bio-Rad.

- Detección de proteínas transferidas a membrana.

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de PVDF se analizaron con la ayuda de anticuerpos específicos siguiendo los pasos detallados a continuación:

- Bloqueo de la membrana durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente con 5% leche desnatada en polvo en solución TBS/0.1% Tween.

- Incubación con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 2 horas a T<sup>a</sup> ambiente o toda la noche a 4°C con agitación suave. A continuación 3 lavados de 5 minutos con TBS con 0.1% Tween.

- Incubación con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), preparado en solución de bloqueo, durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente con agitación suave. 3 lavados de 5 minutos con TBS con 0.1% Tween.

- Revelado mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Pierce). La mezcla del ECL era fresca para cada revelado.

## **2.6. RT-PCR:**

Retro transcripción y reacción en cadena de la polimerasa.

A células tratadas se le extrajo el ARN total mediante el kit de extracción Qiagen, Que consiste en unas columnas de afinidad que une el ARN total de la célula. Para evitar contaminaciones de ADN genómico, en la misma columna se añade ADNasa. Se eluye el ARN de la columna con agua destilada y se mide la concentración de ARN que es congelado a -80°C.

600 ng de ARN total se retro transcribieron a cDNA con el kit de Applied Biosystems. Para ello se incubó el ARN con los oligos-dt durante 5 minutos a 65°C. Y el resto de los componentes de la reacción se incuban 1 hora a 50°C. El cDNA resultante de la reacción se utilizó como molde para las PCRs.

## **2.7. MICROSCOPIA.**

## TINCIÓN DE NÚCLEOS CON DAPI

Después de tratar las células se tripsinizaron y fijaron con paraformaldehído al 4%. El pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de DAPI a 3  $\mu$ M y se concentraron lo máximo posible sin lavar.

Se ponen 6  $\mu$ l en un portaobjetos, el cubreobjetos se sella y se lleva al microscopio de fluorescencia. Se ven con un aumento de 60x.

## MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células, transfectadas o no, se sembraron en una cámara portaobjetos de cuatro pocillos tras tratarla con fibronectina (1  $\mu$ g/ml). A las 24 horas se trataron. Las células se llevaron al microscopía sin fijar y en el medio de tratamiento.

## MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para el análisis de la morfología nuclear o la eficiencia de una transfección se utilizó un microscopio invertido Olympus IX70 con un objetivo 20x.

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Tras el tratamiento se recogieron las células flotantes, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en un tampón 0.1M pH 7.4 a 4°C. Después de la fijación las muestras se pusieron en un tampón con un 1% de tetraóxido de Osmio, deshidratadas en gradiente de etil alcohol y embebidas en resina Spurr.





## **VI. RESULTADOS**

### **1. LAS CÉLULAS DEFICIENTES EN BAX Y BAK SON SENSIBLES A DIFERENTES TRATAMIENTOS**

#### **ANTECEDENTES**

Como se indicaba en la introducción, muchos tumores sobre-expresan Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 (Deng, Carlson et al. 2007); o inhiben la expresión o actividad de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, incluyendo a Bax y Bak.

Fibroblastos murinos embrionarios deficientes en las proteínas proapoptóticas Bax y Bak (de aquí en adelante DKO) inmortalizados con SV40 son resistentes a muchos estímulos que inducen apoptosis a través de la vía mitocondrial. Sin embargo, las DKO son sensibles a estímulos de la ruta extrínseca.

Estas características hacen a estas células muy útiles para buscar nuevas rutas apoptóticas independientes de la mitocondria y que son susceptibles de ser dianas terapéuticas.

Para determinar la sensibilidad de estas células a diversos inductores, se trataron con un panel de drogas (fig. 1). Para saber si la muerte inducida era dependiente de caspasas, el tratamiento se hizo también en presencia de inhibidores de caspasas (q-VD o z-VAD).

Tal como se había descrito (Shimizu, Kanaseki et al. 2004), la Estaurosporina y el etopósido matan a las células DKO independientemente de caspasas.

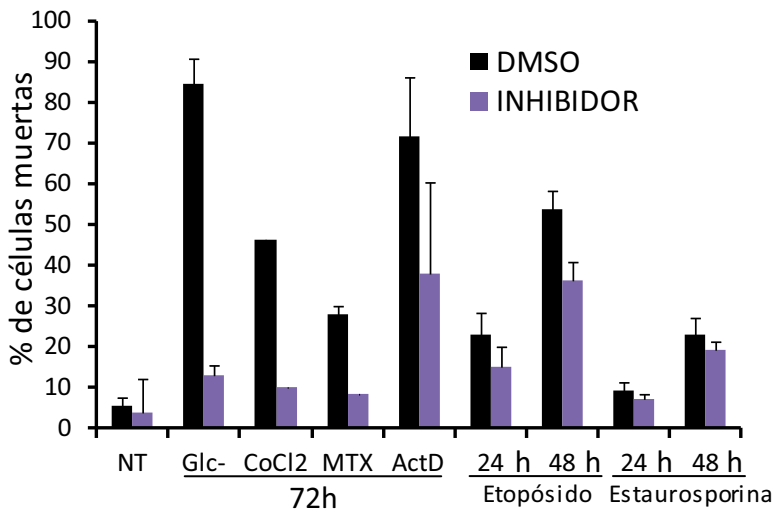
ACTINOMICINA D es un antibiótico que se une al ADN impidiendo la transcripción y replicación del mismo (Sobell 1985).

Como en el etopósido, la actinomicina D induce muerte en células DKO. En este caso el z-VAD reduce parcialmente la producción de subG1.

METOTREXATO es un fármaco utilizado para el tratamiento de varios tumores como la leucemia, o enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide. Su acción se basa en la inhibición del metabolismo del ácido fólico al bloquear irreversiblemente la actividad de la dihidrofolato reductasa.

Las DKO son bastante resistentes al metotrexato. Apenas se induce un 30% de muerte, que es dependiente de caspasas, ya que es inhibida por el z-VAD.

CLORURO DE COBALTO: El  $\text{CoCl}_2$  imita el tratamiento con hipoxia e induce la expresión de HIF-1 (Wang and Semenza 1993). Si bien se sabe que la anoxia no induce muerte en las DKO (Brunelle, Shroff et al. 2007), 0.3 mM de cloruro de cobalto induce subG1 en DKO que es revertido por la presencia de z-VAD, lo que indica que es apoptosis.



**Figura 1. Células deficientes en Bax y Bak son sensibles a diferentes tratamientos.**

Células deficientes en Bax y Bak fueron no tratadas (NT), o tratadas sin glucosa (glc-), Cloruro de Cobalto ( $\text{CoCl}_2$ , 0.3mM), Metotrexato (MTX, 100 $\mu\text{M}$ ), Actinomicina D (ActD, 10  $\mu\text{M}$ ), Etoposido (20 $\mu\text{M}$ ) o Estaursporina (1 $\mu\text{M}$ ) a los tiempos indicados. Las células fueron tratadas en presencia de DMSO (1/1000) o de los inhibidores de caspasas z-VAD o q-VD (en los de etoposido y Estaursporina). Las células fueron analizadas por citometría mediante la técnica de subG1 o por incorporación de yoduro de propidio (en etoposido y Estaursporina).

Como decía, llama la atención que células deficientes en Bax y Bak mueran de forma dependiente de caspasas tras privarlas de glucosa. El hecho de que muchos tumores tengan bloqueada de alguna manera la ruta intrínseca de la apoptosis además de su gran dependencia glicolítica hace muy interesante e importante averiguar cómo se están activando las caspasas en estas células. Además, de

forma fisiológica los tumores sólidos sufren periodos de escasez, por lo que sería importante encontrar nuevas rutas que puedan convertirse en dianas terapéuticas.

## **2. LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA PUEDE INDUCIR APOPTOSIS O NECROSIS DEPENDIENDO DE LA LÍNEA CELULAR.**

Se ha visto que la privación de glucosa puede inducir necrosis (Suzuki, Kusakai et al. 2003) y (Yuneva, Zamboni et al. 2007) o apoptosis a través de mitocondria (Vander Heiden, Plas et al. 2001). Por lo tanto, en un sistema donde la ruta intrínseca de la apoptosis está bloqueada, como ocurre en las células deficientes en Bax y Bak, esperaríamos necrosis tras privarlas de glucosa.

Sin embargo, cuando estas células son privadas de glucosa, mueren dependientemente de caspasas (fig1).

Por ello, y por la gran dependencia de glucosa que tienen los tumores, se decidió caracterizar el modo en el que la privación de glucosa inducía apoptosis en las DKO o en otras líneas celulares.

Como se puede observar en la figura 2a, células deficientes en Bax y Bak privadas de glucosa sufren apoptosis. Si comparamos la cinética con la del tratamiento a fibroblastos murinos silvestres (WT) (fig. 2b), podemos observar que la ausencia de Bax y Bak retrasa la muerte.

Por otro lado, mientras que en las DKO el z-VAD protege casi totalmente a las células, ya sea analizándolas por subG1 como por incorporación de yoduro de propidio (PI) Sin embargo en las WT esto no es así. En las WT, en presencia de q-VD, hay más células totales muertas (en rojo) que células con menos cantidad de ADN (subG1 en violeta). Esto puede indicar que ante un estímulo apoptótico como es la privación de glucosa, pero ante la incapacidad de activar caspasas por la presencia de q-VD, las células sufran muerte independiente de caspasas (CICD en inglés). Revisado en (Chipuk and Green 2005). Y es que según Colell et al. (Colell, Ricci et al. 2007), si un estímulo induce permeabilización mitocondrial pero las caspasas son incapaces de resolver la apoptosis, en ausencia de glucosa no se puede

mantener la viabilidad de la célula. Esto es lo que podría estar pasando en el caso de las WT.

Ambas líneas celulares son fibroblastos inmortalizados con el “simian virus 40”, que codifica para el “antígeno T SV40”. Este antígeno inhibe a p53, gen supresor de tumores responsable de la parada de ciclo y apoptosis. Esto podría estar afectando a la respuesta a la privación de glucosa, haciendo que el que células deficientes en Bax y Bak mueran de manera dependiente de caspasas sea una característica propia sólo de estos fibroblastos u otras células inmortalizadas.

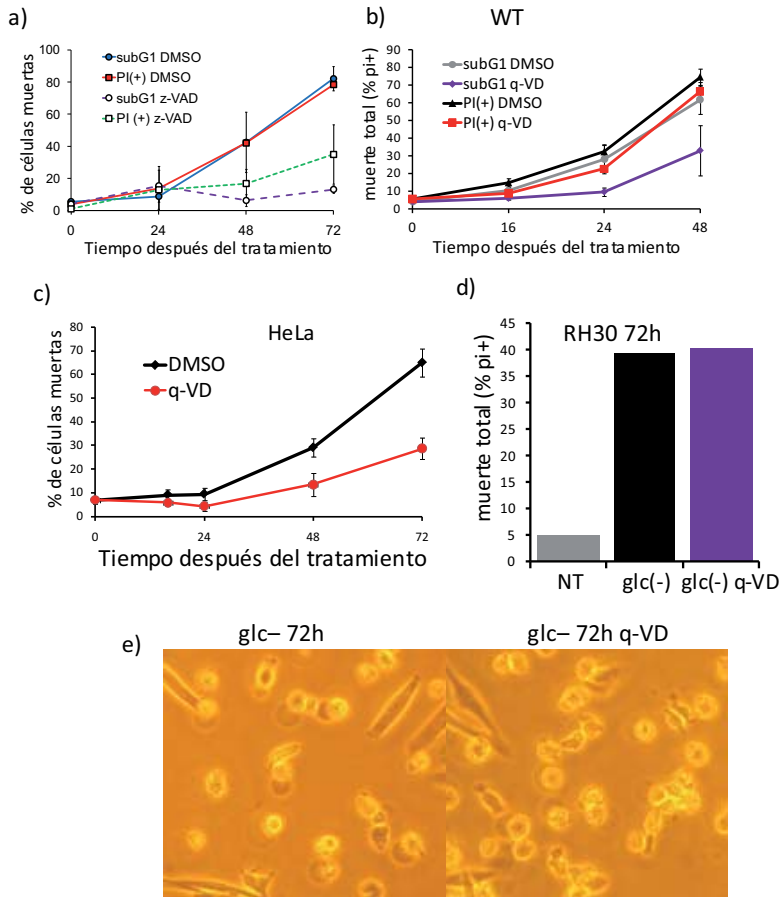
Además se ha descrito que la privación de glucosa en la línea de hepatoma humano HepG2 induce necrosis (Suzuki, Kusakai et al. 2003).

Por lo tanto, decidimos estudiar si la muerte inducida por la falta de glucosa era apoptosis o necrosis en varias líneas celulares humanas. Se trataron células de cáncer cervical, HeLa, en ausencia de glucosa.

En la figura 2c se observa que el q-VD es capaz de proteger a estas células de la privación de glucosa. Por lo que, al igual que los fibroblastos murinos, mueren de manera dependiente de caspasas.

El inconveniente con las HELA es que no conseguimos detectar subG1, o no todas las células que morfológicamente están muertas sufren degradación de ADN. Por ello, tuvimos que medir la muerte tomando las células cuyo tamaño es menor que las no tratadas. Asegurándonos de que el q-VD es capaz de prevenir este cambio morfológico.

Nos preguntamos si la muerte por privación de glucosa era reproducible en otras líneas tumorales. Para ello se trató una línea de rhabdomyosarcoma, RH30. Estas células mueren tras 72 horas de privación de glucosa, pero de una manera independiente de caspasas, ya que el q-VD es incapaz de protegerlas.



**Figura 2. La privación de glucosa mata a distintas líneas celulares por apoptosis o necrosis.**

**a)** Fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak se trataron sin glucosa en presencia de 50  $\mu$ M de z-VAD o DMSO (1:1000) como control. z-VAD y DMSO fueron reañadidos cada 24 horas. Las células se recogieron a los tiempos indicados y fijaron (subG1) o llevaron directamente al citómetro (PI). Los datos representan media de dos experimentos.

**b)** Fibroblastos murinos silvestres (WT) fueron privados de glucosa en presencia de q-VD o DMSO. Se recogieron a los tiempos indicados para subG1 o para yoduro de propidio (PI(+)).

**c)** La línea tumoral humana HeLa fue tratada en ausencia de glucosa en presencia de z-VAD. Se recogieron a los tiempos indicados y fijó para subG1. Se representa el porcentaje de células con un tamaño menor que las no tratadas.

**d)** La línea de rhabdomyosarcoma RH30 fue tratada en ausencia de glucosa durante 72 horas en presencia de q-VD. Las células se llevaron al citómetro para analizar muerte total.

**e)** Células RH30 fueron fotografiadas tras 72 horas sin glucosa, en presencia o no de q-VD.

Creemos que las RH30 sufren necrosis tras la privación de glucosa, no sólo porque el q-VD no las protege, sino porque su aspecto es típicamente necrótico (fig. 2e). Para descartar muerte independiente de caspasas, o necrosis secundaria derivada de la inhibición de las caspasas, deberíamos descartar actividad caspasa tras el tratamiento. ¿Qué es lo que hace que el mismo tratamiento induzca actividad caspasa o no? Los nexos de unión entre estrés metabólico, muerte y adaptación son diversos, complejos y se entrecruzan. El estado metabólico previo, la base genética y sobre todo el estado previo de los elementos (proteínas y complejos) determinarán cómo morirá la célula. Con *estado* nos referimos a activación, cantidad y localización, que son determinantes para la respuesta de la célula al estrés derivado de la privación de glucosa.

Imaginemos que las RH30 tienen altos niveles de proteínas Bcl-2 antiapoptóticas y bajos niveles de antioxidantes. Estas células no sufrirán en un principio despolarización mitocondrial, pero son incapaces entonces de resistir a una falta de glucosa y de producción de poder reductor (NADPH) suficiente para compensar los ROS, por lo que terminaría muriendo por necrosis.

Queda mucho que investigar sobre la relación entre el estrés glicolítico y la muerte celular: niveles de ATP, estado de la ruta mitocondrial de la apoptosis, ROS, etc.

De todas maneras, cada día es más evidente que los rasgos fenotípicos clásicos que definen a la apoptosis como condensación nuclear, subG1, externalización de fosfatidilserina, etc.; no necesariamente se producen en todas las células que sufren apoptosis.

Por ello es necesario caracterizar a fondo la muerte inducida por privación de glucosa para describir con exactitud a qué llamamos apoptosis. Decidimos caracterizar la muerte en células DKO tras la privación de glucosa porque nos sorprendió que en ausencia de Bax y Bak y ante un estímulo típicamente mitocondrial, se indujera una muerte dependiente de caspasas. Esto podría abrir la puerta al descubrimiento de rutas de señalización de caspasas desconocidas y nuevas dianas terapéuticas.

### **3. LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA INDUCE ACTIVIDAD CASPASA EN FIBROBLASTOS MURINOS INMORTALIZADOS**

La única evidencia que teníamos de que la privación de glucosa induce apoptosis en células DKO era que el z-VAD inhibía tanto la producción de células hipodiploides (subG1) como la de células positivas a yoduro de propidio (fig. 2a). Para demostrar que efectivamente se produce apoptosis y actividad caspasa tras la privación de glucosa, medimos su actividad utilizando un sustrato que al ser cortado específicamente por caspasas emite fluorescencia (fig. 3a). Se puede observar que la máxima actividad caspasa se produce a las 48 horas, coincidiendo con el periodo en el que más número de células entran en apoptosis según la cinética de subG1.

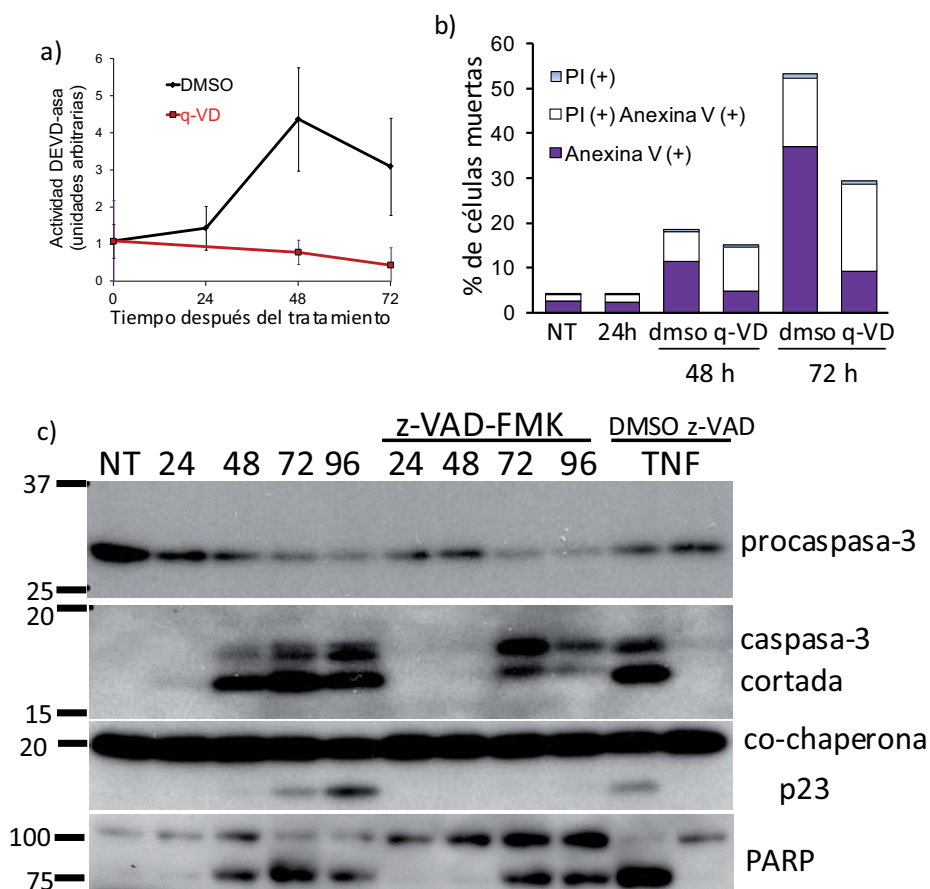
Otra característica de la apoptosis es la externalización de fosfatidilserina que se produce antes de la permeabilización de la membrana a yoduro de propidio. Esta característica se utiliza para medir apoptosis, mediante Anexina V que se une específicamente a la fosfatidil serina. En la figura 3b se puede observar en violeta las células que son positivas para Anexina V y todavía no son permeables a yoduro de propidio. Y cómo la inhibición de caspasas por q-VD disminuye el porcentaje de células que han externalizado la fosfatidilserina.

Las caspasas activadas tienen infinidad de proteínas como sustratos, y tanto las primeras como los segundos pueden ser analizados por "western blot". En la figura 3c se puede observar degradación de la procaspasa-3 con el tratamiento. Es llamativo que la presencia de z-VAD no la evita, aunque parece retrasarla levemente. Sorprendentemente, el z-VAD que es capaz de impedir la producción de subG1, retrasar el corte de PARP o de p23, no puede evitar el corte de caspasa-3.

Sin embargo el z-VAD es eficiente inhibiendo la actividad caspasa cuando se trata con TNF, lo que puede indicar cinéticas o rutas distintas a las activadas por privación de glucosa.



Tal como se veía en la figura 2, al mirar subG1 tras el tratamiento sin glucosa en las WT, cuando estudiamos qué sucede mediante WB comparando WT con DKO, las WT tienen una cinética más rápida (fig. 4a). A las 24 horas del tratamiento en las WT ya hay caspasa-3 cortada y PARP ha sido procesado, no sucediendo hasta las 48 horas en las células deficientes en Bax y Bak (DKO).

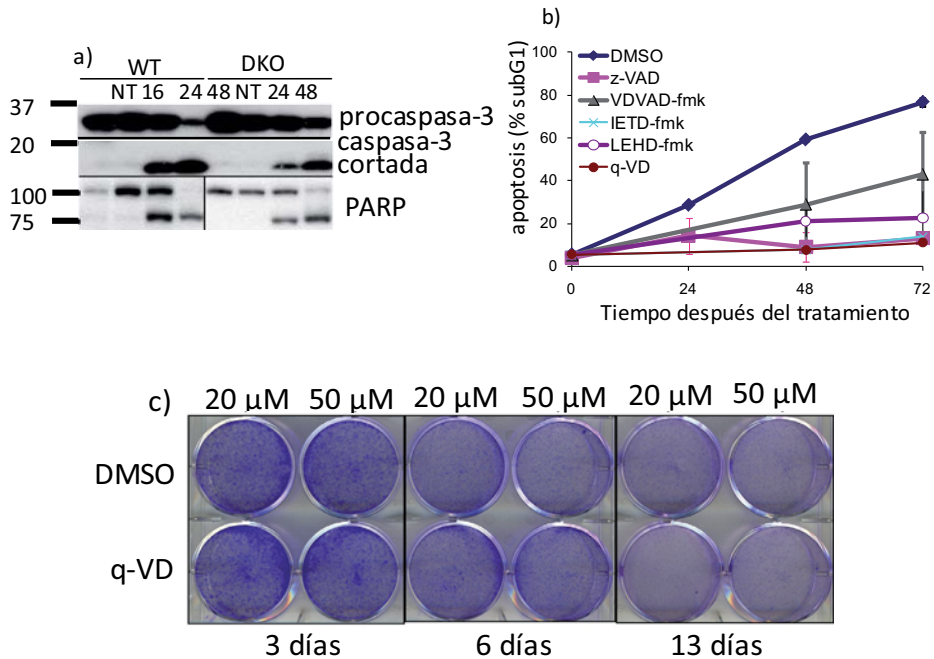


**Figura 3. La privación de glucosa induce actividad caspasa.**

**a)** El extracto de células tratadas sin glucosa en presencia o no de q-VD fue utilizado para analizar actividad caspasa tal como se detalla en el apartado de métodos.

**b)** Células tratadas sin glucosa y tripsinizadas se incubaron con Anexina V y yoduro de propidio. Se analizaron por FL1 y FL3 en el citómetro. Se muestran porcentajes de simples positivas para Anexina y yoduro, y dobles positivas para ambos.

**c)** Con extracto de células tratadas sin glucosa se hizo un western blot que fue incubado con los anticuerpos frente a Caspasa-3 y caspasa-3 cortada. Y frente a los sustratos de caspasas cochaperona p23 y PARP.



**Figura 4. La privación de glucosa induce actividad caspasa, pero la inhibición de las caspasas no previene la pérdida de viabilidad.**

a) Fibroblastos deficientes en Bax y Bak (DKO) y su control silvestre (WT) fueron tratados sin glucosa. Los extractos celulares fueron analizados por WB frente a caspasa-3 y el sustrato de caspasas PARP.

b) Fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak se trataron sin glucosa en presencia de 50  $\mu$ M de z-VAD, 50  $\mu$ M VDVAD-fmk, 50  $\mu$ M IETD-fmk, 50  $\mu$ M LEHD-fmk, 20  $\mu$ M q-VD o DMSO como control. Inhibidores y DMSO fueron reañadidos cada 24 horas. Las células se recogieron a los tiempos indicados y fijaron (subG1) o llevaron directamente al citómetro (PI). Los datos representan media de dos experimentos.

c) Fibroblastos DKO fueron privadas de glucosa durante 3, 6 o 13 días en presencia de q-VD o DMSO. Estos fueron reañadidos cada 3 días. Después del tratamiento las células fueron tripsinizadas y sembradas con medio fresco en placas de 6 pocillos, y fueron crecidas durante 3 días antes de teñir por cristal violeta como se indica en métodos. Se muestra un experimento representativo de 3 repeticiones.

Para descartar un posible efecto del z-VAD o el q-VD sobre proteasas más que sobre caspasas, tratamos las células DKO en presencia de un panel de inhibidores de caspasas (fig. 4b). Y debido a las diferencias de afinidad de estos sustratos por las distintas caspasas, este experimento nos puede dar pistas sobre las caspasas implicadas en la muerte.

La capacidad de inhibición del subG1 de los distintos inhibidores difiere, y tal como se había descrito anteriormente en células Jurkat (McStay, Salvesen et al. 2008), los inhibidores VDVAD-fmk y LEHD-fmk fueron menos eficientes que el resto en inhibir la apoptosis.

Por otro lado, si medimos el porcentaje de células muertas a las 96 horas sabemos (datos no enseñados) que más del 90% han sufrido apoptosis. Sin embargo, como podemos observar en la figura 4c, a los 13 días de privación de glucosa todavía hay células capaces de volver a crecer con normalidad.

Los estudios que habíamos hecho de las consecuencias de la privación de glucosa sobre estas células no nos indicaban el estado de las mismas. Sabemos que los inhibidores de caspasas inhiben la degradación del ADN y que impiden la permeabilización de la membrana citoplasmática al yoduro de propidio; sin embargo nada sabíamos de la viabilidad de esas células. Para ello realizamos experimentos de clonogenicidad (fig. 4c) que nos indican que todas esas células que no “mueren” cuando lo medimos por citometría no son capaces de proliferar de nuevo. Si el z-VAD “protegiera” en un sentido estricto, las células tratadas en presencia del inhibidor deberían tener más “capacidad clonogénica”, más viabilidad que las tratadas en presencia de DMSO, y como se puede ver eso no es así.

#### **4. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA EN CÉLULAS DKO TIENE UN FENOTIPO ATÍPICO.**

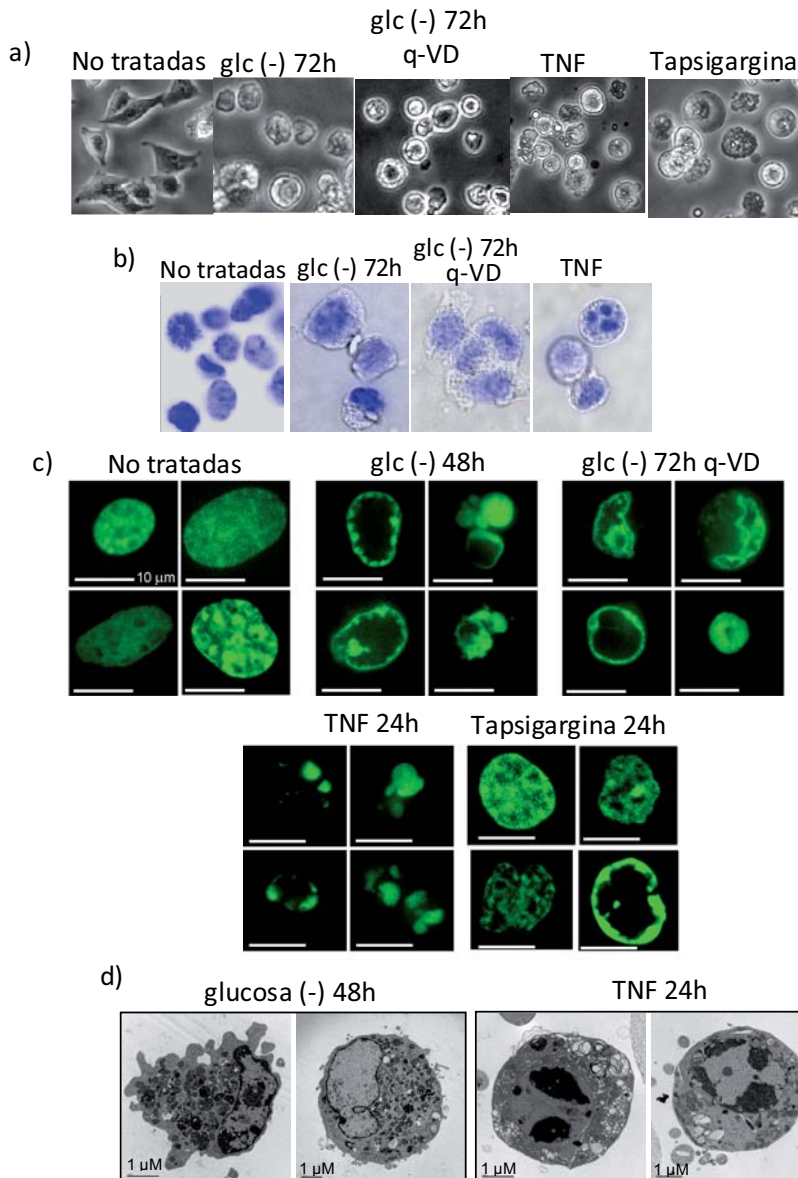
Cuando tratamos las células deficientes en Bax y Bak con inductores de apoptosis como el TNF, a pesar de tener todos los rasgos apoptóticos como subG1, actividad caspasa, etc., la morfología que adquiere la célula no es la “ortodoxa”. Aunque todavía es posible observar “burbujeo” (blebbing en inglés), y cuerpos apoptóticos (fig. 5a). Cuando privamos de glucosa, las células se despegan antes de morir, se redondean y se hacen más pequeñas pero siguen refringentes. Las células muertas tienen un aspecto de mora, arrugado. Aunque un pequeño porcentaje tiene un aspecto más clásico, con cuerpos apoptóticos. La inhibición de caspasas no evita que las células se despeguen y empequeñezcan pero sí hay una

reducción obvia de células que han perdido la refringencia. Sin embargo, cuando tratamos las células con Tapsigargina, que se ha descrito inducir necrosis en estas células (Ullman, Fan et al. 2007), el aspecto que muestran es típicamente necrótico, a diferencia del tratamiento sin glucosa. Con la Tapsigargina las células son más grandes, redondas, menos irregulares y se pueden observar muchos “fantasmas”, que son membranas plasmáticas hinchadas y con aspecto hueco.

En cuanto a la morfología nuclear, por un lado fijamos las células y se tiñeron con DAPI (fig. 5b) y las observamos en el microscopio de fluorescencia. Por otro lado las transfretamos con una histona unida a GFP y después de tratar las miramos en el confocal (fig5c). Este experimento nos reveló una condensación de la cromatina pegada en forma de bolas a la membrana nuclear.

También observamos la morfología a través del microscopio electrónico (fig. 5d). Igual que con el confocal, también se puede observar que tras la privación de glucosa la cromatina se condensa pegada a la membrana nuclear, mientras que cuando se tratan con TNF se ve la clásica condensación y fragmentación cromatínica.

En todos los experimentos, el aspecto de la cromatina de las células tratadas sin glucosa es atípico. Si bien se produce condensación, ésta no es la misma que se puede ver cuando se tratan con TNF. Sin embargo, como se puede observar en la figura 5c, cuando se tratan con Tapsigargina, el aspecto del núcleo es exactamente igual al de las células no tratadas, típico de la necrosis. Esto parece indicar que a pesar de la actividad caspasa y fragmentación del ADN, la condensación es atípica, en forma granular pegada a la membrana nuclear. Posiblemente esto es debido a la falta de energía, esqueletos carbonados y/o glicosilación de proteínas. Aunque no parece que esta condensación sea debida a la actividad caspasa ya que en presencia de q-VD todavía vemos estas estructuras “perinucleares”.



**Figura 5. El fenotipo apoptótico inducido por la retirada de glucosa es atípico.**

Las células sin tratar o tratadas sin glucosa, con TNF (1ng/ml) + CHX (5μM) o con Tapsigargina (10 μM) se analizaron por microscopía.

a) la morfología celular tras el tratamiento fue analizada en un microscopio invertido Olympus con un objetivo de 20x. Las fotos se hicieron con una cámara Olympus.

b) células teñidas con DAPI como se describe en métodos.

c) Células transfectadas con H2B-GFP fueron tratadas y visualizadas en el microscopio confocal.

d) Células tratadas se analizaron por microscopía electrónica. Se enseña un experimento representativo.

## **5. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE GLUCOSA ES INDEPENDIENTE DE LA VÍA INTRÍNSECA**

### **5.1. La apoptosis inducida por privación de glucosa en fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak no es dependiente de la ruta mitocondrial.**

Las células deficientes en Bax y Bak son totalmente resistentes a tBid (Wei, Zong et al. 2001), y no pueden sufrir apoptosis por la vía mitocondrial al ser incapaces de formar un poro por el que sea liberado el citocromo C.

Aún así hemos demostrado que la privación de glucosa, un inductor típicamente mitocondrial, induce actividad caspasa y apoptosis, al contrario de lo que se esperaría.

Pero queríamos comprobar que la muerte en las DKO no era una característica única de estas células, o que se estuviera activando la ruta mitocondrial a través de mecanismos desconocidos. Por ejemplo, que sea mediado por proteínas como Bok, que es altamente homólogo a Bax y a Bak (Hsu, Kaipia et al. 1997).

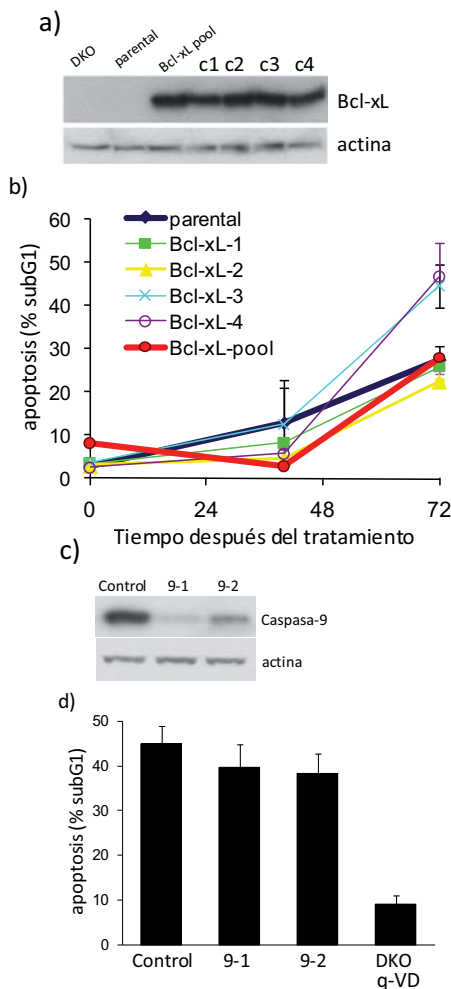
Para ello primero expresamos establemente Bcl-xL. Infectamos células DKO que expresaban establemente citocromo C-GFP (parentales), (Fig. 6a).

Los distintos clones fueron tratados sin glucosa, y como se puede observar en 6b, las células que sobre-expresan Bcl-xL no están protegidas de la privación de glucosa.

De todas formas, para descartar del todo la posible implicación de la vía intrínseca, y existiendo la posibilidad de que la membrana mitocondrial se rompiera y liberara el citocromo C activando caspasa-9, transfectamos establemente las células con un shRNA para caspasa-9, que disminuyó eficientemente los niveles de proteína (fig. 6c). Esta bajada de caspasa-9 no protegió a las células de la privación

de glucosa. La caspasa-9 no era la caspasa iniciadora de la apoptosis inducida por privación de glucosa.

A pesar de todas estas evidencias de que no es la vía mitocondrial la responsable de la inducción de apoptosis, podrían quedar dudas sobre si el citocromo C es de alguna manera liberado y esto podría estar activando los restos de caspasa-9 que queden. Desafortunadamente no hemos conseguido buenas fotografías, pero en células DKO expresando citocromo C unido a GFP, hemos visto que a las 72 horas de tratamiento todavía se detecta citocromo C punteado, lo que indica que probablemente está dentro de la mitocondria. Además, si se observa con detenimiento la figura 24b, en el panel inferior la foto de la derecha, se podrá ver que las mitocondrias están prácticamente intactas.



**Figura 6. La apoptosis inducida por privación de glucosa en fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak no es dependiente de la ruta mitocondrial.**

**a)** Células DKO transfectadas con citocromo C-GFP (parentales) se transfectaron establemente con Bcl-xL. Se generaron clones por diluciones seriadas y fueron analizados por Western Blot para Bcl-xL y actina.

**b)** Los clones, la población transfectada (pool) y las células de la línea parental descritas en (a) se trataron sin glucosa y recogieron a las 40 y 72 horas para analizarlas por subG1. Los resultados muestran la media y desviación estándar de 3 experimentos.

**c)** Células DKO fueron infectadas con retrovirus codificando para dos diferentes shRNA contra caspasa-9, o con el vector vacío (control). Se enseña la expresión de caspasa-9 por WB.

**d)** Las mismas poblaciones de células fueron tratadas durante 72 horas sin glucosa y medida la muerte por subG1. Se enseñan células tratadas en presencia de Q-VD como control de inhibición de apoptosis. Los resultados representan la media y la desviación estándar de 5 experimentos.

## **5.2. Fibroblastos murinos sobre-expresando establemente Bcl-2 mueren por apoptosis tras privarlos de glucosa.**

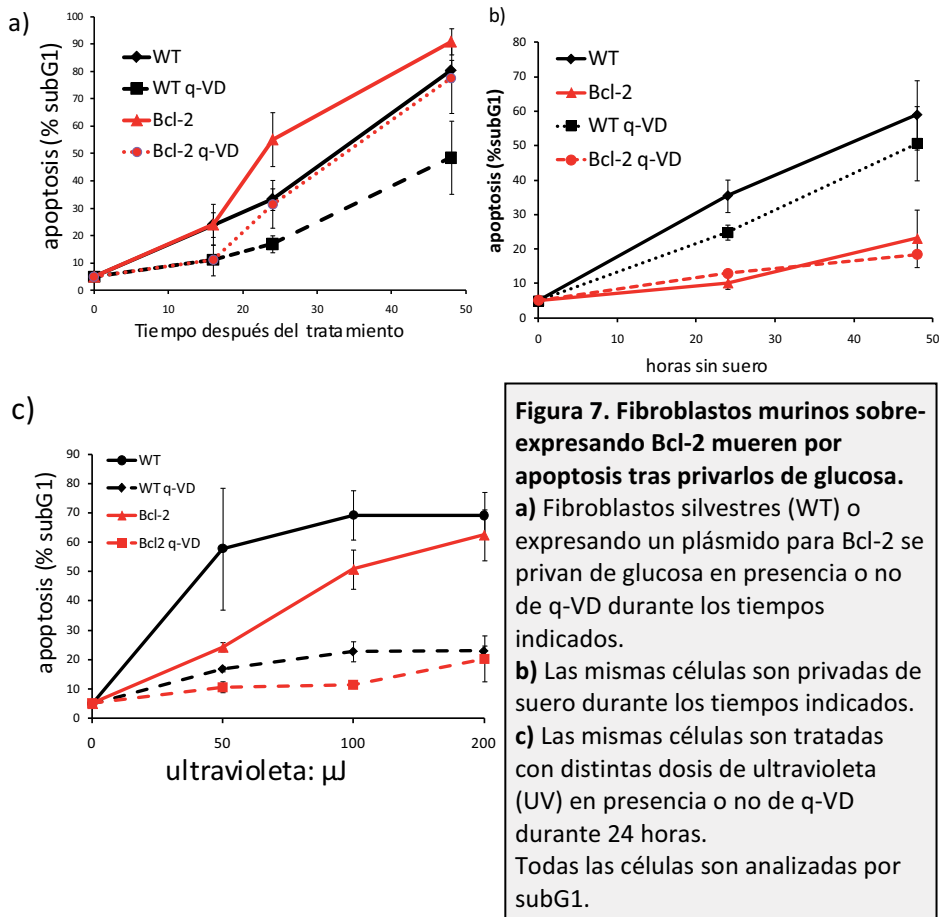
Como se decía más arriba, es posible que esta apoptosis que estamos estudiando sea propia de unas células muy modificadas como las DKO. Si seguimos suponiendo que la privación de nutrientes en general y de glucosa en particular induce apoptosis por la vía mitocondrial, inhibiéndola de otra forma debería proteger a las células.

Para ello fibroblastos silvestres (WT) fueron infectados con retrovirus portando un plásmido con Bcl-2. Estas células fueron tratadas privándolas de suero fetal bovino, para ver si efectivamente la expresión de Bcl-2 era suficientemente alta como para proteger a estas células de un estímulo apoptótico mitocondrial como la falta de los factores de crecimiento que lleva el suero. Como se puede observar en la fig. 7b, estas células estaban bien protegidas de la falta de suero.

Otro inductor de muerte a través de la vía intrínseca es la exposición a radiación ultravioleta. De la misma manera que con el suero, células sobre-expresando Bcl-2 eran más resistentes a distintas dosis de ultravioleta (fig. 7c).

Finalmente, tratamos células WT y Bcl-2 sin glucosa, en presencia o no de q-VD, a distintos tiempos y medimos su muerte por subG1. (fig. 7a) Sorprendentemente, las células Bcl-2 no sólo no estaban protegidas sino que morían más rápidamente que las WT. El q-VD es capaz de inhibir parcialmente la producción de subG1, aunque en ambas líneas no es capaz de hacerlo totalmente. Es probable que esta degradación del ADN se esté produciendo independientemente de caspasas. De hecho esto ya se ha descrito. La endonucleasa G, presente en mitocondria, podría pasar a citoplasma y núcleo tras un estrés, e inducir degradación de ADN en escalera en ausencia de actividad caspasa [Bahi, 2006 #169]. En WT, a diferencia de las DKO, se produce permeabilización mitocondrial. El q-VD no inhibiría la permeabilización mitocondrial ni la salida y actividad de la endonucleasa G.





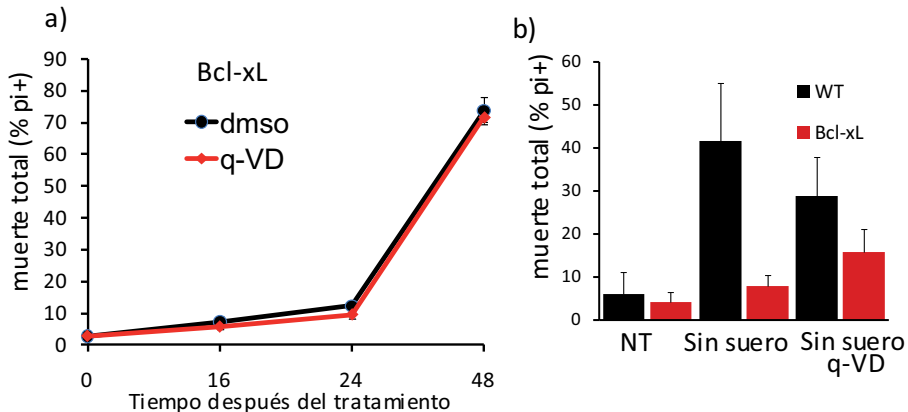
### 5.3. Líneas celulares que sobre-expresan Bcl-xL mueren en ausencia de glucosa.

Otra proteína antiapoptótica de la familia de las Bcl-2 es Bcl-xL. Quisimos estudiar el efecto de su sobre-expresión sobre la privación de glucosa en distintas líneas celulares.

Para ello fibroblastos murinos WT y en células tumorales humanas HeLa que sobre-expresaban Bcl-xL fueron privadas de glucosa.

Al igual que con Bcl-2, la sobre-expresión de Bcl-xL protege a los fibroblastos de la privación de suero fetal (Fig. 8a). Pero estas células mueren cuando son privadas de glucosa (Fig. 8b). Llama la atención que en ambos tratamientos el q-VD no protege. Es más, en ausencia de suero al inhibirse las caspasas las células con Bcl-xL se ven sensibilizadas.

Este Bcl-xL tiene un “tag” en el N-terminal. Esta modificación podría estar afectando a la función de la proteína, como se ha descrito anteriormente (Sánchez, Xu et al. 1999).



**Figura 8-I. Líneas celulares que sobreexpresan Bcl-xL mueren en ausencia glucosa.**

**a)** Fibroblastos murinos sobreexpresando establemente Bcl-xL fueron privados de glucosa en presencia o no de q-VD y analizados por incorporación de yoduro de propidio.

**b)** Las mismas células y su control silvestre fueron tratadas con privación de suero durante 48h en presencia o no de q-VD.

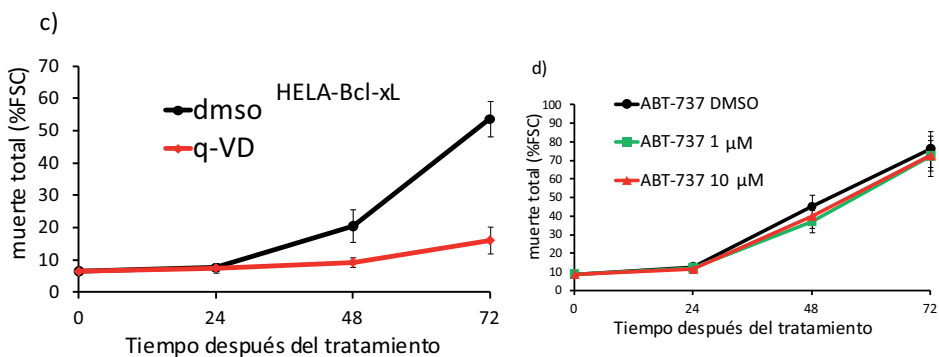
Para comprobar que la muerte independiente de mitocondria (y de caspasas) no es una característica de fibroblastos murinos inmortalizados con SV40, se trató a células HeLa que también sobreexpresaban Bcl-xL. Estas células HeLa fueron privadas sin glucosa en presencia o no de q-VD. En este caso las células sufrían claramente apoptosis al estar las células bien protegidas por el q-VD (fig. 7c).

Es muy probable que la privación de glucosa esté induciendo estrés reticular que lleve a la inducción de Bim (Puthalakath, O'Reilly et al. 2007) PUMA o NOXA (Li, Lee et al. 2006). Si esta inducción no fuera capaz de ser contrarrestada por Bcl-xL o Bcl-2, o estos se estuvieran degradando, etc.; no veríamos protección. Pero sí que podríamos

descartar el papel de los Bcl-2 y abordar el papel de la ruta mitocondrial inhibiendo selectivamente las proteínas Bcl-xL y Bcl-2 al mismo tiempo. Para ello disponíamos del compuesto ABT737, que mimetiza a las proteínas “sólo BH3”.

La presencia de distintas concentraciones de ABT737 durante el tratamiento de células HeLa no las sensibilizó (fig. 7d).

Si la inhibición de Bcl-xL y Bcl-2 no sensibiliza a la privación de glucosa, indicaría que la muerte no es a través de la ruta mitocondrial. Aún así es necesario estudiar el papel de otros antiapoptóticos como Mcl-1 que no pueden ser inhibidos por ABT737.



**Figura 8-II. Líneas celulares que sobreexpresan Bcl-xL mueren en ausencia glucosa.**

c) Células HeLa sobreexpresando establemente Bcl-xL fueron tratadas sin glucosa a distintos tiempos en presencia o no de q-VD. Se fijaron y llevaron al citómetro.

d) Células HeLa fueron privadas de glucosa en presencia de diferentes concentraciones de ABT737 o DMSO como control (1:1000).

b, c) Se representa el porcentaje de células más pequeñas que el control no tratado de al menos 3 experimentos

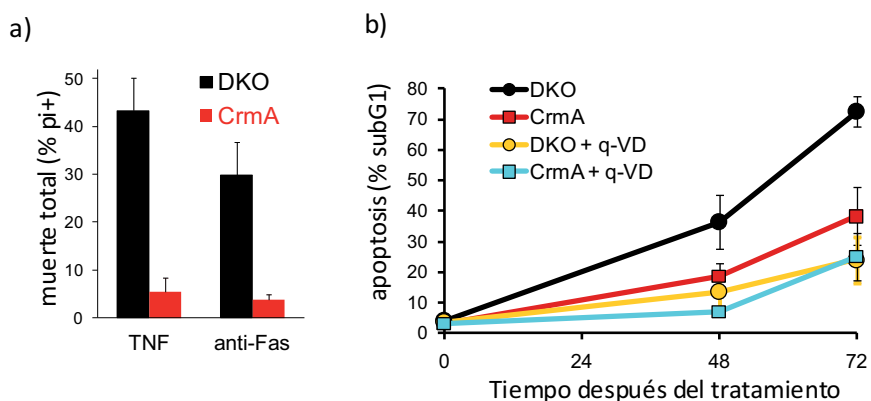
Hemos demostrado de diversas formas que la ruta mitocondrial o intrínseca de la apoptosis, en la que la caspasa-9 sería la caspasa iniciadora, no es la responsable de la muerte por privación de glucosa en varias líneas celulares.

## 6. LA CASPASA INICIADORA DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE GLUCOSA ES LA CASPASA-8

### 6.1. La proteína viral CrmA protege de la retirada de glucosa.

El hecho de que la caspasa-9 no estuviera implicada en la apoptosis, nos hizo sospechar de otra caspasa iniciadora como la caspasa-8. Además, el inhibidor IETD-fmk protege a estas células (fig. 4b). Sin embargo, aunque este inhibidor es ampliamente utilizado como un inhibidor específico de la caspasa-8, se ha visto que puede inhibir otras caspasas (McStay, Salvesen et al. 2008).

Por ello, decidimos inhibir específicamente su actividad, infectando establemente células DKO con retrovirus portando CrmA. Muchos virus desarrollan mecanismos moleculares para que las células infectadas evadan la apoptosis. El virus de la viruela bovina (cowpox) expresa una proteína llamada CrmA que inhibe selectivamente a las caspasas 1 y 8 (Zhou, Snipas et al. 1997).



**Figura 9. La proteína viral CrmA protege de la retirada de glucosa.**

**a)** Células DKO expresando o no establemente CrmA fueron tratadas con TNF (1ng/ml) o con un anticuerpo agonista anti-Fas (0.1  $\mu$ g/ml) durante 24 horas. La muerte fue medida por exclusión de yoduro de propidio en el citómetro.

**b)** Las mismas células fueron tratadas en ausencia de glucosa en presencia o no de q-VD durante los tiempos indicados. En este caso la muerte fue analizada por subG1. Los resultados representan la media y desviación estándar de la media de 5 experimentos.

Como esperábamos, estas células expresando CrmA eran resistentes al tratamiento con ligandos de muerte (fig. 9a). Y sorprendentemente, cuando tratamos estas células sin glucosa, estaban protegidas a los mismos niveles que las células DKO tratadas en presencia de q-VD. Estos resultados nos cerraban el abanico de posibilidades a dos, caspasa-8 y 1. La caspasa-1 parece tener más bien un papel de respuesta inmunológica e inflamatoria (Thornberry, Bull et al. 1992). Por lo que lo más probable era que la caspasa iniciadora fuera la caspasa-8.

## **6.2. La reducción de los niveles de caspasa-8 protege de la privación de glucosa.**

Para corroborar el papel de la caspasa-8 como caspasa iniciadora, creamos líneas expresando establemente shRNA para caspasa-8 (fig. 10a). Estas líneas estaban totalmente protegidas del tratamiento con TNF y cicloheximida (fig. 10b). Igualmente, estaban bien protegidas de la privación de glucosa. Si bien esta protección no es total (fig. 10c).

Estas diferencias en la protección entre un tratamiento y otro podría deberse a que la privación de glucosa tiene un umbral de activación menor, necesita menos caspasa-8 activa en cada momento, y eso explicaría la cinética tan lenta, de 72 horas, de estas células.

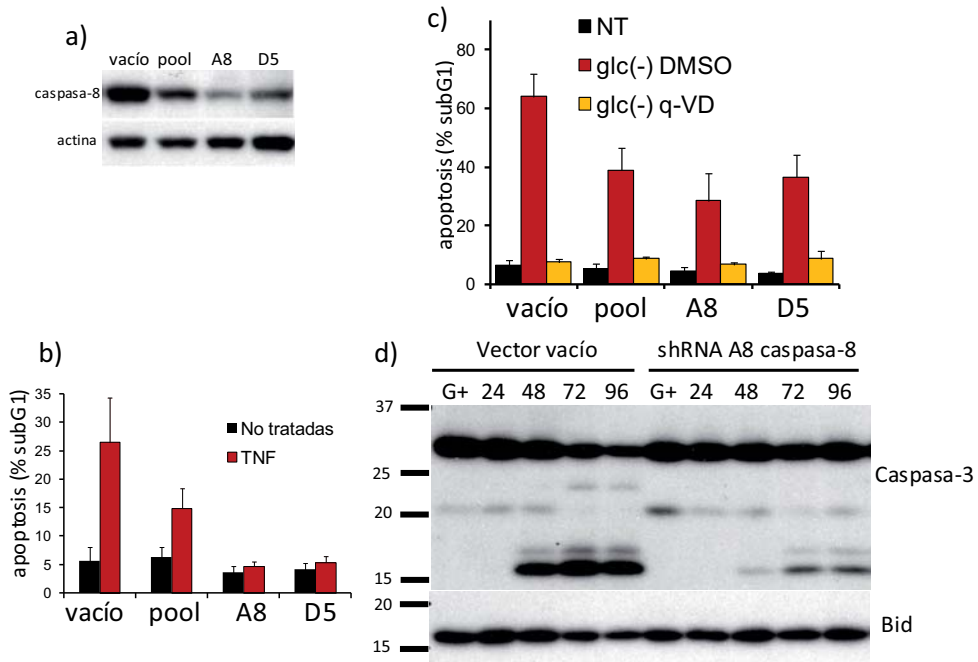
Además esta protección no sólo se detecta por subG1, sino que cuando observamos por western blot la actividad caspasa en estas células, podemos ver que las células con menos caspasa-8 tienen mucha menos actividad caspasa-3 y menos degradación de Bid que las células con niveles de caspasa-8 normal (fig. 10d).

Para demostrar que la protección no es consecuencia de una variación clonal, transfectamos estas células con oligos contra caspasa-8 o un control (fig. 11a). Esta disminución de los niveles de caspasa-8 también protegió de la privación de glucosa, confirmando que esta caspasa está implicada en la apoptosis inducida por privación de glucosa.

De nuevo queríamos estar seguros de que estas conclusiones no eran específicas de fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak.

Para ello transfectamos células tumorales humanas HeLa con siRNA contra caspasa-8 humana. Se consiguió buena eficiencia en la reducción de caspasa-8 (Fig. 12a).

Tratamos las células 72 horas después de la transfección con el siRNA. Las células transfectadas con el siRNA para caspasa-8 están protegidas de TNF (fig.12c) y de privación de glucosa (fig. 12b) frente a las transfectadas con el control.



**Figura 10. La reducción estable de los niveles de caspasa-8 protege de la retirada de glucosa.**

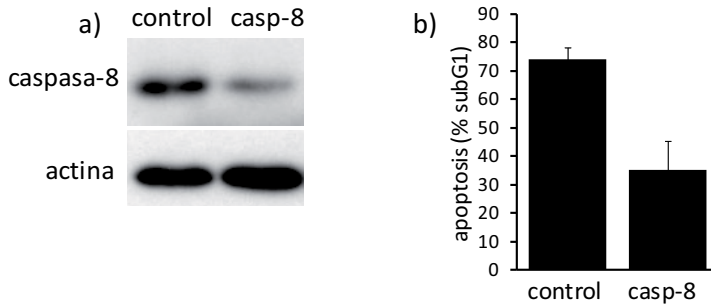
**a)** Células DKO fueron transfectadas con retrovirus codificando para shRNA frente a caspasa-8 (pool) o el vector vacío. Se enseña el western blot de las células con el vector vacío, la población infectada con el shRNA para caspasa-8 (pool) y dos clones seleccionados por baja expresión de caspasa-8 (A8 y D5).

**b)** Células descritas en (a) fueron tratadas con TNF 24h y analizadas por subG1. Los resultados enseñan la media y la desviación estándar de la media de 4 experimentos.

**c)** Las mismas células fueron tratadas sin glucosa en presencia o no de q-VD durante 72 horas. La apoptosis fue medida por subG1. Se enseña la media y desviación estándar de la media de 5 experimentos.

**d)** El clon A8 descrito en (a) y las células transfectadas con el vector vacío fueron tratadas sin glucosa y recogidas para western blot de Bid o caspasa-3 a los tiempos indicados. Para caspasa-3 se utilizó una mezcla de los anticuerpos frente a las formas cortada y procaspasa.

Todos estos resultados nos hacen concluir que la privación de glucosa induce apoptosis en fibroblastos murinos y en células HeLa de manera dependiente de caspasa-8.

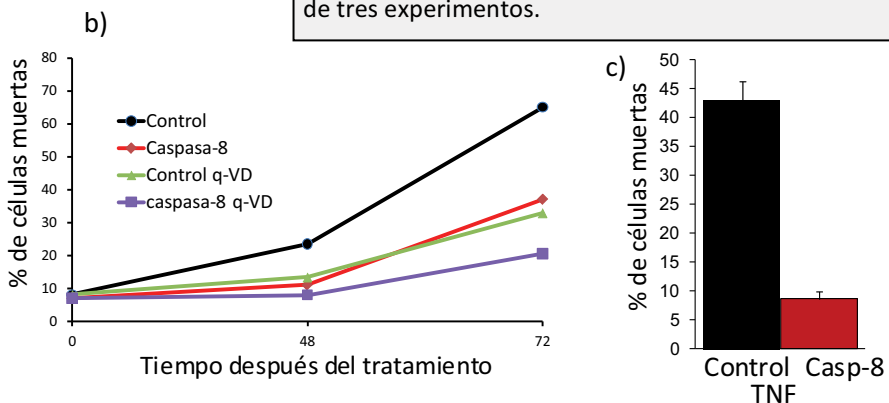


**Figura 11. La bajada temporal de los niveles de caspasa-8 protege de la privación de glucosa.**  
 Células DKO fueron transfectadas con un oligonucleótido control o siRNA frente a caspasa-8. 48 horas después de la transfección, se recogió proteína para WB (a) o se trataron las células en ausencia de glucosa por otras 72 horas (b). Se enseña la media de tres experimentos.

Hemos descartado la implicación de la ruta intrínseca de la apoptosis en la muerte por privación de glucosa y hemos demostrado que la caspasa iniciadora es la caspasa-8. Esta caspasa es la iniciadora de la ruta extrínseca o de receptores de muerte. Por lo que sería razonable que esta ruta fuese la responsable de la apoptosis.



**Figura 12. La bajada de los niveles de caspasa-8 en HELA protege de la apoptosis inducida por privación de glucosa.**  
 a) Células HELA transfectadas con siRNA para caspasa-8 durante distintos tiempos fueron analizadas por WB para su expresión de la caspasa-8.  
 b) 72h después de la transfección las células se trataron por privación de glucosa en presencia o no de q-VD a los tiempos indicados y analizadas por citometría.  
 c) Como control positivo, las células fueron tratadas con TNF 24h. Todos los resultados muestran la media de tres experimentos.



## **7. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE GLUCOSA ES INDEPENDIENTE DE LA INTERACCIÓN DE LOS LIGANDOS DE MUERTE CON SUS RECEPTORES.**

Como ya se ha dicho, la caspasa-8 se activa en respuesta a la unión de los ligandos de muerte a sus receptores. Además, se ha visto que algunas drogas pueden matar a través de caspasa-8 por la inducción de ligandos de muerte (Kasibhatla, Brunner et al. 1998), (Gong and Almasan 2000) o que la inhibición de la glicolisis sensibiliza a ligandos de muerte por inhibición de la traducción de Mcl1 (Pradelli, Beneteau et al.).

Si bien es cierto estas células no son sensibles a ninguno de los ligandos de muerte estudiados (TNF, FasL y TRAIL) en ausencia de cicloheximida, existe la posibilidad de que la privación de glucosa esté sensibilizando a una producción autocrina de ligandos de muerte, tal como se había descrito (Munoz-Pinedo, Ruiz-Ruiz et al. 2003).

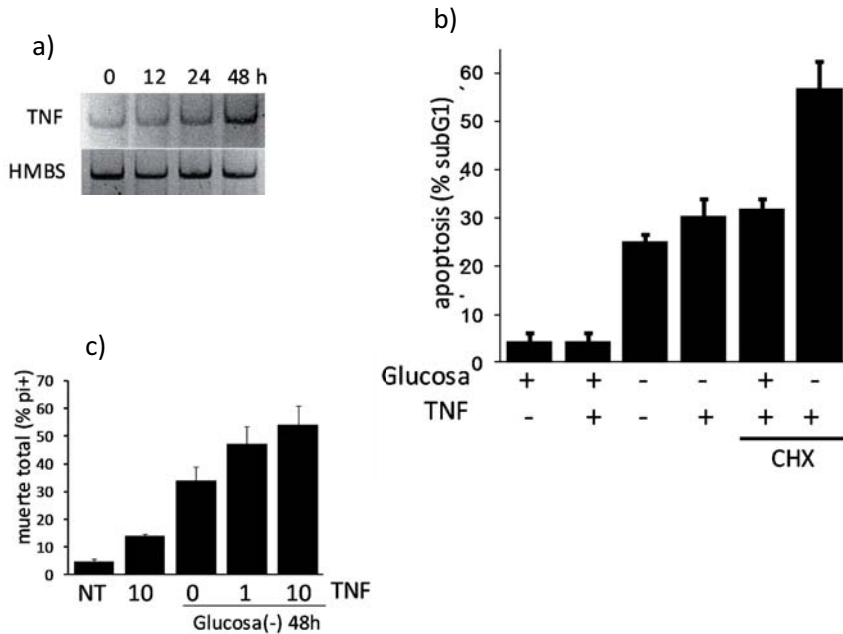
### **7.1. La muerte inducida por privación de glucosa en DKO no está mediada por TNF.**

Para estudiar si era el TNF el ligando implicado en la activación de caspasa-8 tras la privación de glucosa, lo primero que hicimos fue mirar si variaban los niveles de TNF con el tratamiento. Como se puede observar en la figura 13a, la privación de glucosa induce ligeramente la expresión del RNA mensajero de TNF.

Para ver si esta inducción es la responsable, tratamos las células durante 48 horas sin glucosa, y en uno de los puntos añadimos TNF a las 24 horas. Si la privación de glucosa está sensibilizando a las células al TNF, saturar el medio con el ligando debería inducir un aumento en el número de células hipodiploides. Como se puede ver en 13b, esto no es así. La muerte sin glucosa y TNF no es mayor que con cicloheximida y TNF. Sin embargo, cuando se privan de glucosa en presencia de cicloheximida y TNF se produce un efecto sinérgico, indicando que los mecanismos de inducción de muerte de la cicloheximida y de la privación de glucosa son distintos y aditivos.



Esto es así cuando medimos la muerte por subG1, pero cuando lo hacemos por incorporación de yoduro de propidio, donde se observa muerte total, sí que hay una sensibilización dosis-dependiente al TNF. Esto parece indicar que el daño producido por la privación de glucosa sensibiliza a la célula a algún tipo de muerte necrótica inducida por TNF (fig. 13c).



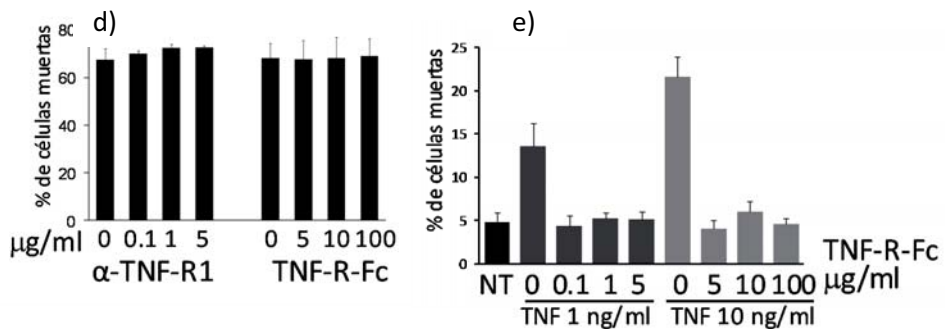
**Figura 13-I. La apoptosis inducida por privación de glucosa en DKO no está mediada por el ligando de muerte TNF.**

- a)** El ARN mensajero del TNF se induce ligeramente tras la retirada de glucosa. Se enseña la RT-PCR de TNF y un control de carga (HMBS).
- b)** La privación de glucosa no sensibiliza a apoptosis inducida por TNF. El TNF (1ng/ml) fue añadido 24 después de la privación de glucosa. CHX (0.2µM) fue añadida 30 minutos antes del TNF. Las células fueron recogidas 48 horas después de la privación de glucosa para subG1.
- c)** La falta de glucosa sensibiliza a las DKO a TNF. Igual que en (b) el TNF (ng/ml) fue añadido a las 24 horas de la privación de glucosa y las células fueron recogidas a las 48 horas. En este caso fueron analizadas por exclusión de yoduro de propidio.

Debido a que la privación de glucosa parece inducir la expresión de TNF y sensibilizar al mismo a un tipo de necrosis, decidimos estudiar más en profundidad el papel del TNF.

Para ello, tratamos estas células en presencia de un anticuerpo frente al receptor 1 de TNF (TNF-R1) (Fig. 13d, panel izquierdo) o con Enbrel (Etanercept – TNF-R-Fc). Ninguno de los dos inhibidores protegió de la privación de glucosa, mientras que el TNF-R-Fc sí protegía bien del tratamiento con TNF y cicloheximida de manera dependiente de la dosis.

Todos estos resultados indican que si bien la privación de glucosa afecta a la respuesta de la célula a altas concentraciones de TNF, esto no quiere decir que la apoptosis inducida por privación de glucosa sea dependiente de una producción autocrina de TNF.



**Figura 13-II. La apoptosis inducida por privación de glucosa en DKO no está mediada por el ligando de muerte TNF.**

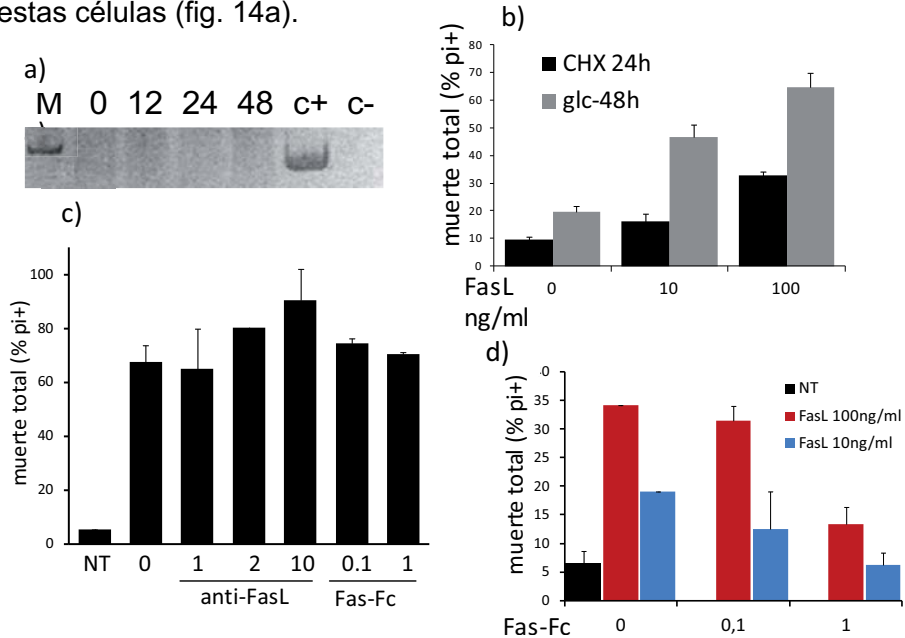
**d)** El bloqueo de las interacciones entre el TNF y su receptor no protege de la privación de glucosa. Las células fueron incubadas con medio sin glucosa y a las 24 horas se añadió anti-TNF-R1 a las concentraciones indicadas (panel izquierdo). El anticuerpo fue añadido cada 24 horas. Las células fueron llevadas al citómetro a las 72 horas de la privación de glucosa, y la muerte medida por incorporación de yoduro de propidio. Panel derecho: Las células fueron incubadas 72 horas con medio sin glucosa en presencia de TNFR-Fc y fueron recogidas para subG1. Se enseña media y rango de dos experimentos.

**e)** Control positivo que enseña que TNF-R-Fc es capaz de bloquear apoptosis inducida por TNF exógeno. Las células fueron preincubadas con CHX y tratadas durante 18 horas con TNF-R-Fc más TNF a las concentraciones indicadas. Se enseña la media de 3 experimentos.

## 7.2. La muerte inducida por privación de glucosa en células DKO no es mediada por FasL.

De la misma manera que con el TNF, nos preguntamos la posibilidad de que la privación de glucosa altere los niveles de FasL o los mecanismos por el que FasL señala, de manera que estas alteraciones sensibilicen a FasL.

Realizamos una rt-PCR y no pudimos detectar expresión de FasL en estas células (fig. 14a).



**Figura 14. El ligando de Fas no está implicado en la muerte por privación de glucosa.**

**a)** El ligando de Fas no se expresa en células DKO. Las células fueron tratadas sin glucosa a los tiempos indicados y se hizo una rtPCR para FasL. "C+" indica un control positivo, un plásmido que contiene la secuencia de FasL. "C-" es el control negativo.

**b)** La privación de glucosa sensibiliza a las DKO a FasL. Las células fueron preincubadas durante 30 minutos con CHX o durante 24 horas en ausencia de glucosa antes de añadir FasL a las concentraciones indicadas otras 24 horas.

**c)** El bloqueo de la interacción entre el ligando y su receptor no protege de la falta de glucosa. Las células se trataron en ausencia de glucosa y a las 24 horas se añadió anti-FasL o Fas-Fc otras 48 horas.

**d)** Fas-Fc protege de FasL. Control positivo de Fas-Fc. Las células fueron tratadas con FasL en presencia de CHX y Fas-Fc a las concentraciones indicadas.

b, c, d) Se muestran los porcentajes de muerte analizados por exclusión de yoduro de propidio.

A pesar de esto, tratamos las células privándolas de glucosa o con cicloheximida, en presencia de distintas cantidades de FasL (fig. 14b). En negro se puede ver el tratamiento en presencia de cicloheximida y en gris en ausencia de glucosa.

Si medimos muerte total por incorporación de yoduro de propidio, vemos que la privación de glucosa sensibiliza fuertemente a las células a la adición de FasL, de manera dependiente de la dosis de FasL.

Este resultado, aunque no detectemos ARN mensajero de FasL, nos hace seguir profundizando en el posible papel de FasL en la muerte por privación de glucosa. Para ello, tratamos las células en presencia de distintas concentraciones de un anticuerpo contra FasL y un análogo soluble de Fas (Fas-Fc) (fig. 14c). Ninguno de los dos inhibidores protegió de la muerte, pero sin embargo el Fas-Fc es capaz de proteger eficientemente del tratamiento con FasL y cicloheximida (fig. 14d).

Estos resultados nos hacen concluir que aunque la privación de glucosa sensibilice a FasL exógeno, éste no juega ningún papel en la activación de caspasa-8 de la muerte que estamos estudiando.

### **7.3. TRAIL tampoco está implicado en la muerte por privación de glucosa en células DKO.**

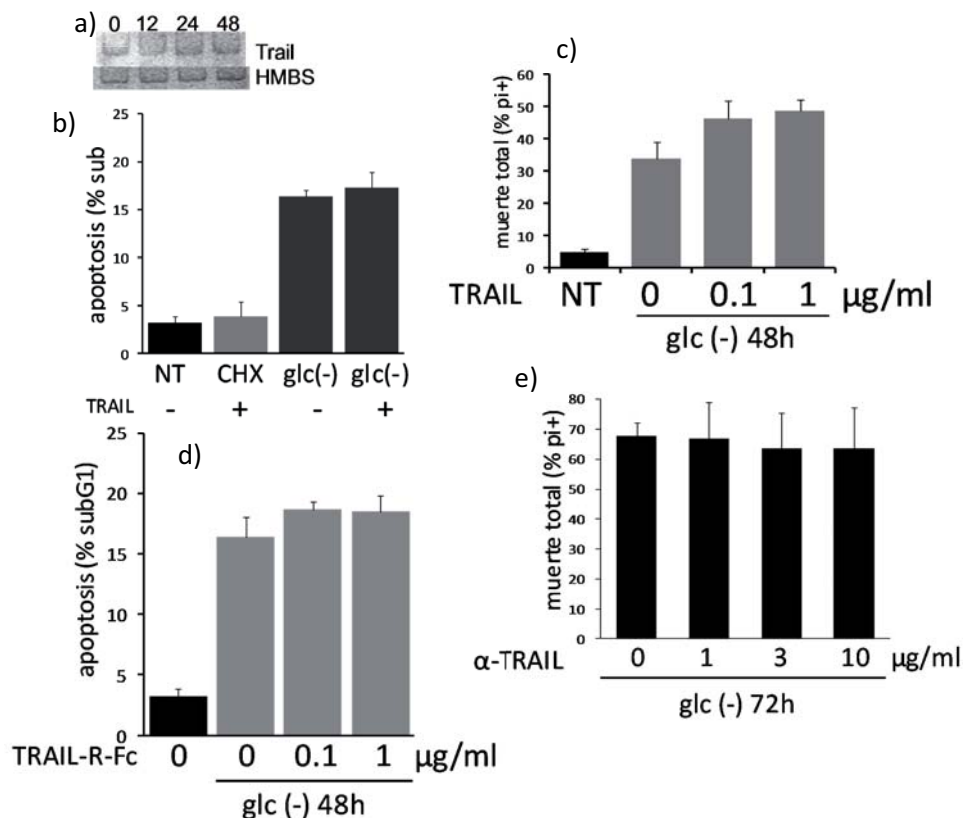
Como se decía más arriba, se ha descrito que la falta de glucosa sensibiliza a líneas tumorales a ligandos de muerte, entre ellos TRAIL (Munoz-Pinedo, Ruiz-Ruiz et al. 2003). Por ello, igual que en los dos apartados anteriores, estudiamos el papel de esta citoquina en la privación de glucosa.

En la figura 15a podemos observar que el ARN mensajero de TRAIL se expresa pero no se induce tras la privación de glucosa.

A diferencia del TNF y el FasL, TRAIL no es capaz de matar a estas células ni siquiera en presencia de cicloheximida (fig. 15b). A pesar de esto, tratamos las células sin glucosa en presencia de alta concentración de TRAIL, y esto no afectó a la apoptosis, pero cuando de nuevo miramos muerte total por incorporación de yoduro de propidio (Fig. 15c), sí que vemos un ligero aumento en el número de células positivas. Esto parece indicar que esto induce, como con el

resto de ligandos, algo de necrosis que no podemos detectar por subG1.

De la misma manera, el tratamiento de estas células en presencia de un análogo del receptor II de TRAIL (Fig. 15d) o un anticuerpo contra TRAIL (Fig. 15e) no protegió de la privación de glucosa.



**Figura 15. TRAIL no está implicado en la muerte por privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak.**

**a)** ARN mensajero de TRAIL no es inducido por la privación de glucosa. Las células DKO fueron tratadas sin glucosa y recogidas a los tiempos indicados. Se enseña una RT-PCR representativa de 3 experimentos de TRAIL y HMBS (control de carga).

**b, c)** Células fueron incubadas con cicloheximida durante 30 minutos o sin glucosa 24 horas antes de añadir TRAIL (1 µg/ml) durante 24 horas más a las concentraciones indicadas. Las células en (b) fueron fijadas y analizadas por subG1 y se enseña la media de tres experimentos. Mientras que en (c) se analizó muerte total por incorporación de yoduro de propidio (media de 4 experimentos).

**d, e)** Las células fueron privadas de glucosa en presencia de anti-TRAIL o TRAIL-R-Fc a las concentraciones indicadas. Las células fueron recogidas las 72 horas del tratamiento sin glucosa para el análisis por citometría.

Ya se sabía que células tumorales se sensibilizaban a ligandos de muerte tras inhibir su metabolismo glicolítico (Munoz-Pinedo, Ruiz-Ruiz et al. 2003). Por eso, el que la muerte inducida por privación de glucosa en células DKO sea apoptosis independiente de la mitocondria y de los ligandos de muerte es cuando menos sorprendente. Por ello hemos probado de distintas maneras que los ligandos de muerte no son los responsables de la apoptosis por privación de glucosa. Esto no descarta la implicación de la ruta extrínseca, mediante una posible agregación de los receptores de muerte y el complejo proteico responsable de la activación de caspasa-8 (DISC: Death Inducing Signalling Complex en inglés) de forma independiente de ligandos.

## **8. LOS COMPONENTES DEL DISC NO SON NECESARIOS PARA LA MUERTE POR PRIVACIÓN DE GLUCOSA**

Cuando se inhibe la síntesis de proteína mediante la cicloheximida las células DKO mueren por FasL y TNF indicando que la ruta extrínseca de la apoptosis es funcional. Por tanto, aunque los ligandos de muerte no estén implicados, existe la posibilidad de que una agregación de los receptores de muerte, o del DISC, por un mecanismo desconocido, pueda agregar y activar caspasa-8 desencadenando apoptosis. Existe algún ejemplo de activación de caspasa-8 independiente de ligandos. Por ejemplo, la proteína YopP, de la bacteria *Yersinia enterocolitica*, induce apoptosis dependiente de Caspasa-8, RIP y Fadd, pero independiente de ligandos (Gröbner, Adkins et al. 2007).

Para intentar esclarecer qué es lo que está activando a caspasa-8, fuimos estudiando uno a uno los posibles responsables.

### **8.1. La sobreexpresión de c-FLIPL no protege de la privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak.**

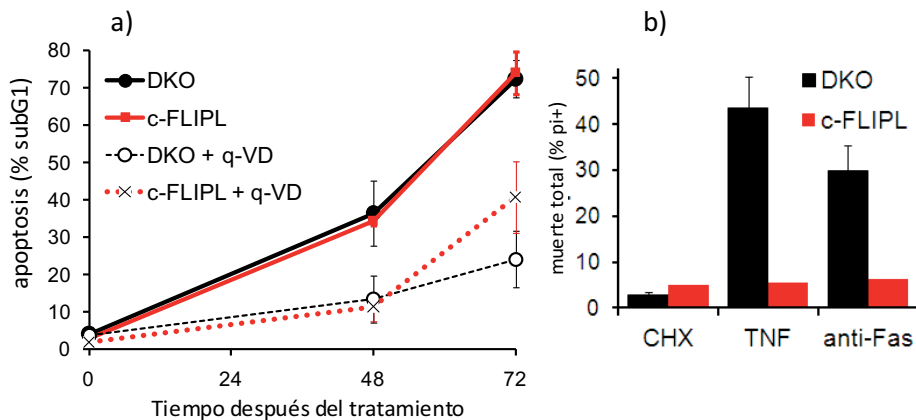
Desde hace años se sabe que la vía extrínseca o de ligandos de muerte es inhibida por una proteína llamada FLIP (Irmiler, Thome et al. 1997). De hecho, sólo con la presencia de cicloheximida, que

disminuye los niveles de FLIP, es posible matar a estas células con FasL o TNF.

Si la activación de la caspasa-8 por la privación de glucosa dependiera de una agregación del DISC independiente de los ligandos de muerte, sobre-expresar FLIP debería proteger a las células. Para ello creamos células DKO que establemente sobre-expresan c-FLIPL. Como esperábamos, estas células eran resistentes al tratamiento con los ligandos de muerte FasL y TNF (fig. 16b). Pero cuando las privamos de glucosa, c-FLIPL no era capaz de proteger (fig. 16a).

Llama la atención en la figura 16b que las células que sobre-expresan c-FLIP-L, en presencia de q-VD estén menos protegidas que las DKO.

Recientemente se ha descrito una forma de activación de caspasa-8, mediada por Fadd, pero que no puede ser inhibida por FLIP (Wang, Du et al. 2008). Se induce mediante el tratamiento con TNF y miméticos de SMAC. Estos análogos de SMAC inducen la degradación de cIAP1 permitiendo la agregación de RIPK1 que actuaría como reclutador de caspasa-8.



**Figura 16. La sobreexpresión de c-FLIPL no protege de la privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak.**

**a)** Células DKO expresando establemente c-FLIPL fueron privadas de glucosa durante los tiempos indicados y analizadas mediante subG1. Las gráficas muestran la media y desviación estándar de la media de 3 (a) ó 4 (b) experimentos.

**b)** Las mismas células fueron tratadas con anti-Fas o TNF durante 24 horas y recogidas para analizarlas por citometría mediante exclusión de yoduro de propidio.

Pero esto no explicaría el que las células con c-FLIPL estén menos protegidas en presencia de q-VD (fig. 16a, línea roja punteada), ya

que esta muerte es dependiente de caspasas. Si el q-VD, cuando FLIP está sobre-expresado, no puede inhibir la producción de subG1, ¿qué es lo que está induciendo degradación del ADN?

## **8.2. Estudio de la implicación de FADD en la muerte por privación de glucosa.**

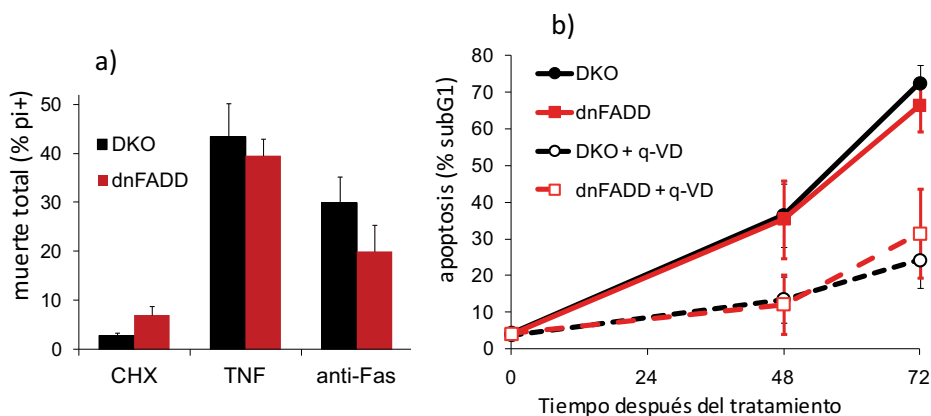
Para abordar el papel de FADD, se expresó establemente un dominante de FADD (dnFADD) donado por el laboratorio de la Dra. Borst, y que inhibía eficientemente la muerte inducida por FasL y TRAIL (Werner, de Vries et al. 2002).

En nuestras células, la expresión del dominante negativo, no nos protegió de TNF aunque sí ligeramente de la agregación de los receptores de Fas mediante el uso del anticuerpo Jo2 (Fig. 17a). Esta protección es estadísticamente significativa. La expresión de este dominante negativo de FADD tampoco afectó a la muerte inducida por privación de glucosa.

La posibilidad de que el FADD endógeno sea suficiente para reclutar caspasa-8 nos llevó a utilizar ARN de interferencia para bajar los niveles de FADD. Primero generamos líneas estables expresando dos shRNA para FADD, pero no conseguimos disminuir los niveles de FADD (datos no enseñados). Como no funcionó el estable, utilizamos siRNA, y a pesar de que estos oligos disminuían los niveles de FADD (Fig. 18a), no protegían ni de la privación de glucosa (18b), ni del tratamiento con TNF (18c).

Desgraciadamente no podemos descartar la implicación de FADD en el reclutamiento de caspasa-8 tras la privación de glucosa. A diferencia de FLIP, no hemos conseguido que la inactivación de FADD proteja de ligandos de muerte, lo que permitiría afirmar que FADD no está implicado.



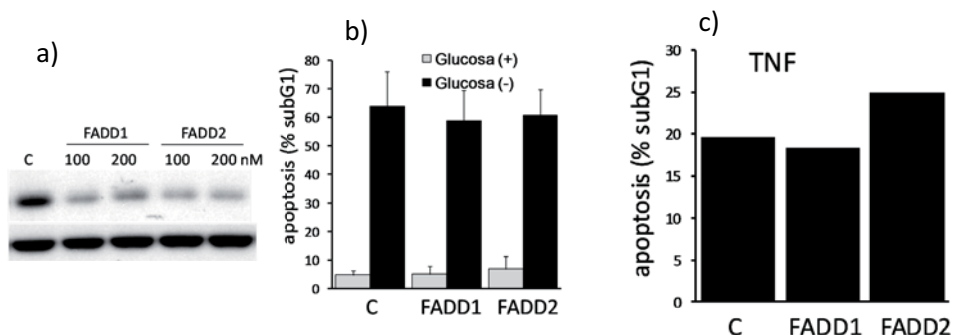


**Figura 17. La interferencia con la función de FADD no reduce la muerte por privación de glucosa.**

**a)** Células DKO o células DKO expresando establemente un dominante negativo de FADD fueron tratadas con anti-Fas (0.1 mg/ml) o TNF (1 ng/ml) en presencia de CHX. Las células fueron recogidas a las 24 horas para analizarlas por incorporación de yoduro de propidio. Se muestra la media de 4 experimentos.

**b)** Las mismas células fueron privadas de glucosa y recogidas para subG1. Se enseñan la media y desviación estándar de 3 (24h) o 4 (48h).

Estos resultados nos indicarían que los mecanismos de activación de caspasa-8 tras la privación de glucosa son distintos a los de la vía extrínseca de la apoptosis. Pero se ha descrito otro mecanismo de activación de caspasa-8 independiente de c-FLIPL, a través de RIP (Wang, Du et al. 2008). La cicloheximida sensibiliza a estas células a TNF porque al inhibir la síntesis proteica baja los niveles de FLIP lo suficiente para permitir la agregación de caspasa-8 a FADD. Cuando sobre-expresamos FLIP, sus niveles no bajan lo suficiente en presencia de cicloheximida. Si suponemos que la privación de glucosa induce una parada de la síntesis proteica, como es de esperar, la sobre-expresión de FLIP debería proteger de manera similar que lo hace con el tratamiento con TNF y cicloheximida. Pero esto no es así. Por tanto cabría la posibilidad, como describen Wang et al (Wang, Du et al. 2008), de que la proteína implicada sea RIP, y que bajos niveles de FADD sean suficientes para inducir la activación de la caspasa-8.



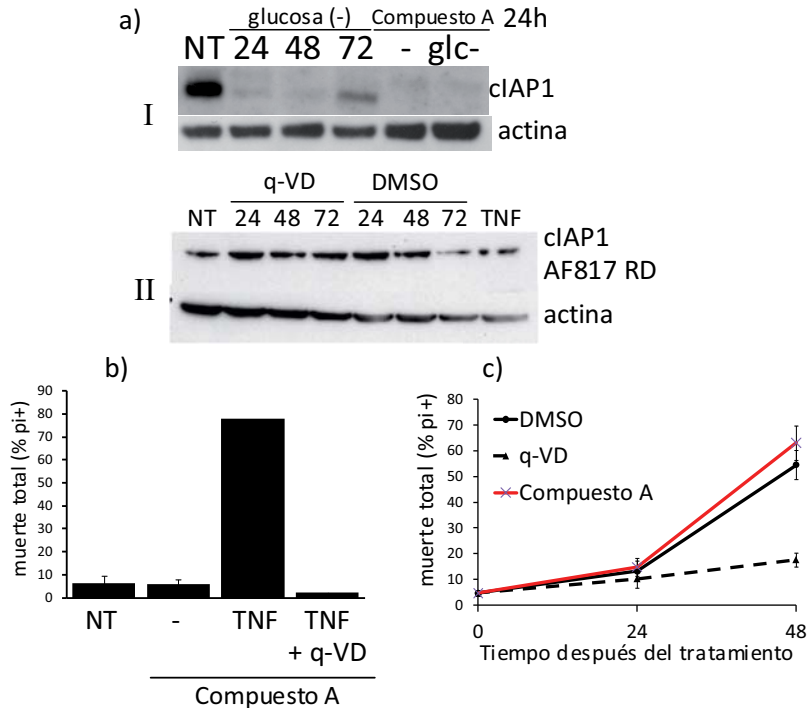
**Figura 18. La disminución de los niveles de FADD no protege de la retirada de glucosa en células deficientes en Bax y Bak.** Células DKO fueron transfectadas con siRNA contra FADD o una secuencia control (C) como se describe en métodos. 48 horas después de la transfección la proteína fue recogida para analizarla por WB (a) o las células fueron tratadas sin glucosa otras 72 horas (b) o TNF y cicloheximida durante 24 (c).

### 8.3. No hay sinergismo entre la falta de cIAP1 y la muerte inducida por privación de glucosa.

cIAP1 es un inhibidor de la muerte inducida por ligandos como el TNF y el ligando de Fas (Wang, Suominen et al. 2005). En su ausencia, los ligandos de muerte matan a través de RIPK1 y caspasa-8 (Geserick, Hupe et al. 2009).

Existía la posibilidad que la privación de glucosa disminuyera los niveles de cIAP1 y esto permitiera el reclutamiento de RIPK1 y caspasa-8 llevando a su activación.

Lo primero que hicimos por tanto fue comprobar que efectivamente tras la privación de glucosa los niveles de cIAP1 variaban. Para ello utilizamos varios anticuerpos diferentes para cIAP1, comerciales o no. Los resultados variaban entre anticuerpos e incluso entre experimentos. En unos casos cIAP1 desaparecía en 24 de privación de glucosa, igual que cuando tratábamos con el antagonista de cIAP1 compuesto A (fig. 19a I). Sin embargo en otro experimento, utilizando el anticuerpo comercial de R&D, cIAP1 se mantiene constante (fig. 19a II).



**Figura 19. No hay sinergismo entre la falta de cIAP1 y la privación de glucosa**

**a)** Variabilidad en la expresión de cIAP1 tras la privación de glucosa. Células DKO fueron privadas de glucosa en presencia o no de q-VD o “compuesto A” (500 μM) a los tiempos indicados y recogidas para WB frente a cIAP1 y actina como control de carga. Se enseñan dos experimentos independientes representativos de al menos 5 repeticiones. I: se utilizó para detectar cIAP1 el anticuerpo generado en el laboratorio del Dr. Vaux en Melbourne. II: En este caso se utilizó el anticuerpo comercial de R&D.

**b)** Las mismas células fueron privadas de glucosa en presencia del inhibidor de cIAP1 “Compuesto A” (500 nM) o de q-VD.

**c)** Control positivo de (b). Las mismas células no se trataron (NT) o se preincubaron con Compuesto A (500 μM) 30 minutos antes de tratarlas con TNF (1 ng/ml) o TNF y q-VD.

El anticuerpo generado en el laboratorio del Dr. Vaux (Fig. 19a) ha sido extensamente utilizado en publicaciones (Vince, Wong et al. 2007), (Geserick, Hupe et al. 2009). Por ello creemos que efectivamente la privación de glucosa induce la caída de los niveles de cIAP1 y esto podría ser responsable de la activación de caspasa-8.

Para comprobar si una disminución de los niveles de cIAP1 sería la responsable de la activación de caspasa-8, tratamos las células DKO en presencia de un análogo de SMAC (compuesto A), que inhibe a

clAP1, induciendo su degradación (Vince, Wong et al. 2007). Mientras que el compuesto sensibiliza eficientemente a estas células a TNF de manera dependiente de caspasas (figura 19b), no afecta a la muerte inducida por privación de glucosa.

Estos resultados podrían indicar que la muerte no depende de una degradación de clAP1, sin embargo, sólo la sobre-expresión eficiente de clAP1 o de un mutante no degradable por compuesto A nos permitiría afirmar esto sin ninguna duda. Y esto es debido a que si a 24 horas clAP1 ya ha desaparecido, lo que estamos viendo es que no existe un efecto sinérgico entre el compuesto A y la privación de glucosa, no que clAP1 no esté implicado.

Por otro lado, sería necesario ver si la sensibilización a los ligandos de muerte que observamos en las figuras 13c, 14b y 15c puede ser inhibida por inhibidores de RIPK1. Esto indicaría que la privación de glucosa, al inducir la degradación de clAP1, sensibilizaría a estas células a muerte mediada por la actividad kinasa de RIPK1 (necroptosis).

#### **8.4. RIPK1 no está implicado en la apoptosis inducida por privación de glucosa.**

RIPK1 es el único miembro de la familia de RIP que tiene un dominio de muerte (DD). A pesar de que los ratones deficientes en RIPK1 mueren rápidamente debido a una alta sensibilidad al TNF, RIPK1 está implicado en la vía extrínseca y forma parte del DISC.

Para estudiar la posibilidad de que RIPK1, en ausencia de clAP1, se esté reclutando en el DISC y a su vez agregando a caspasa-8 tratamos las células en presencia de Geldanamicina (Fig. 20a). Este inhibidor induce la degradación de RIPK1 a través de la inhibición de HSP90 (Gröbner, Adkins et al. 2007). La presencia de Geldanamicina protegió ligeramente a las células de la privación de glucosa. Si bien este resultado debe ser tomado con cautela debido a que la chaperona HSP90 es responsable de la estabilización de multitud de proteínas. Su inhibición tiene muchos efectos en la célula.

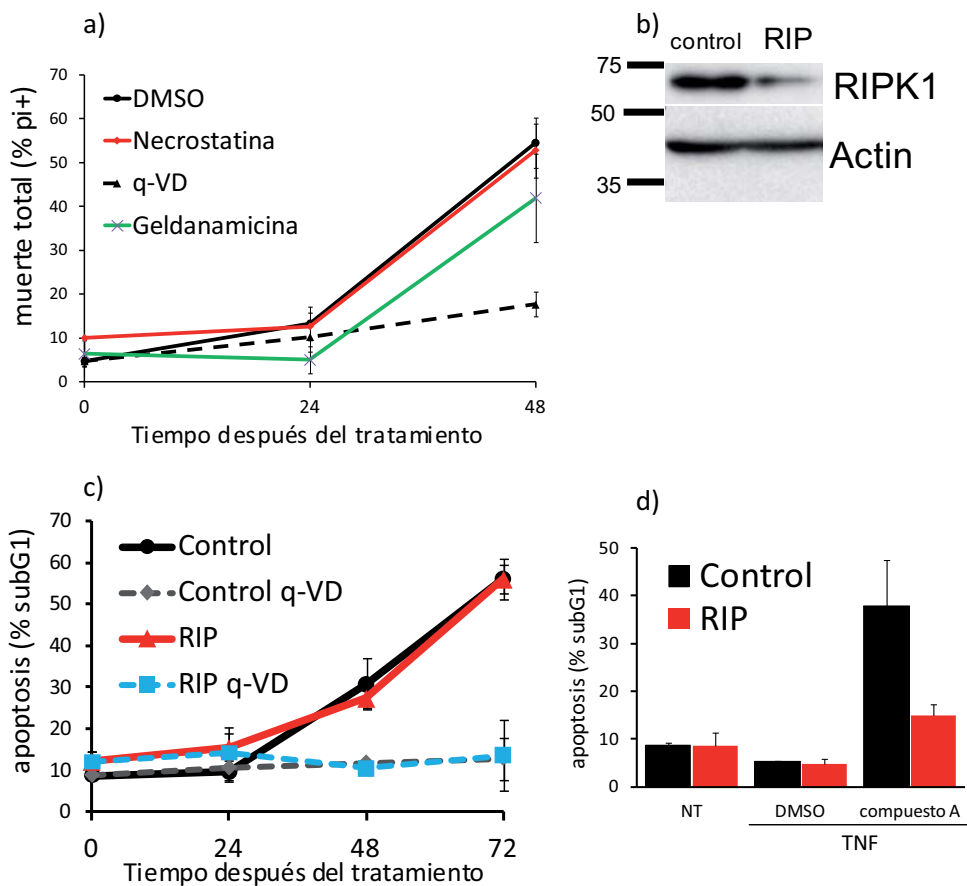
A pesar de que la necroptosis no parece ser la responsable de la muerte por privación de glucosa, porque la primera no es inhibida por inhibidores de caspasas, tratamos las células en presencia de necrostatina. Esta inhibe específicamente la actividad kinasa de RIPK1, que parece responsable de la inducción de necroptosis (Degterev, Hitomi et al. 2008). Sin embargo, la presencia de necrostatina no afectó a la muerte por privación de glucosa.

Como decíamos, RIPK1 está implicada en 3 rutas distintas. La necrostatina nos descarta la actividad kinasa de RIPK1, pero no la posibilidad de que RIPK1 esté reclutando a caspasa-8. Esta hipótesis se vería reforzada con los resultados del tratamiento en presencia de Geldanamicina. Pero como decía, la Geldanamicina es bastante inespecífica y aunque disminuya los niveles de RIPK1, podría estar afectando también a otros niveles. Por ello decidimos bajar los niveles de RIPK1 de manera específica mediante siRNA (fig. 20b). Esta bajada de RIPK1 no protegió a las células de la apoptosis por privación de glucosa (Fig. 20c). Pero sí que protegió al tratamiento con TNF en presencia de compuesto A, que se sabe mata por apoptosis independientemente de c-FLIPL (Wang, Suominen et al. 2005), (fig. 20d).

Por tanto, la privación de glucosa tampoco induce apoptosis a través de RIPK1.

No hemos conseguido observar una relación entre los elementos que conforman el DISC y la activación de la caspasa-8. Todos estos experimentos no nos han dado la clave de qué está activando caspasa-8.

Se sabe que la privación de nutrientes en general y la de glucosa en particular altera multitud de mecanismos de supervivencia y muerte a causa del estrés metabólico. Por ello, quisimos profundizar un poco más en el papel del metabolismo en general, y la autofagia en particular, en la muerte por privación de glucosa.



**Figura 20. La disminución de los niveles de RIPK1 no protege de la privación de glucosa a células deficientes en Bax y Bak.**

**a)** Las células fueron privadas de glucosa los tiempos indicados en presencia de DMSO, necrostatina (50 μM) o Geldanamicina (500 nM). Las células fueron analizadas en el citómetro por exclusión de yoduro de propidio.

Células DKO fueron transfectadas con siRNA control o frente a RIPK1 (marcado como RIP) durante 48 horas y fueron recogidas para WB **(b)**. Las mismas células fueron tratadas sin glucosa en presencia de DMSO o q-VD **(c)**, o con TNF en presencia o no de compuesto A (500 μM) **(d)** y fijadas para subG1 a los tiempos indicados (c y d).

## 9. METABOLISMO Y MUERTE

Como se explicaba en la introducción, los mecanismos con los que la célula responde al estrés por falta de nutrientes son complejos. Existe una tupida red, bastante desconocida, que conecta metabolismo, adaptación y muerte.

Uno de los mecanismos homeostáticos que más se está estudiando en los últimos años es la autofagia. Lo que comúnmente llamamos autofagia, realmente son un conjunto de procesos celulares complejos activados en respuesta a la falta de nutrientes o a estrés celular.

Hay publicaciones que consideran la autofagia protectora frente a muerte inducida por privación de nutrientes y otras que creen que la autofagia es una forma de muerte celular en sí (Wang, Singh et al. 2007).

Por todo esto, decidimos estudiar el papel de la autofagia en la muerte inducida por privación de glucosa.

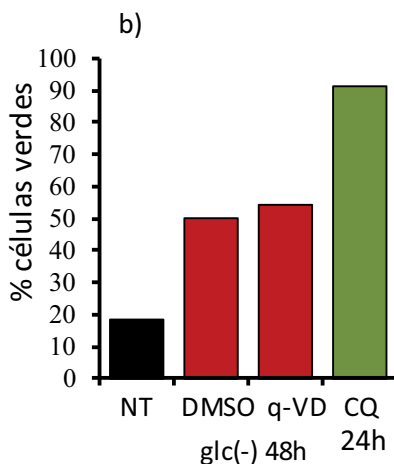
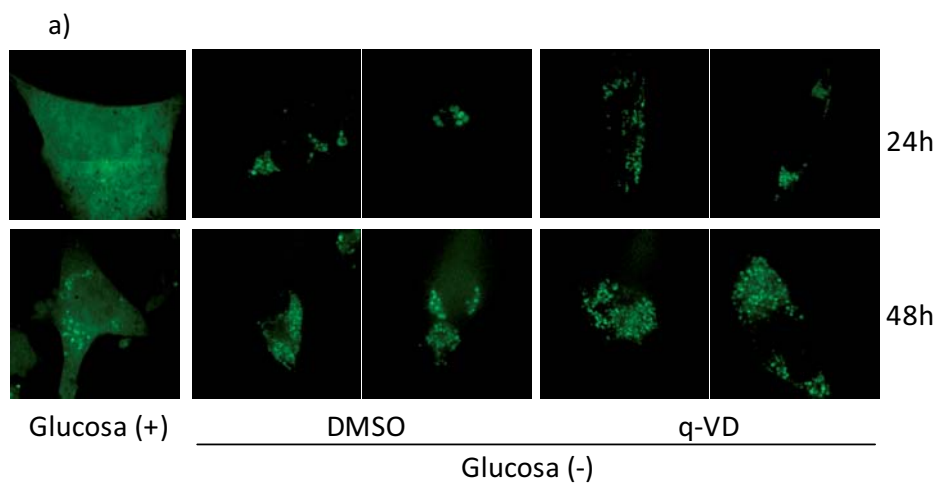
### 9.1. La privación de glucosa induce agregación de GFP-LC3.

El LC3 es una proteína asociada a la membrana del autofagosoma. Expresamos establemente GFP-LC3 en células DKO mediante infección retroviral y las privamos de glucosa. Como se puede observar en la figura 21a, la privación de glucosa induce la agregación de GFP-LC3. Este patrón punteado no es inhibido por el q-VD. Para cuantificar esta agregación del LC3, permeabilizamos las células con digitonina y medimos su fluorescencia en el citómetro. Esta técnica se basa en que sólo el GFP-LC3 no agregado salía de la célula (Fig. 21b). En efecto, el tratamiento con cloroquina, que inhibe la fusión del lisosoma con el autofagosoma, induce una acumulación de autofagosomas, y por tanto una acumulación de LC3 agregado. Esto es lo que observamos en la figura 21b, que la células tratadas con cloroquina son más fluorescentes después de la permeabilización que las no tratadas. La privación de glucosa, tal como se veía en la figura 21a, también induce una agregación del LC3-GFP.

La cloroquina es un “lisomotrópico”, que inhibe la fusión del lisosoma al autofagosoma. Aunque el uso de la cloroquina puede llevar a error en el análisis de la autofagia, porque al bloquear la última fase de la

autofagia, se acumulan en el citoplasma autofagosomas, que se observa vacuolizado (Ross, Xu et al. 2000).

Estos experimentos nos indican que existe agregación de LC3, y aunque a menudo se utilice como medida de autofagia, no podemos concluir lo mismo. Existen al menos tres posibilidades: una que efectivamente el patrón punteado corresponda a la formación de autofagosomas. Dos, que existan autofagosomas, pero que el proceso autofágico no vaya más allá por incapacidad de los lisosomas de fusionarse (como pasa con la cloroquina). Y tres, que sean agregados proteicos inespecíficos, a donde el GFP-LC3 sea conducido.



**Figura 21. La privación de glucosa induce agregación de LC3-GFP en células DKO.**

**a)** Células deficientes en Bax y Bak que expresan establemente LC3-GFP fueron privadas de glucosa en presencia de DMSO o q-VD durante los tiempos indicados y llevadas al microscopio confocal.

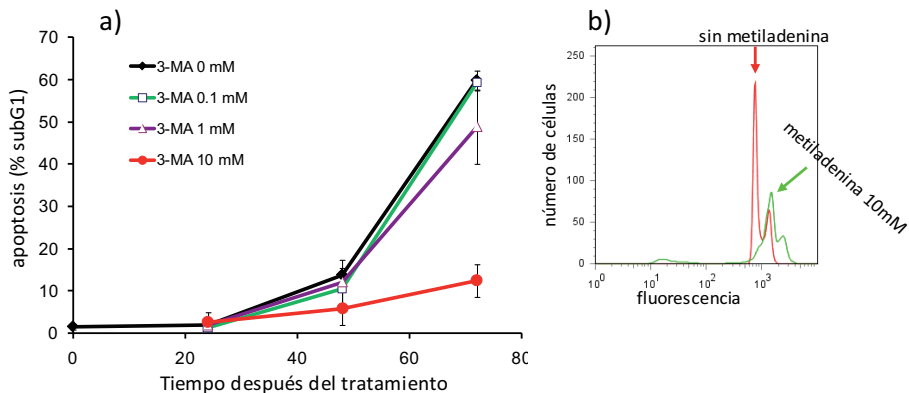
**b)** Las mismas células fueron tratadas con medio sin glucosa en presencia de q-VD durante 48h, o con cloroquina durante 24h. Tras el tratamiento,  $10^5$  células se incubaron con digitonina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y EDTA (1mM) ocho minutos en hielo en una placa de 96 pocillos cónicos. A continuación se lavaron con PBS y se analizó por citometría la fluorescencia verde de aquellas células que por su tamaño (FSC) y complejidad (SSC) habían sido permeabilizadas.



## 9.2. La 3-metiladenina reduce significativamente el porcentaje de células hipodiploides.

Otra manera de abordar el posible papel de la autofagia en la apoptosis inducida por privación de glucosa era mediante el uso de inhibidores. La 3-metiladenina, si bien no muy específica, al inhibir la PI3K de clase III impide indirectamente la inducción de autofagia.

Tratamos las células DKO en presencia de 2 concentraciones de 3-metiladenina (Fig. 22a) y el inhibidor reducía significativamente el porcentaje de células que sufrían apoptosis, protegía. Sin embargo, cuando miramos más en detalle el perfil del ciclo celular de las células tratadas, (Fig. 22b), podemos comprobar que la 3-metiladenina induce la acumulación de células con el doble de ADN que las tratadas en ausencia del inhibidor.



**Figura 22. La 3-metiladenina protege de la privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak.**

**a)** Células DKO fueron privadas sin glucosa en presencia de 3-metiladenina a las concentraciones indicadas y fijadas para subG1 a los tiempos indicados. Se enseña la media y desviación estándar de 2 experimentos.

**b)** Se enseña el histograma de células tratadas 24 horas sin glucosa en ausencia de 3-metiladenina (rojo) o en presencia de 10mM de 3-metiladenina (verde).

Lo que en un principio nos puede hacer pensar que la autofagia es responsable de la muerte por privación de glucosa, mirado más en detalle, probablemente no es más que un artefacto.

De hecho la 3-metiladenina tiene muchos más efectos en las células, por ejemplo el de bajar la producción de lactato al inhibir la actividad de la piruvato kinasa, la acidificación lisosomal o el metabolismo del glicógeno (CARO, Peter et al. 1988). O no sólo inhibe una PI3K necesaria para la autofagia (PI3K-III), sino que también inhibe la PI3K de clase I, (Knight et al., 2006).

Todos estos efectos podrían estar llevando a la célula a un estado quiescente, donde se vieran drásticamente reducidas sus necesidades metabólicas y energéticas y por ello no entrarán en apoptosis.

### **9.3. Fibroblastos murinos deficientes en ATG7 son más resistentes a la privación de glucosa que células que la expresan.**

ATG7 parece ser una proteína fundamental para la autofagia al mediar la conjugación de ATG5 y ATG12 (Tanida, Mizushima et al. 1999) y la mitofagia (Mortensen and Simon).

A fibroblastos procedentes de ratones deficientes en ATG7 se les expresó establemente la proteína mediante infección retroviral.

Ambas líneas celulares fueron privadas de glucosa (Fig. 23). Las células deficientes en ATG7 eran más resistentes al tratamiento. Esto parece indicar de nuevo que la autofagia participa en la muerte inducida por la privación de glucosa. Sin embargo, no hemos sido capaces de demostrar sin dudas que la privación de glucosa induce autofagia.

Pero quizás lo más llamativo de este experimento y que podría estar afectando a los resultados es el hecho de que las células deficientes en ATG7 tienen constantemente un pico subdiploide. Éste prácticamente desaparece cuando se expresa de nuevo la proteína. Ambas líneas celulares parecen comportarse igual, en crecimiento, muerte basal, etc.

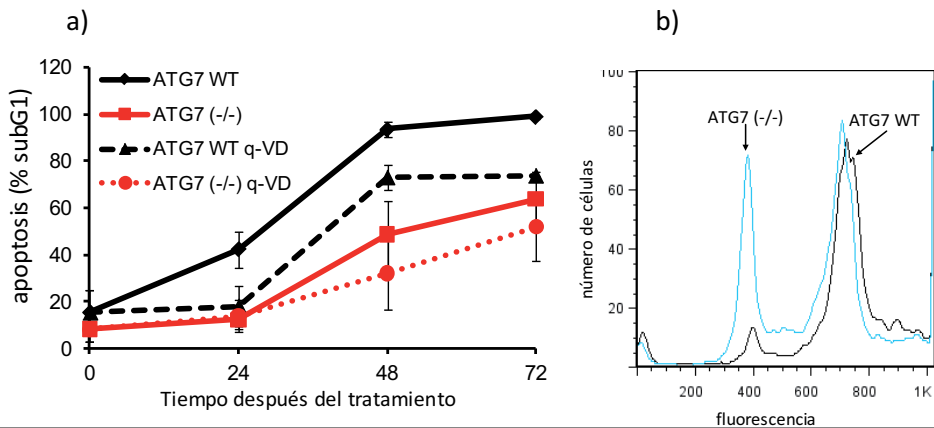
La inestabilidad cromosómica inducida en células con deficiencias en la autofagia ya fue descrito por Mathew et al.(Mathew, Kongara et al. 2007). Ellos describieron que células deficientes en Beclina-1, una proteína necesaria para la autofagia, sufrían aneuploidías siempre que

estuvieran protegidas de apoptosis. El perfil que ellos observan es idéntico al de los fibroblastos deficientes en ATG7 (fig. 23b). Lo que no sabemos es el destino de estas células aneuploides. A pesar de que no se utilizaron esas células para cuantificar hipodiploidía (subG1), sí es verdad que las células con una carga normal de ADN (2n) que entraran en apoptosis tras la privación de glucosa, podrían confundirse con células vivas aneuploides en el análisis. Con lo que estaríamos infravalorando los resultados.

No sabemos tampoco si esta protección es debida no a una deficiencia en autofagia sino a efectos relacionados con la inestabilidad cromosómica, ciclo celular, etc.

Por último, se ha descrito recientemente que ratones deficientes en *Atg5/Atg7* son capaces de inducir macroautofagia a través de rutas alternativas (Nishida, Arakawa et al. 2009).

Esto indicaría que los fibroblastos murinos deficientes en *Atg7* que hemos utilizado todavía pueden estar induciendo macroautofagia, por lo que los resultados no serían concluyentes.



**Figura 23.**

**a) Células deficientes en ATG7 son más resistentes a la falta de glucosa.**

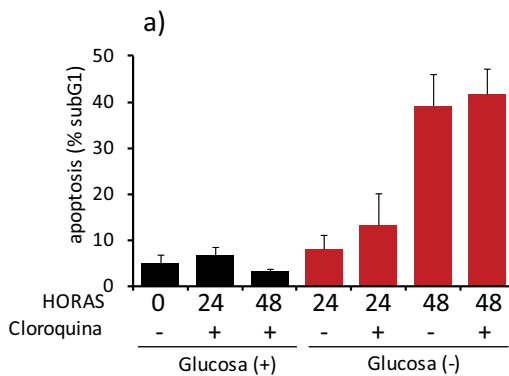
Fibroblastos murinos deficientes en ATG7 ( $ATG7^{-/-}$ ) y las mismas células expresando establemente ATG7 (WT) fueron privadas de glucosa en presencia de DMSO o q-VD los tiempos indicados, y analizadas por subG1.

**b)** La ausencia de ATG7 induce aneuploidías en fibroblastos murinos. Se enseña el histograma de un experimento representativo. En azul se representan las células ATG7 ( $-/-$ ) fijadas para subg1 y teñidas con yoduro de propidio. En negro las ATG7 WT.

#### 9.4. La cloroquina no altera el porcentaje de apoptosis inducida por privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak.

La presencia de la cloroquina a 10 $\mu$ M durante la privación de glucosa no altera el número de células apoptóticas (fig. 24a). A una concentración mayor, las células, con y sin glucosa, mueren rápidamente por necrosis (datos no enseñados).

Si la autofagia tuviera un papel importante en el suministro de elementos esenciales para la producción de energía durante la privación de glucosa, la presencia de cloroquina debería sensibilizar a la apoptosis inducida por el tratamiento. Por otro lado, si una inducción masiva de autofagia fuera la responsable de la activación de caspasas, la cloroquina debería reducir el número de células hipodiploides. Esto no es así, como se puede observar en la figura 24a.



**Figura 24-I.**

**a) La cloroquina no altera el porcentaje de células hipodiploides inducida por privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak.** Las células fueron privadas de glucosa en presencia o no de hidrox-cloroquina (10 $\mu$ M) y recogidas para subG1 a los tiempos indicados.

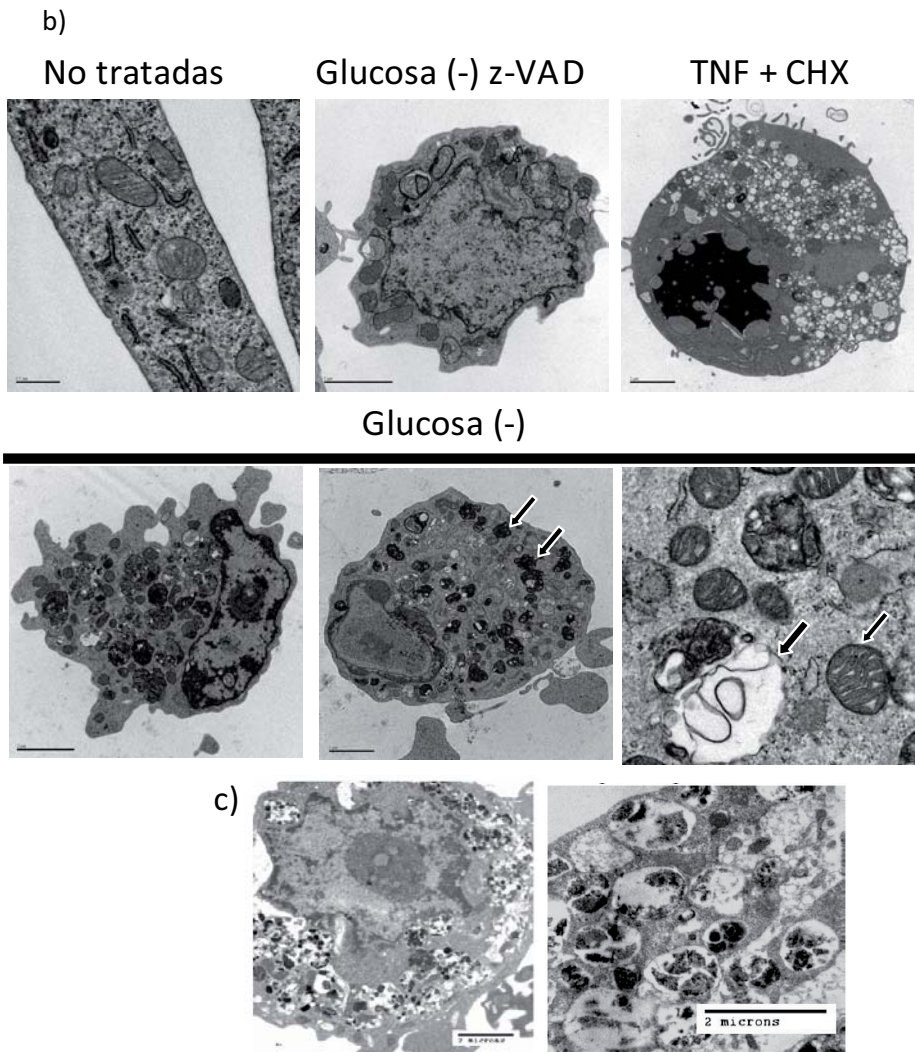
Se puede observar que diferentes abordajes del papel de la autofagia en la muerte inducida por privación de glucosa nos dan resultados contradictorios. Por tanto, es necesario clarificar si efectivamente la privación de glucosa induce formación de autofagosomas.

## **9.5. No se observan membranas de autofagosomas por microscopía electrónica tras la privación de glucosa.**

Si se observa la microscopía electrónica inducida por etopósido en células deficientes en Bax y Bak (Tu, Ren et al. 2009) o con Tunicamicina (Fig. 24c) (Ullman, Fan et al. 2007), tal como se explicaba en la introducción, se ve que existe vacuolización y dobles membranas, que no se pueden detectar durante el tratamiento por privación de glucosa (Fig. 24b). Por todos estos resultados, nuestra impresión es que la privación de glucosa no induce autofagia, y los resultados que hemos obtenido tanto con las células deficientes en ATG7 como con la 3-metiladenina, son consecuencia de cosas distintas a la autofagia. En cualquier caso, la autofagia no parece tener un papel importante en la muerte por privación de glucosa en estas células.

Es necesario hacer más experimentos, detectar acumulación de LC3-II, quitar otras proteínas implicadas en la autofagia, ver el estado de mTOR y AMPK, hacer experimentos de degradación de proteínas de vida media, mirar si hay degradación de p62 y un largo etcétera.

Ni la autofagia parece tener un papel decisivo en la apoptosis inducida por privación de glucosa, ni la ruta extrínseca clásica es la responsable de la activación de caspasa-8. Debe existir algún mecanismo por el que la caspasa-8 pueda ser agregada. Nuestro principal interés era dilucidar cómo y dónde se estaba activando caspasa-8.



**Figura 24-II.**

**b) No se observan autofagosomas en células DKO tras privación de glucosa.**

Células DKO fueron analizadas por microscopía electrónica como se indica en métodos. En el panel superior: células no tratadas (NT), privadas de glucosa (48h) con z-VAD, o con TNF (24h). Panel inferior: tratadas sin glucosa (48h).

c) Extraídas de la figura s2 de Ullman et al. Son células DKO tratadas con Tunicamicina durante 48 horas.

## **9.6. A pesar de acumularse, la proteína p62 no está implicada en la muerte inducida por privación de glucosa.**

Los niveles de p62 se utilizan habitualmente para ver inducción de autofagia por western blot. Así, cuando se induce autofagia, p62 es degradado. Sorprendentemente, cuando miramos los niveles de p62 tras privación de glucosa (Fig. 25a), pudimos observar que la proteína se acumulaba con el tratamiento, justo al contrario de lo esperado.

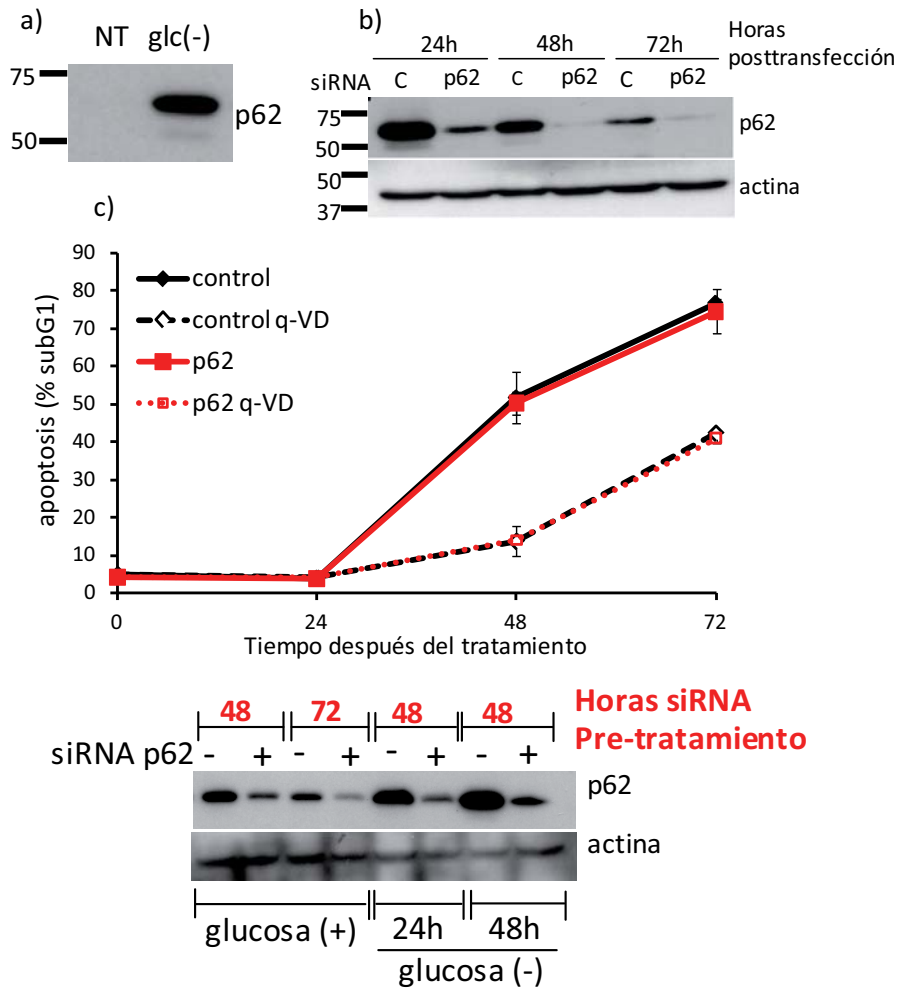
Por lo tanto, no sólo no se produce autofagia, sino que parece que el tratamiento impide su resolución, que induciría la degradación de p62. Revisando la literatura pudimos ver que p62 podía estar implicada en la agregación de caspasa-8 poliubiquitinada (Jin, Li et al. 2009). Por tanto existía la posibilidad de que la poly-ubiquitinización de caspasa-8 junto con la acumulación de p62 debido al bloqueo de la autofagia, indujera la agregación y activación de la primera llevando a la célula a la apoptosis.

Para probar esto, bajamos los niveles de p62 mediante siRNA (Fig. 25b).

La eficiencia del siRNA fue buena, por lo que tras 48 horas de transfección tratamos a las células, en presencia o no de q-VD. Como se puede observar (Fig. 25c) la eliminación de p62 no influyó en la muerte.

Existía la posibilidad de que el efecto acumulativo de la privación de glucosa sobre p62 estuviera compensando la bajada por el siRNA. Esto lo comprobamos haciendo un western blot con células tratadas a distintas horas después de transfectar (Fig. 25d). El siRNA es capaz de mantener los niveles de p62 bajos hasta después de 72 horas de transfección y 48 horas de privación de glucosa. De hecho, son casi indetectables. Por lo que parece improbable que p62 sea la responsable de la agregación de caspasa-8 tras la privación de glucosa.

Estos resultados mantienen la interrogante de qué es lo que está activando caspasa-8.



**Figura 25.**

**a) La privación de glucosa induce acumulación de la proteína p62.** Células DKO se trataron sin glucosa durante 72 horas y se recogieron para WB frente a p62.

**b) La reducción de los niveles de p62 no protege de la privación de glucosa.** Células DKO fueron transfectadas con siRNA control o frente p62. Se enseñan los niveles de p62 y actina a los tiempos indicados posttransfección.

**c)** Las mismas células transfectadas fueron privadas de glucosa en presencia de DMSO o q-VD 48 horas después de la transfección y fijadas para subG1 a los tiempos indicados.

**d)** Células DKO fueron transfectadas con siRNA de p62. A las 48 o 72 horas se recogieron o trataron sin glucosa otras 24 o 48 horas. Se enseña un WB representativo de 2 experimentos independientes. En rojo se indican las horas post-transfección antes del tratamiento-recolección.





## **VII. DISCUSIÓN GENERAL**

Antes incluso de que se describieran procesos como la autofagia o la apoptosis ya se sabía que los tumores solían tener una alta tasa glicolítica (Warburg, Wind et al. 1927). Esta gran dependencia de la glucosa, causa o consecuencia del proceso tumoral, ha sido fuente de gran esperanza para la cura de la enfermedad. Ahora existen muchas más evidencias de que la célula tumoral es aeróbica, que suele tener la ruta oxidativa mitocondrial funcional y que la glicolisis es más un proceso fuente de elementos carbonados para el crecimiento que de ATP (Tong, Zhao et al. 2009). Aún así se sabe que los tumores son muy sensibles a la inhibición del metabolismo glicolítico, por lo que sigue siendo necesario conocer los mecanismos de adaptación y muerte a la escasez de nutrientes.

### **1. LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA INDUCE APOPTOSIS O NECROSIS DEPENDIENDO DE LA LÍNEA CELULAR**

Como hemos visto en los resultados, la privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak (DKO) induce muerte dependiente de caspasas, apoptosis. Durante años hemos tenido que probar y defender los siguientes resultados ante la comunidad científica:

Que realmente lo que vemos es apoptosis. El hecho de que la morfología de la célula vista al microscopio no sea la típica de un fenotipo apoptótico, y de que se hubieran publicado artículos (Suzuki, Kusakai et al. 2003) en los que consideran necrosis a efectos donde las caspasas pueden estar implicadas, nos ha hecho dedicarle mucho esfuerzo a demostrar sin dudas que lo que vemos tras la privación es apoptosis.

En nuestras manos las DKO están totalmente protegidas tras privarlas de glucosa en presencia de inhibidores de caspasas. Pero aunque durante 72 horas sean impermeables al yoduro de propidio, señal de viabilidad celular, los daños en la célula son tan grandes que estas células son incapaces de generar colonias de nuevo. En estos experimentos de clonogenicidad llama la atención que mientras hay células que se mueren en 24 horas, un pequeño

porcentaje de células puede estar hasta 13 días en ausencia total de glucosa y aún así mantener toda la viabilidad. Estas células no son detectables por métodos de citometría, pero sí por viabilidad celular. Aquí me surgen varias preguntas. ¿Qué diferencia a estas células de las más sensibles? ¿Es una cuestión genética? Spencer et al. describieron que dentro de una población de células había variabilidad en la sensibilidad a TRAIL (Spencer, Gaudet et al. 2009). Esta variabilidad no es debida a cambios genéticos, sino a diferencias intrínsecas en la concentración de proteínas importantes en el proceso. Dos células hermanas se comportan exactamente igual, conforme va pasando el tiempo se van diferenciando. En nuestro caso, en la privación de glucosa, una vez recuperada esa población resistente, ¿cómo se comportará en un nuevo tratamiento? ¿Son todas las descendientes de estas células resistentes a la privación de glucosa?

Son experimentos que se alejaban de mis objetivos de tesis, pero son preguntas que me han acompañado durante toda la tesis y probablemente sigan haciéndolo en el futuro.

Se puede observar en algún experimento (figura 7) que el q-VD es incapaz de inhibir totalmente la producción de subG1. En presencia de inhibidores de caspasas, y ante un tratamiento que induzca permeabilización mitocondrial, se puede producir muerte independiente de caspasas (CICD) (Colell, Ricci et al. 2007). Sin embargo, teóricamente, la inhibición de las caspasas debería impedir la activación de las endonucleasas responsables de la degradación del ADN típica de la apoptosis que genera el pico subdiploide o subG1.

¿Por qué la misma concentración de q-VD que impide totalmente la producción de subG1 en las DKO, no lo hace en las WT? Los cardiomiocitos son muy resistentes a apoptosis, porque tienen bajos niveles de Apaf1. Cuando cardiomiocitos adultos son sometidos a isquemia, mueren de forma independiente de caspasas pero sufren permeabilización mitocondrial con liberación de la endonucleasa “Endonucleasa G” (EndoG), presente en la mitocondria. EndoG es la responsable en estas células de la degradación del ADN en ausencia de actividad caspasa (Bahi, Zhang et al. 2006). Especulamos que en algunas células es posible que tras permeabilización mitocondrial en ausencia de actividad caspasa, la EndoG pueda inducir un perfil “subG1”.

En la misma línea que lo anterior, llama la atención que a pesar de existir actividad caspasa en las DKO tras la privación de glucosa, a diferencia del tratamiento con TNF, el aspecto de la cromatina condensada es distinto. La privación de glucosa induce una condensación en forma de bolas en torno a la membrana nuclear que visto en 3D tiene el aspecto de una mora. Y esta condensación atípica no es evitada por la inhibición de las caspasas. Ante un estrés tan brutal como es la privación total de glucosa, la célula debe responder de manera exagerada. Si una célula se enfrenta a escasez de nutrientes, se produce una bajada en los niveles de NADH. Un aumento en el equilibrio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}$ , induce la activación de unas proteínas llamadas sirtuínas. Estas proteínas forman parte de un complejo que actúan como histonas deacetilasas, e inducen condensación de la cromatina y silenciamiento génico (Murayama, Ohmori et al. 2008). En ausencia de actividad caspasa (o con actividad caspasa) esto es lo que podría estar pasando.

Otra cosa que llama la atención en los tratamientos sin glucosa es la variabilidad entre experimentos. Sin llegar a estudiarlo en profundidad, creemos que el estado previo de las células, si en el momento de sembrarlas estaban muy confluentes, o cuántos días llevaban en cultivo, influye en la cinética de muerte. Esto es especialmente dramático en las WT. Hay experimentos en los que a las 24 horas un 80% de las células estaban muertas y en la mayoría esto no pasaba hasta las 48 horas. Esto indica que el estado metabólico previo de la célula determina en buena medida su respuesta a la escasez.

También la confluencia. Al contrario de lo que se podría pensar, la confluencia afecta negativamente a las células. Cuantas menos células por superficie hay, más resistentes son las células DKO a la privación de glucosa. Son datos no enseñados pero reproducibles. Probablemente en el medio hay algún factor limitante, quizás la glutamina, o algún componente del suero.

La apoptosis inducida por la privación de glucosa es independiente de la vía mitocondrial.

En pos de la búsqueda de nuevas rutas apoptóticas y debido a que muchos tumores tienden a bloquear la ruta intrínseca de la

apoptosis, han surgido muchos artículos donde se describían “nuevas” vías de liberación de citocromo C y despolarización mitocondrial. Por ello, en numerosas ocasiones en los que nuestros resultados eran enseñados, se nos planteaba la cuestión de si en estas células deficientes en Bax y Bak se podía dar alguna de estas formas de “apoptosis vía mitocondrial independiente de Bax y Bak”.

Una de estas vías es la “transición de permeabilización mitocondrial” (mPT en inglés). Pero al final, se vio con los ratones deficientes en Ciclofilina A, una de las proteínas supuestamente implicadas en este poro, que no es apoptosis sino necrosis lo que induce esta mPT. (Nakagawa, Shimizu et al. 2005)

Dos años después de ese artículo publicado en Nature, el mismo grupo dirigido por el Dr. Tsujimoto volvió a publicar un artículo (Mizuta, Shimizu et al. 2007) donde se abría la posibilidad de que en ausencia de Bax y Bak se indujera permeabilización mitocondrial capaz de activar caspasa-9. Ellos inducen muerte combinando ácido araquidónico con un ionóforo llamado A23187 que incrementa los niveles intracelulares de calcio.

En este artículo describen que células deficientes en Apaf-1 son resistentes (con Bax y Bak), pero las DKO no. Además, aunque no lo enseñan, la sensibilidad de estas células a la combinación era dependiente de su inmortalización, o sea, a la actividad p53, ya que células primarias no inmortalizadas morían por necrosis. Ellos basan sus resultados en la medida de la exposición de fosfatidil serina o la actividad caspasa por corte del sustrato DEVD. Cuando silencian caspasa-9 o citocromo C, las células sufren menos externalización de fosfatidilserina, aunque no muestran incorporación de yoduro de propidio para ver el destino de esas células. Así mismo, la sobre-expresión de Bcl-xL no protegió a estas células. La muerte que ellos observan parece ser dependiente de actividad serínproteasas (no caspasas), y concluyen que esta actividad proteasa está por encima de la liberación de citocromo C, aunque no lo demuestran efectivamente.

Este artículo abría la posibilidad de que el tratamiento sin glucosa estuviera induciendo liberación de citocromo C y activación de caspasa-9 independientemente de Bax y Bak y del “poro de permeabilización mitocondrial” (mPT). Por ello, por un lado sobre-expresamos Bcl-xL en las DKO, por la posibilidad de que otra

proteína familia de las Bcl-2 proapoptóticas, Bok, estuviera implicada. Y por otro, silenciamos caspasa-9. Además, por el microscopio electrónico se puede observar que después de 48 horas de tratamiento las mitocondrias están intactas. Buena parte de esas células están ya muertas porque solamente cogimos las células despegadas. Creemos que existen suficientes indicios para creer que la apoptosis que se induce tras la privación en células deficientes en Bax y Bak es independiente de la permeabilización de la mitocondria.

¿Son estos resultados relevantes a nivel fisiológico? Numerosos tumores inactivan de una u otra forma la apoptosis, especialmente la ruta mitocondrial (Philchenkov, Zavelevich et al. 2004). Por ello, entendíamos que estas células eran útiles para estudiar nuevas dianas terapéuticas.

Aún así, además de estudiar la muerte en fibroblastos murinos que expresen Bax y Bak, las silvestres (WT), lo hicimos en células tumorales como HeLa, MCF7 o rhabdomyosarcoma (RH30). Cada línea se comporta de manera distinta, mientras que las HeLa sufren apoptosis, las otras dos líneas mueren independientemente de caspasas. Llama la atención que las HeLa no tengan subG1. Su morfología, tanto al microscopio como en el citómetro es claramente apoptótica, además de ser inhibida eficientemente por inhibidores de caspasas. Sin embargo, y a pesar de utilizar distintas técnicas de fijación, por alguna razón que desconocemos no conseguimos ver subG1.

También nos planteábamos el que era posible que la selección que sufren las células deficientes en Bax y Bak durante su producción, además de sus problemas en la fisión mitocondrial (Youle and Karbowski 2005), podría hacer esta muerte independiente de mitocondria una particularidad de esta línea. Por otro lado, el que las HeLa mueran por apoptosis no es extraño, ya que posiblemente se esté produciendo permeabilización mitocondrial.

En las figuras 7 y 8 vemos que la privación de glucosa efectivamente puede matar por apoptosis independientemente de mitocondria en diferentes líneas celulares.

Detengámonos un momento en la figura 8a. Esta gráfica demuestra lo complejo que es el estudio de las relaciones entre el metabolismo

y la muerte celular. Demuestran también que la ciencia no puede ser ni reduccionista ni determinista. La proteína Bcl-xL tiene multitud de funciones, es paradigmática en este sentido. Las funciones pueden ser consideradas incluso opuestas desde una supuesta racionalidad natural. Por un lado Bcl-xL se describió como una proteína antiapoptótica (Boise, González-García et al. 1993), pero cuyo gen puede transcribir dos proteínas con actividades opuestas. Por otro lado se describió que Bcl-xL puede estar inhibiendo la autofagia, al interaccionar con una proteína con un dominio “sólo BH3” (Beclina), pero cuya función está relacionada con la autofagia e indirectamente puede inhibir apoptosis. Aquí no termina el nudo gordiano. Para facilitar la detección de las proteínas que se sobre-expresan se suelen utilizar “etiquetas” (tags). Por ejemplo, el plásmido de Bcl-xL que portan los fibroblastos WT tiene unido “Flag” en el extremo N-terminal. Pues esta pequeña modificación hace que la proteína ejerza una función distinta de la esperada. Mientras un Bcl-xL nativo es capaz de proteger de la apoptosis inducida por “repeticiones de poliglutamina”, cuando la proteína está modificada por un Flag no protege (Sánchez, Xu et al. 1999).

En nuestro caso la presencia de Bcl-xL – Flag hace que el q-VD sea incapaz de proteger a las células de la privación de glucosa y que en ausencia de suero el q-VD incluso las sensibilice. No tenemos explicación para estos resultados. Suponemos que en el caso de la privación de suero tiene que ver con una inhibición de la autofagia. Aunque puede estar afectando la presencia de Flag.

## **2. LA CASPASA INICIADORA ES LA CASPASA-8 PERO INDEPENDIENTEMENTE DE LA VÍA CLÁSICA DE RECEPTORES DE MUERTE**

CrmA, el shRNA y el siRNA nos demuestran que la caspasa-8 está implicada en la muerte por privación de glucosa. Estos experimentos nos demuestran que está implicada, no que sea la iniciadora, ni mucho menos cómo se está activando. Pero el hecho de que sea una caspasa iniciadora, que tiene que ser activada por dimerización y por tanto no puede ser activada por procesamiento de otra caspasa, nos hace pensar que es la caspasa iniciadora. Aunque, de nuevo, es una suposición.

La selección de los clones (figura 10a) que menos caspasa-8 expresaban fue una tarea ardua porque esos clones crecían mucho más lento que su control (vacío). Es evidente que la caspasa-8 tiene más funciones que la de empezar la apoptosis (Varfolomeev, Schuchmann et al. 1998).

Las células DKO con menos caspasa-8 están protegidas totalmente de TNF y bastante de la privación de glucosa. Estas diferencias podrían ser por dos cosas. Una que existan más elementos que estuvieran “lanzando” la apoptosis, y otra que para la muerte por privación de glucosa hiciera falta menos caspasa-8. Esto cuadraría con que la cinética de muerte con los ligandos de muerte es mucho más rápida, menos de 24 horas. Sin embargo, la privación de glucosa necesita más de 24 horas para empezar a tener efecto.

Tenemos más datos que nos confirman que la caspasa-8 está implicada en la muerte. En la Universidad La Trobe de Melbourne, en el laboratorio del Dr. John Silke, pudimos utilizar fibroblastos murinos deficientes en caspasa-8. Estas células estaban bastante protegidas de la privación de glucosa con respecto a su contraparte silvestre. Sin embargo, no pudimos publicar estos resultados por cuestiones de propiedad de las células.

También utilizamos unas células deficientes en Bax, Bak y caspasa-8 que fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Green en Memphis. Estas células “triple knock-out” siguen muriendo de manera dependiente de caspasas, apenas un 10% menos que su contraparte caspasa-8 positivas. El análisis de la expresión de Bax y caspasa-8 por western blot y por citometría nos aporta dudas de un completo silenciamiento, por lo que decidimos no utilizar estos datos. Por un lado detectamos una pequeñísima banda a la altura de caspasa-8 y Bax. Por otro lado, la caspasa-8 tiene unido GFP, y en las que tenían que ser triple knock-out, existe un porcentaje de células que son GFP positivas. Esto no demuestra necesariamente que caspasa-8 se esté expresando en esas células, porque puede haber deleciones parciales, pero de todas maneras, si fuera así, no explicaría el que estas células se murieran por apoptosis tras la privación de glucosa. Tendríamos que clonar estas células y elegir un clon que realmente no expresara Bax, Bak y caspasa-8. Serán células útiles para estudiar el papel del resto de caspasas en la



muerte por privación de glucosa. Desde luego queda mucho por estudiar en este sentido.

La pregunta que de nuevo queríamos responder es si efectivamente la falta de caspasa-8 protege en un sentido amplio, o sea, es capaz de aumentar la viabilidad de esa población de células. Para ello hicimos unos cuantos experimentos de viabilidad con cristal violeta, igual que en la figura 4c. Los resultados fueron un poco disparatados y necesitaban de muchos experimentos para ser publicables. Al contrario de lo esperado, los clones A8 y D5, los que menos caspasa-8 expresaban tenían menos capacidad clonogénica que las células control. Esto era bastante reproducible. A los tres días de tratamiento ya se pueden ver diferencias. Pero no sólo en estos clones desaparece la capacidad clonogénica. Las células que expresan la proteína viral CrmA, que inhibe selectivamente a las caspasas-1 y 8, mientras que están protegidas de la privación de glucosa cuando analizamos por subG1 o incorporación de yoduro de propidio (figura 9), cuando analizamos su capacidad clonogénica, o sea la viabilidad por cristal violeta, las células están de alguna forma “sensibilizadas”.

Esto quiere decir que la ausencia de caspasa-8, o la ausencia de su actividad, impide de alguna manera su recuperación, o su capacidad de volver a crecer tras el tratamiento. Entonces estas células no están “muertas” pero han dejado de ser viables. O sea, caspasa-8: ni con ella ni sin ella. Es probable que la caspasa-8 sea la responsable de la muerte y a la vez necesaria para la recuperación. Estos resultados necesitarían de más experimentos. Por ejemplo, en fibroblastos totalmente deficientes en caspasa-8, analizar su viabilidad con distintos mutantes. Un dominante negativo para el dominio de unión a FADD, otro con el centro catalítico inactivo, etc. De esa manera podríamos ver si es la actividad catalítica la necesaria para recuperación tras el tratamiento.

Estos resultados hay que tenerlos en cuenta, tanto para la interpretación de resultados de muerte celular en tratamientos anti-tumorales, como para muchas otras proteínas implicadas en muerte o supervivencia. Dependiendo de la técnica de análisis así será el resultado.

Otra cosa que nos ha llamado la atención es la diferencia en el efecto del q-VD y el silenciamiento de caspasa-8 en el corte de caspasa-3. Si nos fijamos en la figura 3c, el q-VD no es capaz de inhibir el primer procesamiento de caspasa-3, el que da el fragmento de p20. Sin embargo, si observamos la figura 10d, el silenciamiento de caspasa-8 reduce el corte en general, tanto el del fragmento p20, como el p17. Creemos que el q-VD no es capaz de inhibir la caspasa-8 en nuestras condiciones, y está cortando la caspasa-3 sin activarla debido a la presencia del inhibidor. Esto se ha descrito con el inhibidor z-VAD, que no inhibe eficazmente la actividad de caspasa-8 en su proforma, o en ausencia de cFLIPL (Wachter, Sprick et al. 2004), aunque sí la caspasa-8 activa. De todas maneras, de nuevo, harían falta muchos más experimentos para asegurar este resultado.

Si nos fijamos en la figura 8, podemos observar que la muerte por privación de glucosa en las HeLa era probablemente independiente de la ruta mitocondrial, ya que ni el ABT737 sensibiliza, ni la sobre-expresión de Bcl-xL protege. Por ello pasamos a comprobar si era también dependiente de caspasa-8 como en las DKO. Y así fue. Sin embargo se ha descrito en estas células que la privación de glucosa puede sensibilizar a ligandos de muerte (Munoz-Pinedo, Ruiz-Ruiz et al. 2003). En un futuro cercano tendremos que silenciar receptores de muerte, bloquear ligandos, etc. Básicamente intentar reproducir los resultados de los capítulos 4 y 5 para comprobar que el mecanismo por el que se activa caspasa-8 en DKO está generalizado en distintas líneas celulares y especies.

Hemos intentado silenciar caspasa-8 tanto en células silvestres WT, como en los mismos fibroblastos sobre-expresando establemente Bcl-xL. En las células WT el silenciamiento de caspasa-8 no ha protegido a las células ni de la privación de glucosa ni de ligandos de muerte. En los fibroblastos murinos que sobre-expresan Bcl-xL, la bajada de caspasa-8 no sólo no protege, sino que hay más subG1. Y lo más interesante es que en las células con menos caspasa-8 y en presencia de q-VD se produce una sensibilización cuando son tratadas con TNF. Algo digno de estudiar en profundidad. Porque esta sensibilización es al subG1. Si fuera necroptosis, en principio no habría actividad caspasa y por tanto no habría subG1 tras el tratamiento con TNF en presencia de q-VD.

La privación de glucosa sensibiliza a necrosis inducida por ligandos.

Simplificando podríamos decir que existen tres vías por las que los ligandos de muerte (al menos el TNF) pueden matar.

La vía que es inhibida por c-FLIPL, que suele ser “abierta” por la cicloheximida.

Otra dependiente de RIPK1 que necesita del silenciamiento de cIAP1. Ambas inducen activación de caspasa-8 y apoptosis.

Una tercera que depende de la actividad kinasa de RIPK1, que induce necroptosis a través de RIPK3.

La privación parcial de glucosa en HeLa las sensibiliza a los ligandos de muerte (Munoz-Pinedo, Ruiz-Ruiz et al. 2003). Pero las sensibiliza a apoptosis medida por subG1.

Por ello esperábamos que la privación de glucosa en células DKO las sensibilizara a apoptosis inducida por ligandos de muerte, ya sea a través de la bajada de cIAP1 o de FLIP. Sin embargo, comprobamos que sensibilizaba, pero sólo cuando lo medíamos por incorporación de yoduro de propidio y no cuando medíamos apoptosis (figuras 13c, 14b y 15c). Estos resultados eran bastante reproducibles. Sería interesante estudiar si esto es necroptosis, si esta sensibilización es revertida con necrostatina y es dependiente de la actividad kinasa de RIPK1.

Uno de los experimentos más intrigantes es el de FLIP (figura 16b). El tratamiento sin glucosa en presencia de q-VD, a 72 horas, está menos protegido con FLIP. FLIP funciona de inhibidor competitivo de caspasa-8. Se une a FADD impidiendo la unión de caspasa-8. Mientras que es capaz de proteger eficientemente del tratamiento con ligandos de muerte, no lo es de la privación de glucosa. Como decía antes, esperábamos que la privación de glucosa, como hace la cicloheximida, inhibiera la inducción de NF- $\kappa$ B y bajarán los niveles de c-FLIPL, permitiendo el reclutamiento de caspasa-8. La gran cantidad de isoformas y modificaciones que tiene FLIP ha hecho muy difícil analizar la proteína por WB.

Estos resultados no pueden analizarse independientemente de los de FADD (figuras 17 y 18). De tres maneras hemos intentado silenciar a FADD o inhibir su actividad. Ninguna de las tres maneras ha protegido de la privación de glucosa, pero tampoco eficientemente del tratamiento con ligandos de muerte. ¿Pero, puede

FADD actuar de manera independiente de FLIP? Si FADD es el responsable del reclutamiento de caspasa-8, FLIP debería contrarrestarlo. Todos los indicios apuntan a que FADD no es la responsable del reclutamiento de caspasa-8, pero hay que conseguir que al silenciar a la proteína se proteja de ligandos, probar diferentes dominantes negativos, etc.

Este será uno de los principales objetivos del futuro reciente, aclarar el papel de FADD en la privación de glucosa en células tumorales humanas.

Si ni FLIP, ni RIPK1, ni FADD parecen jugar un papel en la muerte por privación de ligandos, ¿qué es lo que está activando caspasa-8?

Antes de pasar a discutir esta pregunta, analicemos lo que hemos podido investigar sobre las relaciones entre metabolismo y muerte en la privación de glucosa.

### **3. METABOLISMO Y MUERTE CELULAR**

Si bien no corresponde al objeto de esta tesis, en el grupo tenemos fundadas sospechas de que la privación de glucosa per se, no la escasez de nutrientes en general, sino privación de glucosa en presencia de otros nutrientes y factores presentes en el suero, es incapaz de inducir autofagia resolutive. Probablemente por la incapacidad del lisosoma de acidificarse y/o unirse al autofagosoma por la falta de ATP, por la falta de proteínas esenciales que tienen que ser glicosiladas, etc.

Observando detenidamente las imágenes de microscopía electrónica se puede ver que existen unos acúmulos densos, que no están rodeados de doble membrana (Fig. 24).

Tendemos a pensar que la función de las proteínas está determinada por su naturaleza. Como mucho consideramos que pueden ser activadas o inhibidas como si de un interruptor de la luz se tratara. La activación de la caspasa-8 depende de muchos factores, muchos de ellos desconocidos. Concentración de la proteína, de sus moléculas adaptadoras como FADD, de las inhibidoras como FLIP, de los estímulos, y a su vez de los factores que regulan cada una de los elementos que condicionan la activación de la caspasa-8, en una cadena de interacciones difícil de analizar de un sólo vistazo.

Uno de los últimos factores que se han descubierto que regulan la actividad de la caspasa-8 es la “poly-ubiquitinización”. La Culina 3, es una E3 ligasa aparentemente necesaria para la activación de caspasa-8 por TRAIL (Jin, Li et al. 2009). Además, la caspasa-8, después de ser ubiquitiniladas en K48 y K63 es conducida a agregados proteicos de alto peso molecular en “lipid-rafts”. Después de la ubiquitinización se encuentra en el DISC otra proteína, la p62-sequestosoma-1 que internaliza al DISC. Pero caspasa-8 no es degradada, sino que su actividad se ve incrementada. Se sabe que la ubiquitinización de FLIP o de RIPK1 lleva a su degradación, no así con la caspasa-8. De hecho el silenciamiento de p62 impide la activación de caspasa-8 tras el tratamiento con TRAIL (Jin, Li et al. 2009).

Por otro lado, al intentar averiguar si las DKO inducían autofagia ante la privación de glucosa, miramos los niveles de p62, que es utilizado como marcador de autofagia porque se degrada durante la misma. Sorprendentemente, lo que observamos es una gran acumulación de la proteína. Ante estos resultados pensamos que la caspasa-8 estaba siendo agregada por p62 también en nuestro sistema, y que podía ser la responsable de su activación, aunque fuese de manera independiente de ligando. Por ello silenciamos p62, de manera bastante eficiente, incluso la acumulación inducida por el tratamiento no revertía el silenciamiento (figura 25). Aún así no conseguimos que la falta de p62 revertiera la muerte en las DKO. ¿Podemos concluir que p62 no está implicado? ¿O solamente que la acumulación de p62 no está implicada? Tendríamos que analizar el estado de ubiquitinización de caspasa-8. También nos gustaría hacer inmunofluorescencia, para ver si podemos ver colocalización de p62 y caspasa-8. Esta inmuno se podría hacer con marcaje de oro para microscopio electrónico, así podríamos ver si la caspasa-8 está localizada en esos acúmulos que vemos en la microscopía electrónica.

Hay que tener en cuenta que el papel de las moléculas adaptadoras como FADD es aproximar las moléculas de caspasa-8, aumentar la probabilidad de que interaccionen y se activen. Creemos que sería posible que la imposibilidad de degradación de proteínas mal plegadas debido a la ausencia de autofagia y de actividad del proteosoma, podría generar acúmulos de proteínas, entre las que podría estar caspasa-8 (Sánchez, Xu et al. 1999). Esto de alguna

manera podría inducir la activación de la caspasa y la inducción de apoptosis al aumentar la probabilidad de que se produzca interacción de las moléculas de caspasa-8.

Creo que esta tesis confirma lo compleja que es la biología, aunque parezca de Perogrullo. Los dogmas, el reduccionismo, las modas o las prisas por publicar son los grandes enemigos del avance de la ciencia.

Averiguar los mecanismos de activación de la caspasa-8 u otras es necesario para encontrar tratamientos antitumorales. Pero la cantidad de variables es tan alta que los estudios necesitarían de redes de grupos multidisciplinarios cuya presión fuese descubrir los mecanismos y no publicar.



## VIII.CONCLUSIONES

1. La privación de glucosa induce apoptosis con un fenotipo atípico en células deficientes en Bax y Bak.
2. La apoptosis inducida por privación de glucosa es dependiente de caspasas e independiente de la vía intrínseca de la apoptosis.
3. La caspasa-8 está implicada en la muerte por privación de glucosa tanto en fibroblastos deficientes en Bax y Bak como en células humanas HeLa.
4. La privación de glucosa mata de forma independiente de la interacción de los ligandos de muerte con sus receptores en los fibroblastos deficientes en Bax y Bak.
5. La privación de glucosa mata de forma independiente del complejo proteico DISC clásico y del complejo dependiente de la quinasa RIPK1.





## IX. REFERENCIAS

- Alves, N. L., I. A. Derks, et al. (2006). "The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells." Immunity **24**(6): 703-16.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-8.
- Austin, M. and S. J. Cook (2005). "Increased Expression of Mcl-1 Is Required for Protection against Serum Starvation in Phosphatase and Tensin Homologue on Chromosome 10 Null Mouse Embryonic Fibroblasts, but Repression of Bim Is Favored in Human Glioblastomas." J. Biol. Chem. **280**(39): 33280-33288.
- Bahi, N. r., J. Zhang, et al. (2006). "Switch from Caspase-dependent to Caspase-independent Death during Heart Development." Journal of Biological Chemistry **281**(32): 22943-22952.
- Bell, B. D. and C. M. Walsh (2009). "Coordinate regulation of autophagy and apoptosis in T cells by death effectors: FADD or foundation." Autophagy **5**(2): 238-40.
- Boise, L. H., M. González-García, et al. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." Cell **74**(4): 597.
- Bouchier-Hayes, L., A. Oberst, et al. (2009). "Characterization of Cytoplasmic Caspase-2 Activation by Induced Proximity." Molecular Cell **35**(6): 830.
- Bruhat, A., C. Jousse, et al. (1997). "Amino Acid Limitation Induces Expression of CHOP, a CCAAT/Enhancer Binding Protein-related Gene, at Both Transcriptional and Post-transcriptional Levels." J. Biol. Chem. **272**(28): 17588-17593.
- Brunelle, J. K., E. H. Shroff, et al. (2007). "Loss of Mcl-1 protein and inhibition of electron transport chain together induce anoxic cell death." Mol Cell Biol **27**(4): 1222-35.
- CARO, L. H. P., J. A. M. P. Peter, et al. (1988). "3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism." European Journal of Biochemistry **175**(2): 325-329.
- Cohen, G. M., X. M. Sun, et al. (1994). "Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes." J Immunol **153**(2): 507-516.

- Colell, A., J. E. Ricci, et al. (2007). "GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation." Cell **129**(5): 983-97.
- Cullen, S. P. and S. J. Martin (2008). "Mechanisms of granule-dependent killing." Cell Death Differ **15**(2): 251-62.
- Chen, G. and D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway." Science [%R 10.1126/science.1071924](https://doi.org/10.1126/science.1071924) **296**(5573): 1634-1635.
- Cheng, J., T. Zhou, et al. (1994). "Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule." Science **263**(5154): 1759-62.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2005). "Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?" Nat Rev Mol Cell Biol **6**(3): 268.
- Christofferson, D. E. and J. Yuan (2010). "Necroptosis as an alternative form of programmed cell death." Current Opinion in Cell Biology **22**(2): 263.
- Dang, C. and B. Lewis (1997). "Role of oncogenic transcription factor c-Myc in cell cycle regulation, apoptosis and metabolism." Journal of Biomedical Science **4**(6): 269.
- Danial, N. N. (2009). "BAD: undertaker by night, candyman by day." Oncogene **27**(S1): S53.
- DeBerardinis, R. J. and T. Cheng (2009). "Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer." Oncogene **29**(3): 313.
- Degenhardt, K., R. Mathew, et al. (2006). "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis." Cancer Cell **10**(1): 51.
- Degterev, A., J. Hitomi, et al. (2008). "Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins." Nat Chem Biol **4**(5): 313.
- Deng, J., N. Carlson, et al. (2007). "BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents." Cancer Cell **12**(2): 171-85.
- Depuydt, B., G. Van Loo, et al. (2005). "Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors." J Cell Sci [%R 10.1242/jcs.01640](https://doi.org/10.1242/jcs.01640) **118**(3): 497-504.
- Desbarats, J. and M. K. Newell (2000). "Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy." Nat Med **6**(8): 920-3.

- Dohrman, A., T. Kataoka, et al. (2005). "Cellular FLIP (Long Form) Regulates CD8+ T Cell Activation through Caspase-8-Dependent NF- $\kappa$ B Activation." J Immunol **174**(9): 5270-5278.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (2003). "MAMMALIAN CASPASES: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis." Annual Review of Biochemistry **68**(1): 383.
- Eckelman, B. P. and G. S. Salvesen (2006). "The Human Anti-apoptotic Proteins cIAP1 and cIAP2 Bind but Do Not Inhibit Caspases." Journal of Biological Chemistry **281**(6): 3254-3260.
- Feig, C., V. Tchikov, et al. (2007). "Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling." Embo J **26**(1): 221-31.
- Fimia, G. M. and M. Piacentini (2010). "Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis." Cell Mol Life Sci **67**(10): 1581-8.
- Garber, K. (2004). "Energy Boost: The Warburg Effect Returns in a New Theory of Cancer." J. Natl. Cancer Inst. **96**(24): 1805-1806.
- Geserick, P., M. Hupe, et al. (2009). "Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment." J. Cell Biol. **187**(7): 1037-1054.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends in Biochemical Sciences **32**(1): 37.
- Gong, B. and A. Almasan (2000). "Apo2 Ligand/TNF-related Apoptosis-inducing Ligand and Death Receptor 5 Mediate the Apoptotic Signaling Induced by Ionizing Radiation in Leukemic Cells." Cancer Res **60**(20): 5754-5760.
- Gong, J., F. Traganos, et al. (1994). "A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry." Anal. Biochem. **218**: 314.
- Gröbner, S., I. Adkins, et al. (2007). "Catalytically active Yersinia outer protein P induces cleavage of RIP and caspase-8 at the level of the DISC independently of death receptors in dendritic cells." Apoptosis **12**(10): 1813.
- Hagemann, T., F. Balkwill, et al. (2007). "Inflammation and cancer: a double-edged sword." Cancer Cell **12**(4): 300-1.
- Hamasaki, M. and T. Yoshimori (2010). "Where do they come from? Insights into autophagosome formation." FEBS Letters **584**(7): 1296.

- Han, J., W. Hou, et al. (2008). "Involvement of Protective Autophagy in TRAIL Resistance of Apoptosis-defective Tumor Cells." Journal of Biological Chemistry **283**(28): 19665-19677.
- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 774.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770.
- Herrero-Martin, G., M. Hoyer-Hansen, et al. (2009). "TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells." EMBO J **28**(6): 677.
- Hitomi, J., D. E. Christofferson, et al. (2008). "Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway." Cell **135**(7): 1311-23.
- Holler, N., R. Zaru, et al. (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol **1**(6): 489-95.
- Hsu, S. Y., A. Kaipia, et al. (1997). "Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12401-6.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." Nature **388**(6638): 190.
- Itoh, N., S. Yonehara, et al. (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." Cell **66**(2): 233-43.
- Jin, Z., Y. Li, et al. (2009). "Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling." Cell **137**(4): 721.
- Jones, R. G. and C. B. Thompson (2009). "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth." Genes Dev **23**(5): 537-48.
- Jost, P. J., S. Grabow, et al. (2009). "XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis." Nature **460**(7258): 1035.
- Kamada, Y., T. Funakoshi, et al. (2000). "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." J Cell Biol **150**(6): 1507-13.
- Kang, H. T. and E. S. Hwang (2006). "2-Deoxyglucose: An anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic." Life Sciences **78**(12): 1392-1399.

- Karbowski, M., K. L. Norris, et al. (2006). "Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis." Nature **443**(7112): 658.
- Kasibhatla, S., T. Brunner, et al. (1998). "DNA Damaging Agents Induce Expression of Fas Ligand and Subsequent Apoptosis in T Lymphocytes via the Activation of NF-[kappa]B and AP-1." Molecular Cell **1**(4): 543.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kirkegaard, K., M. P. Taylor, et al. (2004). "Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms." Nat Rev Microbiol **2**(4): 301-14.
- Kirkin, V., D. G. McEwan, et al. (2009). "A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy." **34**(3): 259.
- Kitevska, T., D. Spencer, et al. (2009). "Caspase-2: controversial killer or checkpoint controller?" Apoptosis **14**(7): 829.
- Kochl, R., X. W. Hu, et al. (2006). "Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes." Traffic **7**(2): 129-45.
- Komatsu, M. and Y. Ichimura (2010). "Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy." FEBS Letters **584**(7): 1374.
- Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, et al. (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." Blood **84**(5): 1415-1420.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- Krysko, D. V., G. Denecker, et al. (2006). "Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells." Cell Death Differ **13**(12): 2011.
- Kunz, J. B., H. Schwarz, et al. (2004). "Determination of Four Sequential Stages during Microautophagy in Vitro." Journal of Biological Chemistry **279**(11): 9987-9996.
- Lee, Y. J., S. S. Galoforo, et al. (1997). "Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death." J Cell Sci **110**(5): 681-686.
- Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the Pathogenesis of Disease." Cell **132**(1): 27-42.

- Li, J., B. Lee, et al. (2006). "Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis." Journal of Biological Chemistry **281**(11): 7260-7270.
- Li, Y., L. Qi, et al. (2009). "Alternative Fas-mediated cell death pathway is dependent on the different cleavage patterns of procaspase-8." Mol Cell Biochem **331**(1-2): 231-8.
- Liang, J., S. H. Shao, et al. (2007). "The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis." Nat Cell Biol **9**(2): 218.
- Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**(6): 1389-99.
- Lum, J. J., D. E. Bauer, et al. (2005). "Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis." Cell **120**(2): 237.
- Maelfait, J. and R. Beyaert (2008). "Non-apoptotic functions of caspase-8." Biochemical Pharmacology **76**(11): 1365.
- Marsters, S. A., J. P. Sheridan, et al. (1997). "A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain." **7**(12): 1003.
- Martin, S. J. and D. R. Green (1995). "Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts?" Cell **82**(3): 349.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, et al. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." J Exp Med **182**(5): 1545-56.
- Mathew, R., S. Kongara, et al. (2007). "Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability." Genes Dev. **21**(11): 1367-1381.
- McStay, G. P., G. S. Salvesen, et al. (2008). "Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways." Cell Death Differ **15**(2): 322-31.
- Medema, J. P., C. Scaffidi, et al. (1997). "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." Embo J **16**(10): 2794-804.
- Milleron, R. S. and S. B. Bratton (2006). "Heat Shock Induces Apoptosis Independently of Any Known Initiator Caspase-activating Complex." Journal of Biological Chemistry **281**(25): 16991-17000.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, et al. (2010). "Methods in mammalian autophagy research." Cell **140**(3): 313-26.

- Mizuta, T., S. Shimizu, et al. (2007). "A Bax/Bak-independent Mechanism of Cytochrome c Release." J. Biol. Chem. **282**(22): 16623-16630.
- Mordier, S., C. Deval, et al. (2000). "Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway." J Biol Chem **275**(38): 29900-6.
- Mortensen, M. and A. K. Simon (2010). "Nonredundant role of Atg7 in mitochondrial clearance during erythroid development." Autophagy **6**(3): 423-5.
- Mortimore, G. E. and A. R. Poso (1987). "Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply." Annu Rev Nutr **7**: 539-64.
- Munoz-Pinedo, C., C. Ruiz-Ruiz, et al. (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**(15): 12759-12768.
- Murayama, A., K. Ohmori, et al. (2008). "Epigenetic Control of rDNA Loci in Response to Intracellular Energy Status." Cell **133**(4): 627.
- Nakagawa, T., S. Shimizu, et al. (2005). "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death." Nature **434**(7033): 652.
- Nam, S. Y., A. A. Amoscato, et al. (2002). "Low glucose-enhanced TRAIL cytotoxicity is mediated through the ceramide-Akt-FLIP pathway." Oncogene **21**(3): 337-46.
- Nishida, Y., S. Arakawa, et al. (2009). "Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy." Nature **461**(7264): 654-8.
- Oberst, A., C. Pop, et al. (2010). "Inducible Dimerization and Inducible Cleavage Reveal a Requirement for Both Processes in Caspase-8 Activation." Journal of Biological Chemistry **285**(22): 16632-16642.
- Perez-Gomez, C., J. A. Campos-Sandoval, et al. (2005). "Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells." Biochem J **386**(Pt 3): 535-42.
- Philchenkov, A., M. Zavelevich, et al. (2004). "Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities." Exp Oncol **26**(2): 82-97.
- Pop, C., P. Fitzgerald, et al. (2007). "Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization." Biochemistry **46**(14): 4398-407.



- Pradelli, L. A., M. Beneteau, et al. (2010). "Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation." Oncogene **29**(11): 1641.
- Prindull, G. (1995). "Apoptosis in the embryo and tumorigenesis." European Journal of Cancer **31**(1): 116.
- Puthalakath, H., L. A. O'Reilly, et al. (2007). "ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim." Cell **129**(7): 1337.
- R.Kerr, J. F., B. Harmon, et al. (1974). "An Electron-Microscope Study of Cell Deletion in the Anuran Tadpole Tail During Spontaneous Metamorphosis with Special Reference to Apoptosis of Striated Muscle Fibres." J Cell Sci **14**(3): 571-585.
- Raez, L. E., V. Langmuir, et al. (2007). "Responses to the combination of the glycolytic inhibitor 2-deoxy-glucose (2DG) and docetaxel (DC) in patients with lung and head and neck (H/N) carcinomas." Journal of Clinical Oncology **25**(18S): 14025.
- Rao, P., K. C. Hsu, et al. (1995). "Upregulation of NF-kappa B-dependent gene expression mediated by the p75 tumor necrosis factor receptor." J Interferon Cytokine Res **15**(2): 171-7.
- Ross, T., F. Xu, et al. (2000). "Differential effects of chloroquine on cardiolipin biosynthesis in hepatocytes and H9c2 cardiac cells." Molecular and Cellular Biochemistry **207**(1): 115.
- Sánchez, I., C.-J. Xu, et al. (1999). "Caspase-8 Is Required for Cell Death Induced by Expanded Polyglutamine Repeats." Neuron **22**(3): 623.
- Sasi, N., M. Hwang, et al. (2009). "Regulated cell death pathways: New twists in modulation of BCL2 family function." Molecular Cancer Therapeutics **8**(6): 1421-1429.
- Sato, K., K. Tsuchihara, et al. (2007). "Autophagy Is Activated in Colorectal Cancer Cells and Contributes to the Tolerance to Nutrient Deprivation." Cancer Res **67**(20): 9677-9684.
- Sattler, M., H. Liang, et al. (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis." Science **275**(5302): 983-986.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784.
- Shimizu, S., T. Kanaseki, et al. (2004). "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes." Nat Cell Biol **6**(12): 1221-8.

- Shroff, E. H., C. Snyder, et al. (2007). "Role of Bcl-2 family members in anoxia induced cell death." Cell Cycle **6**(7): 807-9.
- Sobell, H. M. (1985). "Actinomycin and DNA transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(16): 5328-31.
- Soule, H. D., J. Vazquez, et al. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1409-16.
- Spencer, S. L., S. Gaudet, et al. (2009). "Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis." Nature **459**(7245): 428-32.
- Stanger, B. Z., P. Leder, et al. (1995). "RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death." Cell **81**(4): 513-23.
- Strasser, A. (2005). "The role of BH3-only proteins in the immune system." Nat Rev Immunol **5**(3): 189-200.
- Strasser, A., P. J. Jost, et al. (2009). "The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System." **30**(2): 180.
- Suzuki, A., G. Kusakai, et al. (2003). "ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation." Oncogene **22**(40): 6177-82.
- Tanida, I., N. Mizushima, et al. (1999). "Apg7p/Cvt2p: A Novel Protein-activating Enzyme Essential for Autophagy." Mol. Biol. Cell **10**(5): 1367-1379.
- Thierry, F. and C. Demeret (2008). "Direct activation of caspase 8 by the proapoptotic E2 protein of HPV18 independent of adaptor proteins." Cell Death Differ **15**(9): 1356.
- Thornberry, N. A. (1997). "The caspase family of cysteine proteases." Br Med Bull **53**(3): 478-490.
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, et al. (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." Nature **356**(6372): 768-74.
- Tong, X., F. Zhao, et al. (2009). "The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(51): 21660-21665.
- Tu, H. C., D. Ren, et al. (2009). "The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(4): 1093-8.

- Ullman, E., Y. Fan, et al. (2007). "Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress." Cell Death Differ **15**(2): 422.
- Vander Heiden, M. G., D. R. Plas, et al. (2001). "Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism." Mol. Cell. Biol. **21**(17): 5899-5912.
- Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, et al. (1998). "Targeted Disruption of the Mouse Caspase 8 Gene Ablates Cell Death Induction by the TNF Receptors, Fas/Apo1, and DR3 and Is Lethal Prenatally." Immunity **9**(2): 267.
- Vercammen, D., R. Beyaert, et al. (1998). "Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor." The Journal of Experimental Medicine **187**(9): 1477-1485.
- Vince, J. E., W. W. Wong, et al. (2007). "IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis." Cell **131**(4): 682-93.
- Wachter, T., M. Sprick, et al. (2004). "cFLIPL Inhibits Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-mediated NF- $\kappa$ B Activation at the Death-inducing Signaling Complex in Human Keratinocytes." Journal of Biological Chemistry **279**(51): 52824-52834.
- Wang, G. L. and G. L. Semenza (1993). "Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia." J Biol Chem **268**(29): 21513-8.
- Wang, L., F. Du, et al. (2008). "TNF- $\alpha$  Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways." Cell **133**(4): 693.
- Wang, X. and C. G. Proud (2009). "Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator." Trends in Cell Biology **19**(6): 260.
- Wang, Y., R. Singh, et al. (2007). "Loss of macroautophagy promotes or prevents fibroblast apoptosis depending on the death stimulus." J. Biol. Chem.: M706666200.
- Wang, Y., J. S. Suominen, et al. (2005). "The regulated expression of c-IAP1 and c-IAP2 during the rat seminiferous epithelial cycle plays a role in the protection of germ cells from Fas-mediated apoptosis." Molecular and Cellular Endocrinology **245**(1-2): 111.
- Warburg, O., F. Wind, et al. (1927). "The Metabolism Of Tumors In The Body." J Gen Physiol **8**(6): 519-530.
- Wehrli, P., I. Viard, et al. (2000). "Death Receptors in Cutaneous Biology and Disease." **115**(2): 141.

- Wei, M. C., W.-X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death." Science **292**(5517): 727-730.
- Werner, A. B., E. de Vries, et al. (2002). "TRAIL Receptor and CD95 Signal to Mitochondria via FADD, Caspase-8/10, Bid, and Bax but Differentially Regulate Events Downstream from Truncated Bid." J. Biol. Chem. **277**(43): 40760-40767.
- Wong, W. W. L., I. E. Gentle, et al. (2009). "RIPK1 is not essential for TNFR1-induced activation of NF- $\kappa$ B." Cell Death Differ **17**(3): 482.
- Wood, T. E., S. Dalili, et al. (2008). "A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death." Mol Cancer Ther **7**(11): 3546-3555.
- Youle, R. J. and M. Karbowski (2005). "Mitochondrial fission in apoptosis." Nature Rev. Mol. Cell Biol. **6**: 657.
- Yousefi, S., R. Perozzo, et al. (2006). "Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis." Nat Cell Biol **8**(10): 1124.
- Yuneva, M., N. Zamboni, et al. (2007). "Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells." J Cell Biol **178**(1): 93-105.
- Zhao, Y., J. L. Coloff, et al. (2008). "Glucose metabolism attenuates p53 and puma-dependent cell death upon growth factor deprivation." J. Biol. Chem.: M803580200.
- Zhong, D., L. Xiong, et al. (2009). "The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple prosurvival pathways through IGF1R." J. Biol. Chem.: M109.005280.
- Zhou, Q., S. Snipas, et al. (1997). "Target Protease Specificity of the Viral Serpin CrmA." Journal of Biological Chemistry **272**(12): 7797-7800.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." Pharmacol Ther **92**(1): 57-70.

# Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells

A Caro-Maldonado<sup>1</sup>, SWG Tait<sup>2</sup>, S Ramírez-Peinado<sup>1</sup>, J-E Ricci<sup>3</sup>, I Fabregat<sup>1</sup>, DR Green<sup>2,4</sup> and C Muñoz-Pinedo<sup>\*,1,4</sup>

Apoptosis induced by most stimuli proceeds through the mitochondrial pathway. One such stimulus is nutrient deprivation. In this study we studied death induced by glucose deprivation in cells deficient in Bax and Bak. These cells cannot undergo mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) during apoptosis, but they undergo necrosis when treated with MOMP-dependent apoptotic stimuli. We find in these cells that glucose deprivation, rather than inducing necrosis, triggered apoptosis. Cell death required caspase activation as inhibition of caspases with peptidic inhibitors prevented death. Glucose deprivation-induced death displayed many hallmarks of apoptosis, such as caspase cleavage and activity, phosphatidyl-serine exposure and cleavage of caspase substrates. Neither overexpression of Bcl-xL nor knockdown of caspase-9 prevented death. However, transient or stable knockdown of caspase-8 or overexpression of CrmA inhibited apoptosis. Cell death was not inhibited by preventing death receptor–ligand interactions, by overexpression of c-FLIP or by knockdown of RIPK1. Glucose deprivation induced apoptosis in the human tumor cell line HeLa, which was prevented by knockdown of caspase-8. Thus, we have found that glucose deprivation can induce a death receptor-independent, caspase-8-driven apoptosis, which is engaged to kill cells that cannot undergo MOMP.

*Cell Death and Differentiation* advance online publication, 5 March 2010; doi:10.1038/cdd.2010.21

Apoptosis is a form of cell death required for homeostasis of human tissues. Apoptotic cells display several morphological and biochemical changes, which are a consequence of the activity of caspase proteases.<sup>1</sup> Caspases are normally inactive in the cytosol, but they become activated by dimerization and/or proteolysis by other caspases. ‘Executioner’ caspases such as caspase-3 are activated through cleavage by ‘initiator’ or ‘apical’ caspases, of which the best characterized are caspases-8 and -9. Caspase-8 is activated by its recruitment to the multimeric DISC (death-inducing signaling complex) in response to extracellular ligands such as Fas/CD95-ligand, TRAIL or TNF;<sup>2</sup> this is the death receptor, or extrinsic pathway of apoptosis. Caspase-9 is activated by dimerization after recruitment to the apoptosome, a complex of APAF1 proteins formed in response to the release of the mitochondrial protein cytochrome *c* into the cytosol.<sup>3</sup> This caspase activation cascade is called the mitochondrial or intrinsic pathway of apoptosis.

The mitochondrial pathway of apoptosis is regulated by proteins of the Bcl-2 family, which regulate the integrity of the mitochondrial outer membrane, thereby controlling

cytochrome *c* and subsequent caspase activation.<sup>4</sup> Impairment of the mitochondrial pathway is common in human tumors. Cancer cells frequently overexpress the antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1, or they lack functional proapoptotic Bcl-2 family members, including Bax, Bak or both.<sup>5</sup> The overexpression of antiapoptotic Bcl-2 proteins not only blocks the morphological features of apoptosis, but also enables clonogenic cell survival.<sup>6</sup> For these reasons, cells from Bax, Bak double-knockout (DKO) mice are a suitable model to identify non-mitochondrial pathways of cell death, which may be targeted for therapy.

*Bax/Bak*-deficient murine embryonic fibroblasts (MEFs) are resistant to apoptosis induced by stimuli that normally kill cells through the mitochondrial pathway.<sup>7,8</sup> However, some drugs such as staurosporine, etoposide, thapsigargin and tunicamycin, which kill wild-type (WT) cells in a mitochondria-dependent manner, can kill Bax-, Bak-deficient cells by a slower, non-apoptotic mechanism.<sup>9,10</sup> We analyzed cell death induced by glucose deprivation in these cells, as this stimulus has been shown to kill some cell lines through necrosis.<sup>11,12</sup> We report here that glucose deprivation can induce death of

<sup>1</sup>Laboratori d'Oncologia Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Gran Via de L'Hospitalet 199, L'Hospitalet, Barcelona 08907, Spain;

<sup>2</sup>Department of Immunology, St. Jude Children's Research Hospital, IRC-E7050, MS 351, 262 Danny Thomas Place, Memphis, TN 38105, USA and <sup>3</sup>Inserm U895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), équipe 3 AVENIR, Nice, France

\*Corresponding author: C Muñoz-Pinedo, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Duran i Reynals 3<sup>a</sup> planta, Gran Via s/n km 2,7, L'Hospitalet, Barcelona 08907, Spain. Tel: +34 93 260 7339; Fax: +34 92 260 7426; E-mail: cmunoz@idibell.cat

<sup>4</sup>These authors share senior authorship.

**Keywords:** apoptosis; caspase-8; glucose metabolism; Bax–Bak independent

**Abbreviations:** CHX, cycloheximide; GFP, green fluorescent protein; DISC, death-inducing signaling complex; DKO, SV40-transformed *Bax*-, *Bak*-deficient MEFs; MEF, murine embryonic fibroblast; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; PI, propidium iodide; Q-VD, quinoline-Val-Asp-CH2-difluorophenoxy (Q-VD-OPH); Z-VAD, Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH2F (Z-VAD-FMK)

Received 06.7.09; revised 29.1.10; accepted 29.1.10; Edited by RA Knight

Bax-, Bak-deficient MEFs. Surprisingly, in these cells glucose deprivation induces apoptosis that proceeds through an unconventional pathway requiring caspase-8. Our results uncover a pathway for activation of caspase-8 different than death receptor ligation, and provide new insight into the mechanism of cell death induced by nutrient deprivation.

## Results

**Glucose deprivation kills Bax-, Bak-deficient cells by apoptosis.** Glucose deprivation has been shown to kill cells either by necrosis<sup>11,12</sup> or through the mitochondrial or 'intrinsic' pathway of apoptosis.<sup>13–17</sup> We reasoned that cells deficient in Bax and Bak, which cannot die through the intrinsic pathway,<sup>8</sup> would undergo a rapid necrotic death when deprived of glucose, as glucose deprivation kills most cells in 24–48 h. Alternatively, it was possible that these cells could remain atrophic but alive for weeks, as it was described that Bax-, Bak-deficient hematopoietic cells, when deprived of growth factors, downregulate glucose transporter 1 but do not die for several weeks.<sup>18</sup> We tested whether glucose deprivation provoked cytostatic or cytotoxic effects in SV40-transformed, *Bax*, *Bak* DKO MEFs.<sup>8</sup> As assessed by morphology and propidium iodide (PI) incorporation, about 10% of cells appeared dead by 24 h, with approximately 75% dead cells within 72 h (Figure 1a and b). Their WT counterparts died more rapidly, and were all dead by 48 h (Figure 1b), suggesting that these cells die through the mitochondrial pathway.

Bax, Bak DKO MEFs can die by a non-apoptotic form of cell death in response to staurosporine, etoposide,<sup>9,19</sup> alkylating DNA agents<sup>20</sup> and ER stressors.<sup>10</sup> We determined whether the form of cell death induced by glucose deprivation was apoptosis or necrosis. The morphology of dead DKO cells was different from the classical necrotic death induced by thapsigargin in these cells,<sup>10</sup> and was more similar to the morphology of cells dying by apoptosis induced by the combination of TNF and cycloheximide (CHX) (Figure 1a): cells rounded up and detached from the culture plate, and they showed a reduction of volume (shrinkage). Moreover, when we incubated glucose-deprived cells in the presence of the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPH (Q-VD), we observed a reduction in the number of dead cells as measured by morphology and PI incorporation, thus indicating that death is caspase-dependent (Figure 1a and b). In addition, we observed that cells displayed sub-G1 DNA fragmentation, a marker of apoptosis, with similar kinetics to that of plasma membrane disruption (PI uptake) (Figure 1b). Z-VAD-FMK (Z-VAD), an alternative pan-caspase inhibitor, inhibited both subG1 DNA fragmentation and PI incorporation. Other markers of apoptosis such as caspase-3 and PARP cleavage were observed in Bax-, Bak-deficient cells, albeit with slower kinetics than in WT cells (Figure 1c). We stained cells with annexin V, which detects phosphatidyl-serine exposure on the surface of apoptotic cells. Glucose-deprived cells displayed annexin V binding before they became PI-positive, another indication of apoptosis (Figure 1d). Moreover, phosphatidyl-serine exposure was inhibited by Q-VD.

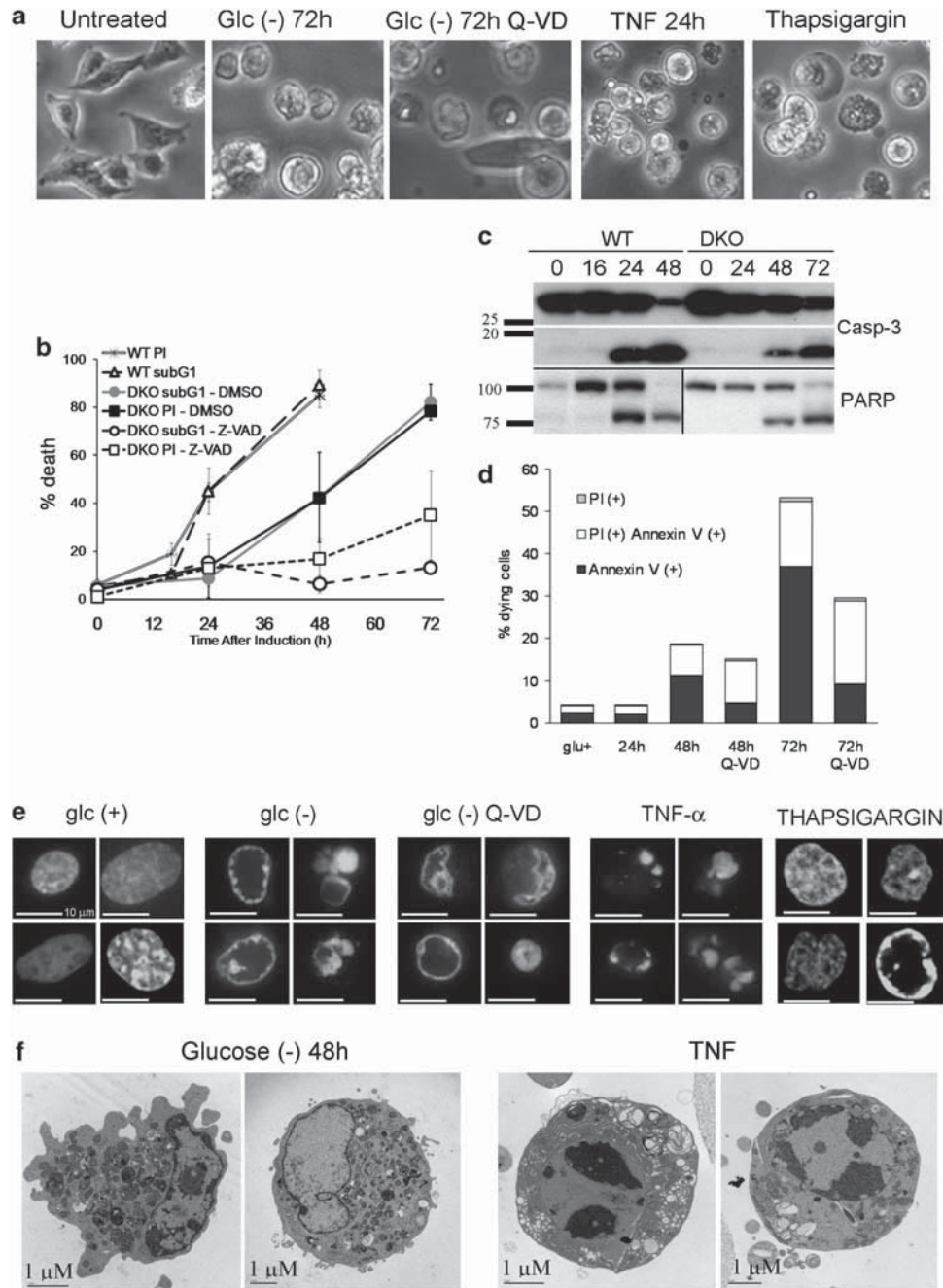
We observed chromatin condensation after glucose deprivation (Figure 1e and f). Nuclei had a different appearance to the classical apoptotic morphology observed after treatment with TNF, or to the relaxed appearance of necrotic cells treated with thapsigargin. After glucose deprivation, DNA was condensed around the periphery of the nuclei. However, this condensation may not be directly related to caspase activation as it occurred in glucose-deprived cells treated with Q-VD. Thus, apoptosis induced by glucose deprivation in Bax-, Bak-deficient cells displayed all of the hallmarks of apoptosis analyzed, with the exception of the characteristic chromatin condensation.

**Glucose deprivation-induced death is caspase-dependent and does not proceed through the mitochondrial pathway.** We had observed that Q-VD and Z-VAD inhibited features of cell death induced by glucose deprivation. To confirm that caspases were active in glucose-deprived DKO cells, we analyzed the cleavage of a synthetic DEVD peptide in cell extracts. Glucose deprivation induced DEVD-ase activity, which was inhibited by Q-VD (Figure 2a). In addition, we analyzed cleavage of the effector caspase-3, which is a marker of its activation. We observed cleavage of caspase-3 in DKO cells after glucose withdrawal that was inhibited by ZVAD (Figure 2b). Moreover, we verified that caspases were active by analyzing the cleavage of substrates of effector caspases: co-chaperone p23 and PARP. These proteins were cleaved in a Z-VAD-inhibitable manner (Figure 2b).

To exclude a possible effect of Z-VAD-fmk or Q-VD-OPH on proteases other than caspases, we studied the inhibition of death by other peptidic inhibitors. We observed that a panel of caspase inhibitors prevented both subG1 DNA fragmentation (Figure 2c) and PI incorporation (Figure 2d). These inhibitors were more efficient in inhibiting DNA cleavage than PI uptake, suggesting that the intracellular concentrations of these compounds can inhibit some apoptotic features better than others, or that inhibition of caspases switches the form of death to necrosis in a small percent of the cells. Consistent with data reported in Jurkat cells,<sup>21</sup> VDVA-fmk and LEHD-fmk were less efficient than IETD-fmk, Z-VAD-fmk and Q-VD-OPH in preventing death.

Bax and Bak are required for mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) during apoptosis, and cells lacking these proteins cannot release cytochrome *c* or undergo apoptosis in response to many stimuli, including microinjection of tBid.<sup>8</sup> However, it was possible that glucose deprivation activates the mitochondrial pathway through an unidentified, alternative mechanism. Therefore, we treated cells with shRNA for caspase-9 (Figure 3a). This treatment did not affect any of the parameters of cell death tested (Figure 3b). Furthermore, we generated DKO cells stably overexpressing Bcl-xL. Bcl-xL inhibits MOMP during apoptosis.<sup>22</sup> Bulk-transduced cells (pool) and four clones were analyzed. As shown in Figure 3c, Bax, Bak DKO MEFs overexpressing Bcl-xL (Figure 3d) were not protected from death when compared with the parental line.

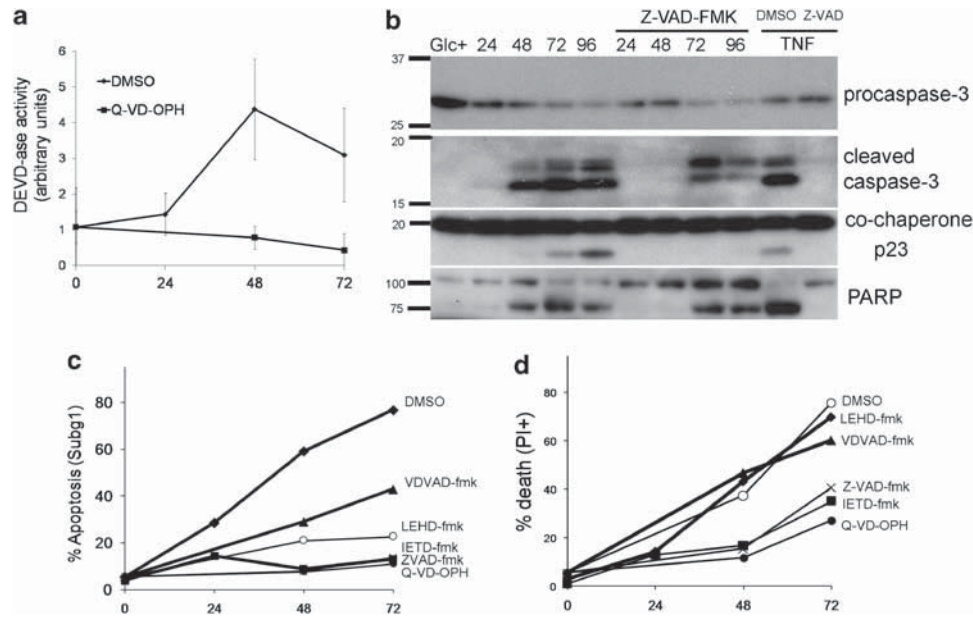
Intriguingly, although caspase inhibitors effectively blocked glucose deprivation-induced cell death in Bax, Bak DKO MEF,



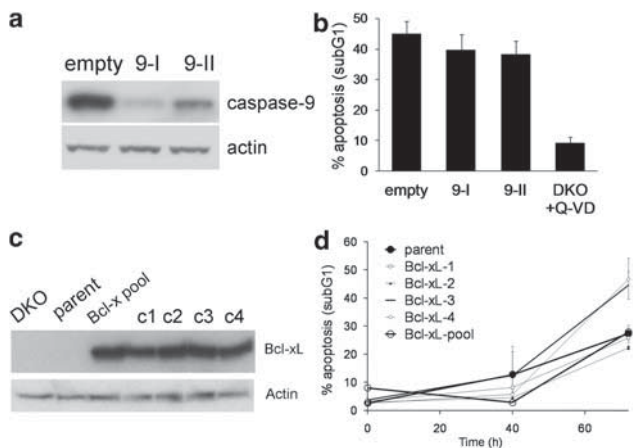
**Figure 1** Glucose removal triggers cell death in Bax, Bak DKO cells with mixed features of apoptosis and necrosis. (a) Bax, Bak DKO MEF were subjected to glucose deprivation in the absence or presence of 20  $\mu$ M Q-VD for 72 h, or treated with thapsigargin 10  $\mu$ M or TNF for 24 h. (b) Glucose deprivation induces DNA degradation. WT and Bax, Bak DKO MEFs were treated as described in Materials and Methods section and collected for subG1 analysis or propidium iodide (PI) incorporation at times shown. Data show average and S.D. of at least three (PI) or four (subG1) experiments. (c) WT and DKO cells display cleavage of caspase-3 and PARP upon glucose deprivation. Cells were subjected to western blot (WB) analysis at times shown (h). Note the different kinetics among cell lines. (d) Glucose deprivation induces phosphatidyl-serine (PS) externalization measured by Annexin V incorporation in DKO cells. Q-VD inhibits both events. A representative experiment is shown. (e, f) DKO cells undergo atypical nuclear condensation after glucose deprivation. Bax, Bak DKO MEFs were transfected transiently with GFP-Histone 2A plasmid in chamber slides. Cells were treated for 72 h without glucose (in the presence or absence of Q-VD) or with TNF or thapsigargin. Nuclei were visualized by confocal microscopy (e) or electron microscopy (f). Representative images are shown. In (f), only dead (floating) cells were collected after being deprived of glucose for 48 h without Q-VD. Note the absence of massive cytosolic vacuolation which characterizes necrotic/autophagic cell death in Bax-, Bak-deficient MEFs<sup>9,10,19</sup>

we did not observe this effect in WT MEF transduced with Bcl-xL (data not shown). It is possible that Bcl-xL promotes necrosis in MEF in response to glucose deprivation, similar to what has been observed in response to etoposide.<sup>9</sup>

Alternatively, it is possible that the adaptation to the Bax, Bak double-deficient condition primes cells for a novel caspase activation mechanism. We therefore sought to identify the caspase involved in initiating cell death in this setting.



**Figure 2** Glucose deprivation induces caspase activation in Bax, Bak DKO cells. (a) Glucose deprivation induces caspase activity. Bax, Bak DKO MEFs were cultured for the indicated times without glucose, in the presence or absence of Q-VD. Cell lysates were incubated with AC-DEVD-amc as described in Materials and Methods section. Results show average and S.E.M. of three experiments. (b) Glucose deprivation induces cleavage of procaspase-3 and the caspase substrates co-chaperone p23 and PARP, which are inhibited by Z-VAD. Cell lysates were prepared as in (a) and proteins were resolved by SDS-PAGE and immunoblot. (c, d) Caspase inhibitors block apoptotic features in glucose-deprived Bax, Bak DKO cells. Bax, Bak DKO MEFs were grown in glucose-free medium in the presence of caspase inhibitors or DMSO as vehicle control. Inhibitors and DMSO were replenished every 24 h. Cells were collected and subjected to subG1 (c) or PI uptake (d) analysis. Data represent average of two experiments



**Figure 3** Glucose deprivation-induced apoptosis in Bax, Bak DKO MEF is not dependent on the classical mitochondrial pathway of apoptosis. (a) DKO cells were infected with retroviruses encoding two different shRNA against caspase-9, or the empty vector. Expression of caspase-9 is shown. (b) The same pools were collected after 72 h of glucose withdrawal and analyzed for subG1 DNA content. DKO cells treated with Q-VD-OPH are shown as a control for caspase inhibition. Results show average and S.E.M. of five experiments. (c) DKO cells (shown as 'parent') were stably transduced with Bcl-xL. Several clones were generated by serial dilution and blotted for expression of Bcl-xL or actin. (d) The clones, bulk population and cells from the parent cell line described in (c) were deprived of glucose and collected at 40 and 72 h for analysis of subG1 DNA content. Results show average and S.E.M. of three experiments

**Caspase-8 is engaged in death induced by glucose deprivation in Bax, Bak DKO MEFs and HeLa cells.** In the absence of a mitochondrial pathway of apoptosis, a likely candidate for initiating the caspase cascade is caspase-8,

required for death receptor-induced<sup>23</sup> and other forms of apoptosis.<sup>11,24,25</sup> We therefore asked whether caspase-8 was the apical caspase in glucose starvation-induced apoptosis in these cells. We generated a stable cell line expressing short hairpin RNA (shRNA) targeting caspase-8, and selected individual clones expressing low levels of caspase-8 (Figure 4a). As expected, these clones and the parental pool displayed decreased sensitivity to TNF when compared with cells transfected with the empty vector (Figure 4b). When incubated in the absence of glucose, we observed that these clones and the parental pool were less sensitive than their mock-transfected counterparts to glucose deprivation (Figure 4c). To exclude the possibility of an off-target effect of this construct, or a compensation effect of the stable downregulation of caspase-8, we transiently transfected two different siRNA oligonucleotides against caspase-8. We were able to achieve a moderate reduction in caspase-8 levels (Figure 4d). This reduction conferred a mild but reproducible protection from death ligands (data not shown) and glucose deprivation (Figure 4e). Knockdown of caspase-8 reduced glucose deprivation-induced cleavage of caspase-3 (Figure 4f).

We had observed that the peptidic caspase inhibitor IETD-fmk inhibited glucose deprivation-induced death (Figure 2c and d), suggesting that the enzymatic activity of caspase-8 is required for death. However, although IETD-fmk is widely used to block caspase-8 activity, it can also inhibit effector caspases.<sup>21</sup> In order to test whether the enzymatic activity of mature caspase-8 is required for apoptosis in this system, we transfected DKO cells with the viral caspase inhibitor CrmA, which preferentially inhibits caspase-8, although it can also inhibit the inflammatory caspase-1.<sup>2,26</sup> Cells transfected with



CrmA were protected from death receptor-induced apoptosis (Figure 4g). CrmA effectively inhibited death induced by glucose deprivation in Bax, Bak DKO MEF (Figure 4h).

To test whether caspase-8 dependency was exclusive of Bax, Bak DKO MEF, we used siRNA to knockdown caspase-8 in established tumor lines. Although we observed no effect on glucose deprivation-induced death in the MCF7 breast cancer line (not shown), we observed an effect in HeLa cells. Knockdown of caspase-8 in HeLa cells reduced caspase-8 levels (Figure 5a), and prevented death induced by TNF (Figure 5b). Strikingly, this decrease in caspase-8 reduced glucose deprivation-induced cell death to the same extent than with incubation with Q-VD (Figure 5b).

**The extrinsic pathway is not involved in glucose starvation-induced apoptosis in Bax, Bak DKO cells.** Caspase-8 is activated in response to death receptor ligation. It has been shown that some drugs can induce caspase-8-mediated apoptosis through the induction of death ligands such as FasL, TNF or TRAIL.<sup>27–29</sup> Thus, one possibility is that glucose deprivation is activating the extrinsic pathway by inducing the synthesis and/or secretion of death ligands, which might kill the cells in an autocrine manner. To explore this possibility, we analyzed by RT-PCR the mRNA levels of death ligands and used blocking antibodies against death ligands and receptors. We could not detect the expression of Fas ligand mRNA in these cells (not shown). Furthermore, we starved cells from glucose in the presence of neutralizing antibodies for Fas-ligand or Fas-Fc (Figure 6a), which did not prevent death. TRAIL expression did not change after glucose withdrawal (Supplementary Figure S1A). Moreover, we could not detect toxicity of TRAIL in these cells, even in the presence of CHX or upon glucose deprivation, which has been shown to sensitize human tumor cells to TRAIL<sup>30</sup> (Supplementary Figure S1B). In addition, we incubated cells in the presence of anti-TRAIL or TRAIL-R-FC (Supplementary Figure S1C and D), which did not have any effect on cell death induced by glucose deprivation.

A slight increase in TNF mRNA levels was detected (Figure 6b). Although TNF did not kill these cells unless they were co-incubated with CHX (Figure 6c), the possibility remained that glucose deprivation sensitizes cells to TNF.<sup>30</sup> To explore this possibility, we preincubated cells without glucose and then added TNF. We observed that glucose deprivation did not sensitize these cells to TNF, as the combination of glucose deprivation and TNF caused the same amount of death than glucose deprivation alone. The combination of glucose deprivation plus CHX and TNF caused additive effects on cell death numbers (Figure 6c). In addition, we incubated glucose-deprived cells in the presence of neutralizing antibodies against TNF and TNF-R1, which did not prevent death (Figure 6d).

In another approach to examining the possible role of the death receptor pathway in glucose deprivation-induced apoptosis in Bax, Bak DKO cells, we examined the effects of c-FLIP. Overexpression of c-FLIP inhibits caspase-8 activation at the DISC.<sup>31</sup> We generated Bax, Bak DKO MEF that stably overexpress c-FLIP<sub>L</sub>, and as expected, these cells were protected from TNF or anti-Fas-induced apoptosis (Figure 7a). However, they were not protected from glucose

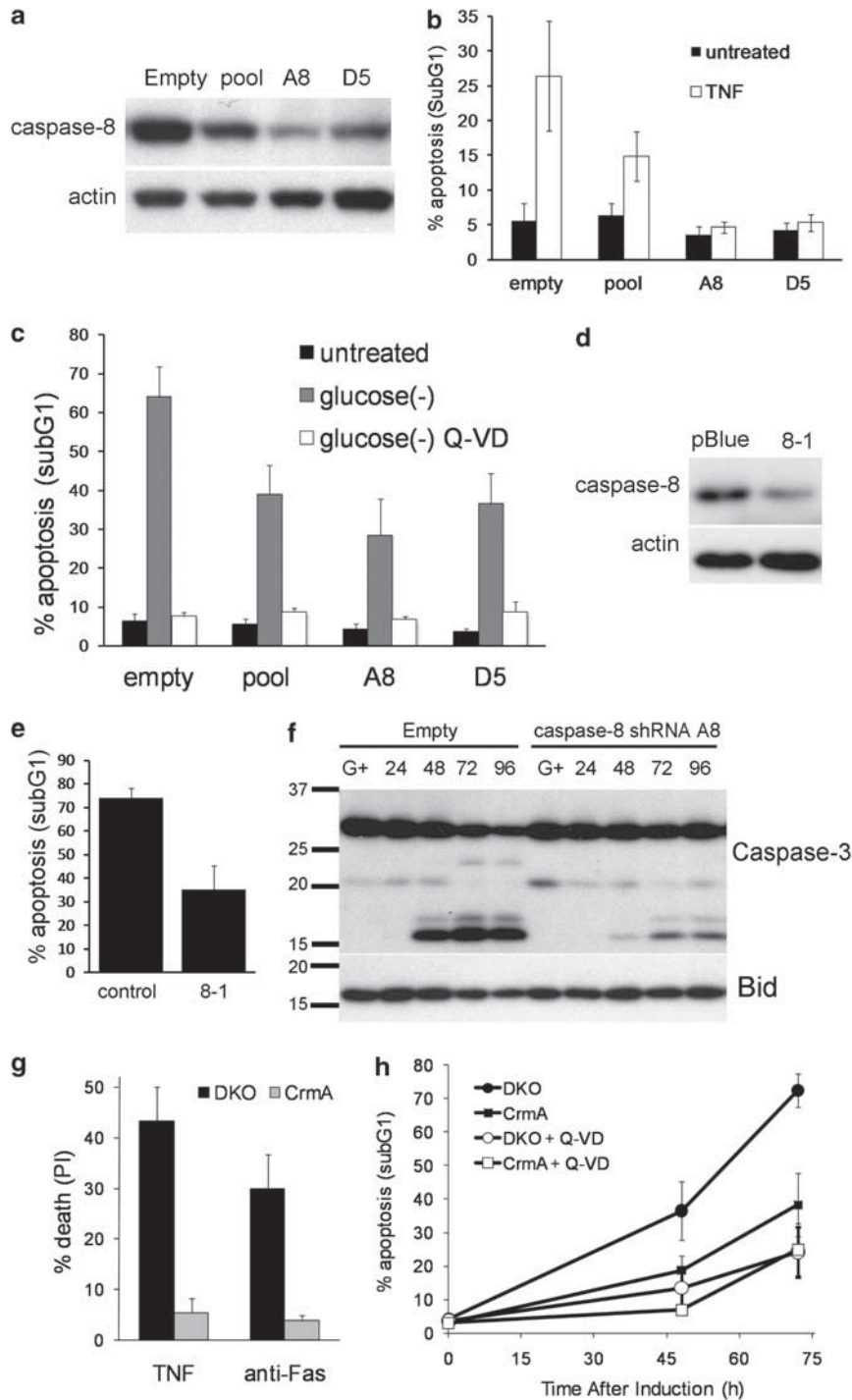
deprivation-induced apoptosis, suggesting that caspase-8 is activated independently of a conventional death receptor-induced DISC (Figure 7b).

Recently, a novel form of caspase-8- and FADD-mediated apoptosis has been described.<sup>32</sup> When TNF is combined with Smac mimetics, TNF induces the formation of a caspase-8 activation complex formed by RIPK1, FADD and caspase-8, which leads to apoptosis. Cell death mediated by this complex is poorly inhibited by FLIP. In order to test a role for RIPK1 in our system, we incubated DKO cells in the presence of Necrostatin-1 (Nec-1). Nec-1 is an allosteric inhibitor of RIPK1 kinase activity, and it inhibits RIPK1-mediated necroptosis (death receptor-mediated necrosis). As RIPK1 kinase activity is required for apoptosis induced by combination of TNF and Smac mimetics, we deprived cells of glucose in the presence of Nec-1. Incubation with Nec-1 did not prevent glucose deprivation-induced cell death (Figure 7c). To exclude a function of RIPK1, which could not be inhibited by Nec-1, we used siRNA to knockdown RIPK1 (Figure 7d). The resultant decrease in RIPK1 was sufficient to inhibit death induced by TNF in the presence of the Smac mimetic Compound A (Figure 7f), but did not influence glucose deprivation-induced cell death (Figure 7e and f). Thus, neither the classical DISC nor the second, RIPK1-dependent caspase-8 activating complex appear to be involved in glucose deprivation-induced apoptosis.

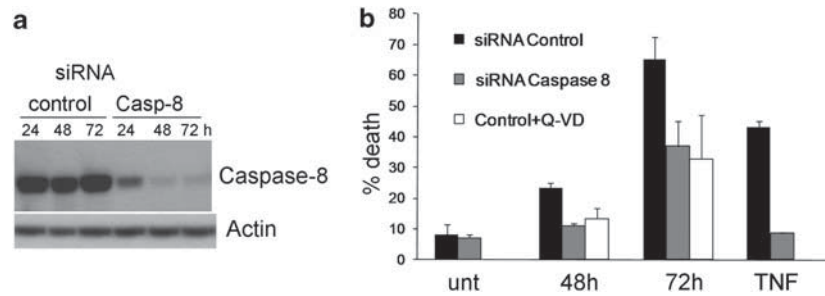
## Discussion

Bax and Bak are essential mediators of apoptosis induced by most stimuli.<sup>8</sup> Because the mitochondrial pathway is frequently inactivated in tumor cells, it may be clinically relevant to find means to induce necrosis or mitochondria-independent apoptosis. Glucose deprivation has been shown to induce necrosis in some cancer cell lines. We show here that SV-40-transformed MEFs with an impairment of the mitochondrial pathway can die by apoptosis upon glucose deprivation, and that this form of apoptosis is mediated by caspase-8.

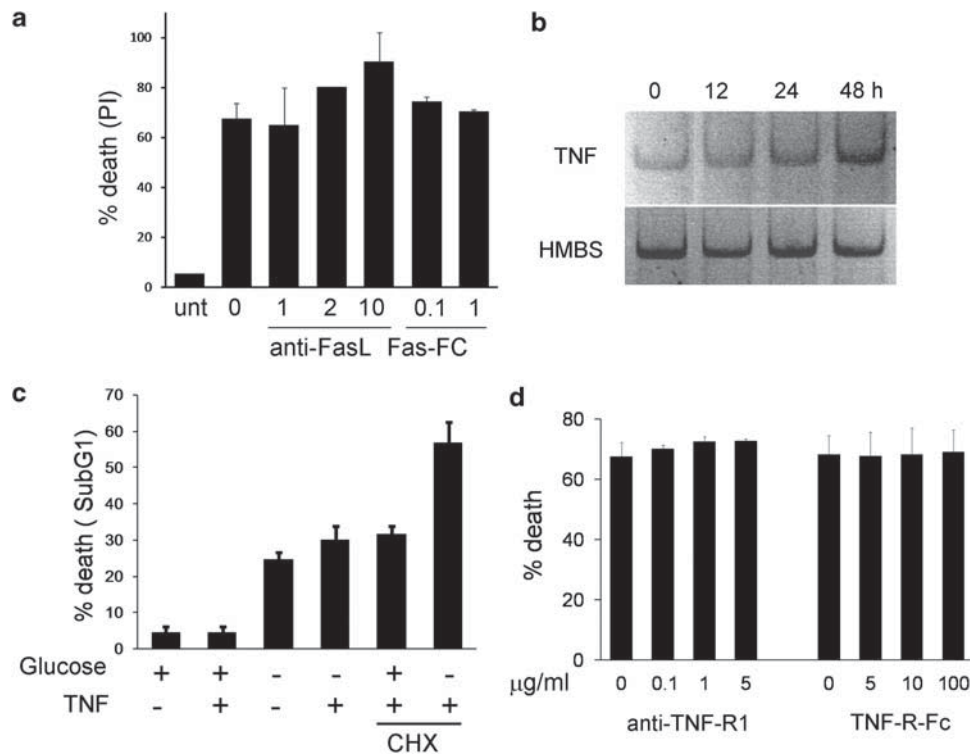
Inhibition of cell metabolism by nutrient deprivation has been extensively studied as a means to preferentially kill tumor cells, because these cells display numerous alterations in metabolic pathways, including abnormal glucose and glutamine uptake.<sup>33</sup> Indeed, a non-metabolizable glucose analog, 2-deoxyglucose, is currently in clinical trials as an antitumor agent. Moreover, growth factors upregulate glucose uptake and metabolism to induce pro-survival and antiapoptotic effects.<sup>13</sup> Glucose metabolism interferes with apoptosis at different steps, regulating both the extrinsic and the intrinsic pathways in tumor cells.<sup>17,30,34</sup> Therefore, deciphering the death pathways engaged by glucose deprivation will be helpful for rational design of clinical trials with antimetabolites and molecules which inhibit growth factor signaling. Our results suggest that tumors deficient in caspase-8 may be resistant to glucose deprivation or non-metabolizable glucose analogs, opening the possibility that this protease may be a prognostic marker of success of anti-glycolytic treatments. Caspase-8 expression is frequently impaired in tumors, especially those of the brain and childhood tumors.<sup>35,36</sup> An intriguing possibility raised by our findings is that perhaps



**Figure 4** Caspase-8 is required for death induced by glucose deprivation in Bax, Bak DKO MEF. (a) DKO cells were infected with retroviruses encoding shRNA against caspase-8 (shown as 'pool'), or the empty vector. Expression of caspase-8 by immunoblot is shown for the pool population, empty vector-transfected cells and two clones that were selected for low caspase-8 expression (A8 and D5). (b) Cells described in (a) were treated with TNF for 24 h and collected for subG1 analysis. Results show average and S.E.M. of four experiments. (c) Same cells as in (a) were cultured without glucose for 72 h. Apoptosis was measured by subG1 analysis. Average and S.E.M. of five experiments are shown. (d) Downregulation of caspase-8 protein with small interfering RNA. Cells were transiently transfected with siRNA against caspase-8 (8-1) or a control oligonucleotide (pBlue). Protein was collected 24 h after transfection. (e) Cells were transfected with a control oligonucleotide or siRNA against caspase-8. Forty-eight hours after transfection, they were deprived of glucose for 72 h and collected for subG1 analysis. The average of three experiments is shown. (f) Clone A8 described in (a) and cells transfected with the empty vector were starved of glucose and collected for western blot of Bid or caspase-3 at times shown. A mixture of antibodies against the procaspase and the cleaved forms was used. (g) DKO MEFs or cells transfected with a CrmA-encoding vector were treated with TNF or anti-Fas antibody. Cell death was measured by PI exclusion. Results show average and range of two experiments. (h) DKO or CrmA-transfected MEFs were starved of glucose in the presence of DMSO or Q-VD, and collected at 24 or 48 h for subG1 analysis. Results show average and S.E.M. of five experiments



**Figure 5** Downregulation of caspase-8 prevents apoptosis in HeLa cells. (a) Caspase-8 knockdown in HeLa cells using siRNA. Seventy-two hours after transfection, cells were subjected to glucose deprivation in the presence or absence of Q-VD as indicated, and collected at times shown for FACS analysis (b). As a positive control, cells were treated with TNF. Results show average and range of three experiments



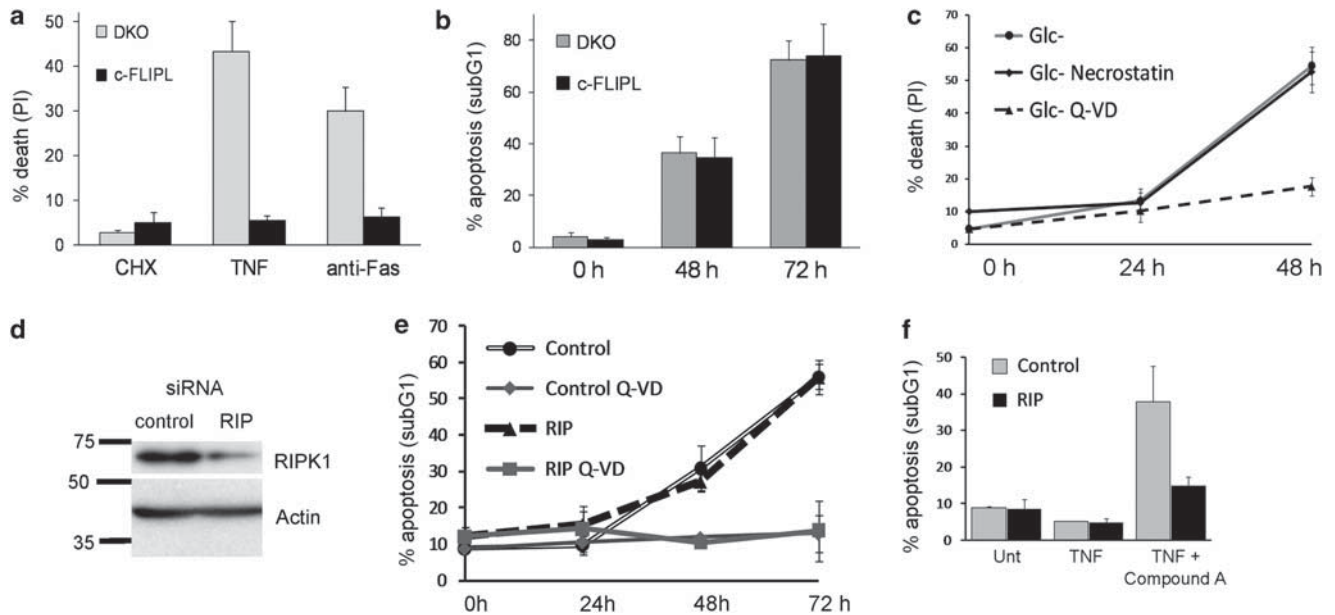
**Figure 6** Glucose deprivation-induced death in Bax, Bak DKO cells is not dependent on death receptor–ligand interactions. (a) Blocking Fas/Fas ligand interaction does not inhibit glucose deprivation-induced cell death. Cells were subjected to glucose deprivation for 72 h in the presence of anti-FasL or Fas-FC at concentrations shown (in  $\mu\text{g/ml}$ ). (b) TNF mRNA is slightly induced upon glucose removal. DKO cells were deprived of glucose and collected at indicated times. RT-PCR of TNF and a loading control (HMBS) are shown. (c) TNF was added 24 h after treatment with glucose deprivation. CHX ( $0.2 \mu\text{M}$ ) was added 30 min before TNF. Cells were collected after 48 h of glucose withdrawal for subG1 analysis. Data represents average and S.E.M. of three experiments. (d) Blockage of TNF/TNF-R interactions does not prevent death by glucose starvation. Cells were incubated without glucose for 24 h and then anti-TNF-R1 was added at the indicated concentrations (left panel), expressed in  $\mu\text{g/ml}$ . Antibody was readed 24 h later. Cells were collected 72 h after glucose removal to measure PI exclusion. Right panel: cells were incubated for 72 h without glucose in the presence of TNF-R-Fc and they were collected for subG1 analysis. Bars show average and range of two experiments. Positive controls for blocking reagents are shown in Supplementary Figure S1

tumor cells with diminished caspase-8 expression are selected for their ability to resist conditions of low blood flow and glucose supply, which are commonly found in the tumor microenvironment.

In this work, we show that glucose deprivation induces an atypical form of caspase-8 activation in Bax-, Bak-deficient MEFs. Caspase-8 is usually activated in a DISC complex formed upon ligation of death receptors. It is worth noting that caspase-8-dependent death has been described in response to stimuli other than death receptors,<sup>11,24,25</sup> which suggests

that caspase-8 can be activated in ‘alternative’ platforms. It is unlikely that the classical death ligand-induced DISC is formed upon glucose deprivation, as blocking interactions between death receptors and their ligands did not block death. Moreover, FLIP overexpression, which inhibits death receptor-induced apoptosis, did not inhibit apoptosis induced by glucose removal.

Caspase-8 has been described to be activated in an FADD-dependent manner with some stimuli, in the absence of death receptor–ligand interactions.<sup>37,38</sup> We have not been able to



**Figure 7** cFLIP<sub>L</sub> overexpression or RIPK1 downregulation do not protect from death induced by glucose deprivation in Bax, Bak DKO MEF. (a) DKO cells stably overexpressing cFLIP<sub>L</sub> were treated with anti-Fas or TNF- $\alpha$  for 24 h and collected for analysis of PI incorporation. (b) Same cells were deprived of glucose for indicated times and collected for subG1 DNA analysis. Graphs show average and S.E.M. of three (a) or four (b) experiments. (c) Cells were deprived of glucose for 48 h in the presence of necrostatin-1 50  $\mu$ M or Q-VD. PI uptake was measured. (d–f) Cells were transfected with control siRNA or siRNA against RIPK1 (labeled as ‘RIP’) for 48 h and subjected to: western blot (d), glucose deprivation for indicated times (h) (e) or treatment with TNF 10 ng/ml and the IAP antagonist Compound A (500 nM) for 24 h (f)

obtain conclusive results regarding the involvement of FADD as the adapter protein for caspase-8 activation after glucose deprivation. We cannot exclude that, upon glucose removal, endogenous FADD may be aggregated intracellularly, interacting with caspase-8 and promoting its activation. However, as FLIP overexpression did not prevent apoptosis in our system, we studied the possible role of RIPK1. This protein contains a death domain and forms a complex with FADD and caspase-8 upon treatment with TNF and Smac mimetics.<sup>32</sup> Although knockdown of RIPK1 prevented the latter form of cell death, it did not prevent apoptosis in our system, suggesting that a novel caspase-8 activating complex is formed upon glucose deprivation. One stimulus that has been shown to promote activation of caspase-8 in the cytosol is the accumulation of polyglutamine repeats. Expression of ataxin-3 with an expanded polyglutamine tract is toxic to neurons. Sánchez *et al.*<sup>39</sup> observed that cell death is caspase-8-dependent in this system. Caspase-8 and FADD were shown to be recruited to polyglutamine inclusions, which could serve as an aggregation platform for caspase-8. As glucose is required for protein glycosylation, and impairment of glycosylation leads to accumulation of misfolded proteins, it can be speculated that glucose deprivation could promote the generation of protein inclusions, which could recruit and activate caspase-8.

The results presented here, together with other reports, indicate that glucose deprivation can kill cells in three different ways: necrosis, mitochondrial apoptosis or caspase-8-dependent apoptosis. Why some cells undergo ‘uncontrolled’ necrotic death while other cells undergo apoptosis is still not clear. In our system, caspase inhibitors did not support clonogenicity of glucose-deprived cells (Supplementary

Figure 2), indicating that this stimulus can induce caspase-independent cell death in the same cells. We show here that HeLa cells, which are able to undergo apoptosis through the mitochondrial pathway, die in a caspase-8-dependent manner upon glucose deprivation. This suggests that the caspase-8-dependent pathway of apoptosis described here could be engaged in cells with an intact mitochondrial pathway as well as in Bcl-2 or Bcl-xL-overexpressing tumor cells. This pathway may be relevant for pathologies that involve conditions of low glucose, such as ischemia and cancer.

## Materials and Methods

**Cell culture and treatments.** Bax, Bak DKO MEFs immortalized with V-40<sup>8</sup> were maintained in high-glucose pyruvate-free DMEM (Invitrogen, Prat de Llobregat, Spain) supplemented with 2 mM L-glutamine, 200 mg/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin sulfate and 10% FBS (Invitrogen).

For treatments, cells were plated at a concentration of 150 000/ml. and treated 24 h later, when they reached the concentration of 500 000/ml. Glucose deprivation was performed by rinsing the cells twice with glucose-free medium (Gibco/Invitrogen) and incubating them in glucose-free medium with freshly added 2 mM glutamine and antibiotics, plus 10% FBS dialyzed against PBS. Unless specified, caspase inhibitors were added at the time of addition of glucose-free medium. Q-VD-OPH (SM Biochemicals LLC, Anaheim, CA, USA) was used at 20  $\mu$ M. Other caspase inhibitors (ICN/MP) were used at 50  $\mu$ M. An equal amount of DMSO (solvent) was added to the controls. Unspecified reagents were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

For treatment with death ligands TRAIL (Peptrotech, Rocky Hill, NJ, USA), Fas ligand (Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland), TNF and death receptor agonistic antibodies, cells were preincubated with 5  $\mu$ M CHX (Sigma-Aldrich) for 30 min. HeLa cells were treated with 10 ng/ml human TNF (Peptrotech), and DKO MEF with 1 ng/ml TNF (Peptrotech) or 0.1  $\mu$ g/ml anti-murine Fas agonist antibody Jo2 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, cat. no. 554254) for 20 h unless specified otherwise in figure legends. The following blocking reagents were used: anti-TNF receptor type 1/p55 (clone 55R-170), anti-Fas ligand clone MFL3, and Fas-FC cat.

no. 556578 (all from BD Pharmingen), anti-TRAIL N2B2 (gift by Edith Janssen), TRAIL-R-FC (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and TNF-R-FC (Enbrel/etanercept from Wyeth, Immunex Corporation, Thousand Oaks, CA, USA).

**Measurement of cell death.** For analysis of viability, detached and attached cells were collected by trypsinization and subjected to FACS analysis to detect incorporation of PI 1  $\mu\text{g/ml}$  (10 min incubation in PBS). For subG1 analysis, cells were washed in PBS, fixed in 70% cold ethanol while vortexing and incubated for 1–10 days at 4°C. They were further washed, resuspended in PBS with 40  $\mu\text{g/ml}$  PI and 100  $\mu\text{g/ml}$  RNase A (Sigma) and incubated for 30 min at 37°C before FACS analysis. Percent of dead HeLa cells was defined as the population with low FSC/SSC compared with untreated cells. Staining with Annexin V-FITC (Immunostep, Salamanca, Spain) was performed according to the manufacturer's instructions in the presence of 0.5  $\mu\text{g/ml}$  PI.

Caspase activity was measured as DEVD-ase activity. Cells treated in six-well plates were lysed in lysis buffer (5 mM Tris-HCl pH: 8, 20 mM EDTA, 0.5% Triton-X 100). Twenty  $\mu\text{g}$  of protein were incubated with 20  $\mu\text{M}$  AC-DEVD-amc (BD Pharmingen) in a reaction buffer (HEPES 1 M pH: 7.5, glycerol 87%, DTT 1 M) for 2 h. Fluorescence values (arbitrary units) are divided by the value of fluorescence of untreated cells (used as value '1').

**Western blots.** Cells were treated as indicated in 10 cm plates. They were trypsinized, rinsed and lysed by resuspending them in Laemmli buffer (5 mM Tris-ClH/2% SDS) without bromophenol blue (Figures 2 and 4f) or freezing (rest of figures) in the presence of Complete antiprotease cocktail (Roche, Barcelona, Spain). After sonication, protein concentration was measured with BCA (Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein were mixed with Laemmli loading buffer. After electrophoresis, protein was transferred to a PVDF membrane (Millipore, Madrid, Spain). Membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-Tween (0.1%). Secondary antibodies (1/5000) were HRP conjugated (Zymax, Escondido, CA, USA) and detected with ECL reagent (Pierce). Antibodies used for western blot were as follows: actin (ICN clone C4), Bid (R&D Systems af860), murine caspase-8 (Alexis/Enzo Lifesciences, clone 3B10), human Caspase-8 (MBL M032-3), Caspase-3 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, cat. 9661 and 9662); co-chaperone p23 (Affinity Bioreagents-MA3-414, Lafayette, CO, USA), Bcl-xL (BD Pharmingen, cat. no. 556361), Fadd: Immunotech (MBL, Marseille, France), RIP-1 (BD Bioscience, 610458), PARP (Cell Signaling, 9542).

**Plasmids and RT-PCR.** pBABE-Bcl-xL was made by insertion of the sequence of Bcl-xL into pBABE-puro. The plasmid encoding histone 2B-green fluorescent protein (GFP) was a kind gift of Dr. R Agami (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands).

LMP vectors (Open Biosystems, Huntsville, AL, USA) encoding shRNA against murine caspases were generated by following the manufacturer's instructions. Sense sequences against caspase-9 were (5' to 3'): I – CGCCAGAGGTTCTCAG ACCAGA, II – CGGCCACTGCCTCATCATCAC, and against caspase-8: AACGACTGCAATGAA.

For RT-PCR,  $1.5 \times 10^6$  cells were collected, and their RNA was extracted with RNeasy kit from Qiagen (Madrid, Spain). RNA from 50 000 cells (~500 ng) was reverse-transcribed to cDNA with the high capacity cDNA reverse transcription kit from Applied Biosystems (Madrid, Spain). 15% of the resulting cDNA was used as a template in a PCR (25 cycles). The following primers were used: FasL, 5'-G CAAATAGCCAAACCCAGTACAC-3' and 5'-GCCACCTTTCTTATACTCACTCC AG-3'; TRAIL, 5'-CCTCTCGGAAAGGGCATTG-3' and 5'-TCCTGCTCGATGAC CAGCT-3'; TNF, 5'-ATCCGCGACGTTGGAATG-3' and 5'-ACCGCCTGGAG TTCTGGAA-3'; HMBS (loading control), 5'-TTGACGATCCTGAACTCT-3' and 5'-TCTTGAATGTTACGGGCAGT-3'.

**Transfections and generation of cell lines.** Stable cell lines were generated by retroviral infection with viruses produced in Phoenix-Eco cells. Cells infected with pMX-IRES-GFP with CrmA cDNA (kindly provided by JP Medema), with LZRS-MS-IRES-eGFP encoding c-FLIPL<sup>40</sup> or with shRNA against caspases were selected by sorting for GFP expression. For transient transfections, cells were rinsed with DMEM without FBS or antibiotics and incubated for 6 h with a mix of 2  $\mu\text{M}$  lipofectamine 2000 (Invitrogen) and plasmidic Histone-GFP DNA (1  $\mu\text{g}$ ) or siRNA at 100 nM except where indicated. RIPK1 and human caspase-8 were downregulated using Dharmacon (Lafayette, CO, USA) On-Target smart pool (cat. no. L-040150 and cat. no. L-003466, respectively) with Dharmafect1. Dharmacon ON-Target plus non-targeting pool was used as a control. Sense sequence of siRNA duplexes against murine caspase-8 was

5'-CAGACAAAGUUUACCAAU[dT][dT] (Sigma). As a control, an irrelevant siRNA oligonucleotide (pBlue, sense strain: 5'-GUAAGACAGACUUUUCGC-3') was used. The same sequence coupled to a fluorochrome was used to measure transfection efficiency (pBlue-FITC), which was around 80% in all cases.

**Microscopy.** For analysis of nuclear morphology by visualization of Histone H2A-GFP, cells were plated and treated in four-well chamber slides (Mattek, Ashland, MA, USA), which had been previously coated with fibronectin (1  $\mu\text{g/ml}$  in PBS). Confocal microscopy was performed in non-fixed cells in culture medium at room temperature using a spinning disk confocal microscope (Marianas SDC imaging system, Intelligent Imaging Innovations/3i, Denver, CO, USA) with a 473 nm laser. Images were acquired using a Neofluar  $\times 63$  1.4 NA DIC objective on a Cascadell 512 EMCCD (Photometrics, Tucson, AZ, USA) using SlideBook 4.2 software (3i). For analysis of cell morphology, cells were treated in six-well plates and visualized in an Olympus (Center Valley, PA, USA) IX70 inverted microscope with a  $\times 20$  objective. Brightfield pictures were taken with an Olympus C-5060 camera. One tenth of the whole field is shown.

For electron microscopy, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M pH 7.4 buffer at 4°C. After fixation, samples were placed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M pH 7.4 buffer, dehydrated in a graded series of ethyl alcohol and embedded in Spurr resin.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** We thank Josh Goldstein for the pBABE-Bcl-xL plasmid, Seamus Martin for antibodies, John Silke and Joan Gil for discussions and Pat Fitzgerald, Marina Noriega, Ana Yrla and Marcela Saenz for technical assistance. We also thank TetraLogic Pharmaceuticals for supplying Compound A for studies carried out in John Silke's laboratory in La Trobe University. This work was supported by grants from the U.S. National Institutes of Health (to DRG), by Association pour la Recherche sur le Cancer and l'Agence Nationale de la Recherche (ref ANR-09-JCJC-0003-01) (to JER), and by the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII (Grants CP05/0036, PI071027 and RTIC RD06/0020 to CM-P).

1. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 231–241.
2. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH *et al*. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; **16**: 2794–2804.
3. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES *et al*. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; **91**: 479.
4. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; **275**: 1132–1136.
5. Deng J, Carlson N, Takeyama K, Dal Cin P, Shipp M, Letai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* 2007; **12**: 171–185.
6. Ekert PG, Read SH, Silke J, Marsden VS, Kaufmann H, Hawkins CJ *et al*. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol* 2004; **165**: 835–842.
7. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong W-X, Rathmell JC, Shiels HA *et al*. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 2000; **6**: 1389.
8. Wei MC, Zong W-X, Cheng EHY, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ *et al*. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; **292**: 727–730.
9. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB *et al*. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 1221–1228.
10. Ullman E, Fan Y, Stawowczyk M, Chen HM, Yue Z, Zong WX. Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ* 2007; **15**: 422.
11. Suzuki A, Kusakai G, Kishimoto A, Lu J, Ogura T, Esumi H. ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene* 2003; **22**: 6177–6182.

12. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 2007; **178**: 93–105.
13. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 5899–5912.
14. Gonin-Giraud S, Mathieu AL, Diocou S, Tomkowiak M, Delorme G, Marvel J. Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3 starvation. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 1147–1157.
15. Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Tong WP, Kim HR, Corry PM. Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death. *J Cell Sci* 1997; **110**: 681–686.
16. Alves NL, Derks IA, Berk E, Spijker R, van Lier RA, Eldering E. The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity* 2006; **24**: 703–716.
17. Zhao Y, Coloff JL, Ferguson EC, Jacobs SR, Cui K, Rathmell JC. Glucose metabolism attenuates p53 and puma-dependent cell death upon growth factor deprivation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 36344–36353: M803580200.
18. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T *et al*. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005; **120**: 237.
19. Tu HC, Ren D, Wang GX, Chen DY, Westergard TD, Kim H *et al*. The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 1093–1098.
20. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* 2004; **18**: 1272–1282.
21. McStay GP, Salvesen GS, Green DR. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ* 2007; **15**: 322–331.
22. Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 608–615.
23. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; **85**: 803.
24. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboulay S, Storgard CM, Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 2001; **155**: 459–470.
25. Wrasidlo W, Mielgo A, Torres VA, Barbero S, Stoletov K, Suyama TL *et al*. The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 2313–2318.
26. Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. ANALYSIS OF FIVE CASPASES. *J Biol Chem* 1997; **272**: 7797–7800.
27. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- $\kappa$ B and AP-1. *Mol Cell* 1998; **1**: 543.
28. Gong B, Almasan A. Apo2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand and death receptor 5 mediate the apoptotic signaling induced by ionizing radiation in leukemic cells. *Cancer Res* 2000; **60**: 5754–5760.
29. Vince JE, Wong WW-L, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU *et al*. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. *Cell* 2007; **131**: 682.
30. 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**: 12759–12768.
31. Irmiler 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.
32. Wang L, Du F, Wang X. TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008; **133**: 693–703.
33. DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Develop* 2008; **18**: 54.
34. Munoz-Pinedo C, Robledo G, Lopez-Rivas A. Thymidylate synthase inhibition triggers glucose-dependent apoptosis in p53-negative leukemic cells. *FEBS Lett* 2004; **570**: 205–210.
35. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA *et al*. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000; **6**: 529–535.
36. Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H *et al*. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res* 2002; **62**: 5897–5901.
37. Gröbner S, Adkins I, Schulz S, Richter K, Borgmann S, Wesselborg S *et al*. Catalytically active Yersinia outer protein P induces cleavage of RIP and caspase-8 at the level of the DISC independently of death receptors in dendritic cells. *Apoptosis* 2007; **12**: 1813.
38. Rebe C, Cathelin S, Launay S, Filomenko R, Prevotat L, L'Ollivier C *et al*. Caspase-8 prevents sustained activation of NF- $\kappa$ B in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* 2007; **109**: 1442–1450.
39. Sanchez I, Xu CJ, Joo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 1999; **22**: 623–633.
40. Werner AB, de Vries E, Tait SWG, Bontjer I, Borst J. TRAIL receptor and CD95 signal to mitochondria via FADD, caspase-8/10, Bid, and Bax but differentially regulate events downstream from truncated Bid. *J Biol Chem* 2002; **277**: 40760–40767.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

Title of Manuscript:

**Dying for something to eat: how cells respond to starvation**

---

Authors: Alfredo Caro-Maldonado, \*Cristina Muñoz-Pinedo

Laboratori d'Oncologia Molecular, IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge). Gran Via de L'Hospitalet 199. L'Hospitalet (Barcelona), 08907, Spain.

\*Corresponding author:

Cristina Muñoz-Pinedo

Mailing address:

IDIBELL

Hospital Duran i Reynals 3<sup>a</sup> planta

Gran Via de L'Hospitalet 199.

L'Hospitalet (Barcelona). 08907 Spain

Fax: 93 260 7426

Tel: 93 260 7339

Email: [cmunoz@idibell.cat](mailto:cmunoz@idibell.cat)

Email2: [munozpinedo@gmail.com](mailto:munozpinedo@gmail.com)

## **Abstract**

Food is a requirement of life. Unicellular and multicellular organisms have therefore developed mechanisms to detect, react to and, if necessary, survive the lack of it. In mammals, responses to lack of nutrients in blood are coordinated at the organismal level by hormonal cues. However, individual cells also sense and respond to nutrient deprivation, which occurs under physiological or pathological situations such as fasting, ischemia or solid tumor development. Frequently cells try and survive nutrient deprivation by reducing their energy and carbon requirements and by recycling structural components. However, under certain conditions, the cell reacts to nutrient deprivation by engaging the mitochondrial pathway of apoptosis. Indeed, the metabolic state of the cell can regulate pro- and antiapoptotic Bcl-2 family proteins such as PUMA, Bad, Bim or Mcl-1, thus altering the response to pro-apoptotic stimuli. Severe energetic stress can also kill cells by a form of death with necrotic phenotype.

Metabolic pathways are currently receiving enormous attention from cell biologists, due to the fact that tumors have a special metabolism which makes them more susceptible to lack of specific nutrients, particularly glucose and glutamine. For this reason, targeting tumor metabolism opens new therapeutic avenues. We will discuss how nutrient deprivation engages cell death pathways, and how cell metabolism interferes with the apoptotic machinery by regulating apoptotic proteins. We will also re-examine the hypothesis that ATP levels determine whether a cell dies by apoptosis or necrosis. Finally, we will discuss how and why metabolic stress can lead to either cell adaptation and survival or cell death.



## **Nutrient deprivation in physiological and pathological situations.**

Living organisms are continuously subjected to periods of starvation in nature. Nutrient availability determines the expansion of species and colonization of new ecological niches. Nutrients also dictate the appropriate time for mating, sporulating, hibernation and differentiation, from unicellular photosynthetic organisms to mammals. Humans suffer transient or persistent starvation due to a lack of food intake, either because of voluntary dieting, night fasting, or due to the scarcity of available food. Starvation is linked to our first contact with the world, since there is a period of mild starvation in the newborn before breastfeeding is established.

At the cellular level it is possible to observe pathological starvation during ischemia, which is a severe form of starvation due to simultaneous nutrient and oxygen deprivation. Cells in solid tumors are also very commonly exposed to starvation, because the tumor mass grows faster than the blood vessels. This leads to the formation of “necrotic cores”: areas that contain dead cells which did not get enough blood irrigation, and have not been able to survive oxygen and nutrient deprivation [1].

During times of scarcity, unicellular organisms try to save energy by undergoing specialized forms of hibernation such as sporulation. Multicellular organisms usually have specialized cells that detect nutrient deprivation –such as pancreatic cells in animals-, and specialized storage tissues such as adipose tissue. In response to starvation, animals use hormonal cues to mobilize stored resources to provide nutrients to individual cells. Besides whole-body responses to nutrient deprivation -such as the sensation of hunger which drives us to search for food-, individual cells sense and react to lack of nutrients. At the cellular level, starvation of specific nutrients triggers different responses in different tissues, since some tissues like the brain prefer glucose as a source of energy, while other tissues such as the heart or resting muscles prefer fatty acids as fuel. Nutrient deprivation at the cellular level usually leads to mobilization of stored nutrients and concomitant reduction of cellular functions. However, under some circumstances, cells are not able to adapt to stress, and metabolic or energetic stress leads to apoptosis or necrosis.

Apoptosis is a form of cell death which is activated in animals in response to cell-damaging agents, or to developmental cues (for a review on regulation of apoptosis by morphogens, please see Ditzel in this issue). The fact that many human cells die by apoptosis when deprived of a particular nutrient is intriguing. Cells die by apoptosis when they are not needed anymore (for instance after an immune response, when the pathogen has been eliminated), or when they are injured (for instance after a DNA-damaging insult or viral infection, as excellently reviewed by Gentle and Nachbur in this issue). When cells are deprived of nutrients, their primary response is usually to stop cycling (if they were proliferating), and try to survive using minimal amounts of energy and building blocks. It is thus still unknown why and how some cells engage the apoptotic machinery instead of arresting and waiting for “better times”. Moreover, cells which have undergone tumorigenic transformation are more prone to die than their normal counterparts. We will discuss how the decision of undergoing apoptosis instead of stopping the cycle might be influenced by oncogenes, and can thus be exploited for cancer treatment.

**Nutrient deprivation is sensed by AMPK and mTor and leads to cell cycle arrest, inhibition of protein synthesis and autophagy**

Cells require four types of “building blocks” to grow: lipids (fatty acids) to make membranes, amino acids for protein synthesis, nucleotides to build nucleic acids, and sugars to produce ATP and multiple macromolecules. Blood provides all of these nutrients to cells in our bodies, and researchers provide these nutrients to cells in culture in the form of enriched culture medium plus serum from animal blood. Since cells need to maintain the equilibrium between catabolism and anabolism, they need to sense the energetic state of the cell and react to starvation. We could define starvation at the cellular level as the lack of any nutrient that the cell requires in order to perform their functions. Unfortunately, the term ‘starvation’ is used in the scientific literature to describe many different stimuli which may lead to different outcomes. We can “starve” cells by incubating them in the simultaneous absence of glucose, amino acids, oxygen and serum: a condition that resembles ischemia. But “starvation” is also used to

describe deprivation of only one type of nutrient. For example, in autophagy studies “starvation” is very frequently used to describe amino acid deprivation. Thus, the term starvation is too broad and imprecise when we describe cell responses to the lack of a specific nutrient, since the responses to the absence of each of these nutrients might be completely different. A cell senses the presence of glucose, amino acids, fatty acids or oxygen in different manners, and it reacts differently to the lack of each of them. Moreover, “starvation” or “nutrient deprivation” can lead to energetic stress.

The term “energetic” or “energy stress” has also been used frequently to define any type of stress that would lead to a loss of ATP, which is our measurement of energy levels. As we will discuss later, it is the current view that loss of ATP would convert an apoptotic phenotype to a necrotic one [2]. It should be understood however that nutrient deprivation does not necessarily lead to energetic stress, and energetic stress is not necessarily caused by nutrient deprivation. Thus, deprivation of oxygen or one specific nutrient does not necessarily lead to an energetic stress, while it still triggers a hypoxic response or a starvation response specific for that particular nutrient. Responses are also particularly complex due to the fact that amino acids, glucose and fatty acids serve both as building blocks and cell-type specific energy donors.

Cells detect levels of energy or nutrients by sensing ATP and amino acid levels. The signaling pathways involved in nutrient/energy sensing primarily lead to cell adaptation. When normal nutrient flux is insufficient for the metabolic needs of the cell, the cell must decrease its needs. Additionally, the cell must degrade storage molecules such as glycogen, and if necessary, undergo autophagy. Autophagy is a homeostatic process that consists in the engulfment of cytosolic proteins and organelles into vesicles that fuse to lysosomes. This allows cells to degrade cellular components that serve as structure but also as an energy reserve.

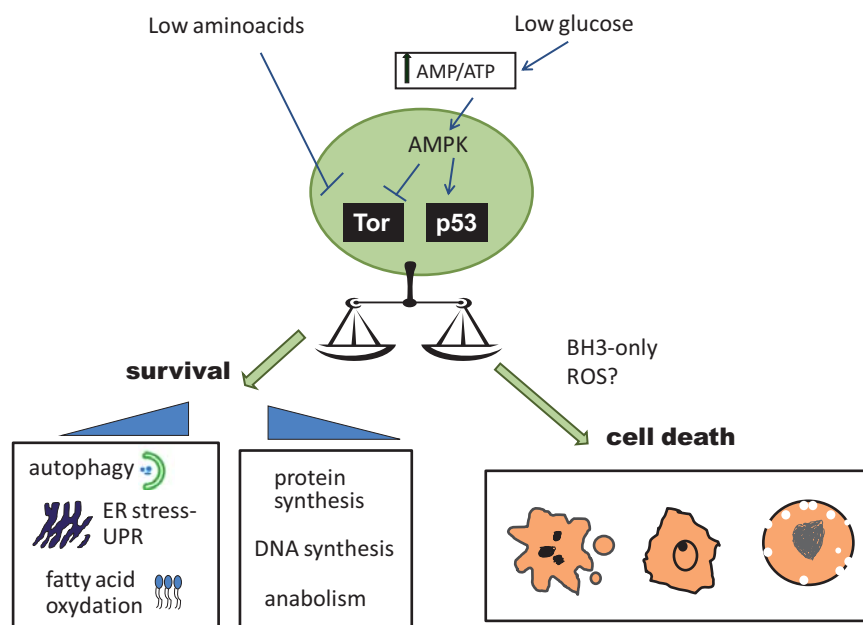
Lack of glucose or nutrients which a cell needs in order to maintain ATP, leads to the activation of AMPK (SNF1/AMP-activated protein kinase) [3]. AMPK is a trimeric protein complex with kinase activity which is allosterically activated by AMP. Mammalian AMPK is sensitive to the cellular AMP:ATP ratio, which is a good indicator of the energetic state of the cell. Activation of AMPK allows the cell to react to low ATP by regulating processes like glucose transport. This is achieved by increasing

translocation of a glucose transporter to the plasma membrane. Moreover, AMPK regulates transcription, inhibiting promoters of glucose-repressed genes and downregulating expression of biosynthetic genes. Low ATP levels and AMPK activation also inhibit cell proliferation through the activation of p53 and stabilization of the cell cycle inhibitor p27 [4, 5].

Another key element for the maintenance of energy homeostasis is TORC1. In mammals, TORC1 is a multiprotein complex that contains the mammalian target of rapamycin (mTOR). mTOR promotes protein synthesis, and it is highly active in proliferating cells. It is activated by hormones and growth factors, and it is also stimulated by intracellular amino acids. As recently reviewed by Wang *et al* [6], it is not yet known whether amino acids activate mTOR directly or indirectly. A few proteins which play a role in allowing mTor to sense amino acid levels are MAP4K3 [7] and Rag A and B [8]. But their exact role in the pathway requires further studies. Ultimately, lack of glutamine and leucine results in inhibition of mTor, which in turn leads to inhibition of protein synthesis.

mTORC1 regulates protein synthesis by directly phosphorylating two types of proteins that modulate components of the translational machinery: S6 kinases (S6Ks) and the eukaryotic initiation factor (eIF) 4E-binding protein (4E-BPs) [6]. Additionally, amino acid starvation and mTor inhibition decrease cdc2 activity thus stopping cell cycle. mTor inhibition also induces autophagy, which, as described above, helps cells survive under low nutrient conditions.

AMPK activation can also lead to the indirect inactivation of mTor. Thus, a reduction in either ATP levels or amino acid levels will ultimately lead to inhibition of protein synthesis, cell growth arrest and induction of autophagy (Fig.1). In summary, one cellular response when cells are confronted with lack of nutrients is to shift to catabolism, thereby staving off an energetic collapse that could lead to cell death.



**Fig. 1. Nutrient deprivation triggers pro-survival signals or cell death.**

Amino acid deprivation inhibits Tor activity, thus promoting autophagy and inhibition of protein synthesis. Activation of AMPK by a high AMP/ATP ratio promotes catabolism and inhibits anabolic processes such as protein and DNA synthesis; some of these effects are mediated by p53 activation or Tor inhibition. The unfolded protein response (UPR) is activated by ER stress caused by misfolded proteins when cells lack amino acids or glucose required for protein synthesis. Under some circumstances, lack of nutrients promotes cell death by classical apoptosis (left), apoptosis with atypical DNA condensation (middle) or necrosis (right).

### Lack of nutrients regulates Bcl-2 proteins

Caspases are proteases that are the effector enzymes for the apoptotic program. Apoptotic cells are readily phagocytosed and apoptosis therefore limits extracellular release of cytoplasmic content, which can induce inflammation [9]. There are two main pathways to apoptosis. The extrinsic pathway, as reviewed by Kantari and Walczak in this issue ( ) is induced by extracellular proteins termed 'death ligands'. The intrinsic or mitochondrial pathway is mediated by the apoptosome, a protein complex formed by caspase-9, Apaf-1 and the mitochondrial protein cytochrome c. This complex is formed upon the release of cytochrome c from the mitochondrial intermembrane space, an event that requires the proteins Bax and Bak, which oligomerize and form a pore in this membrane. This process is regulated by other Bcl-2

family proteins like the anti-apoptotic Bcl-2/Bcl-xL or Mcl-1, and the proapoptotic “BH3 only” such as Bim, Bid, Bad or PUMA [10], [see review by Dewson in this issue].

A number of studies have indicated that death induced by nutrient deprivation, and especially by inhibition of glucose metabolism, is mediated by the mitochondrial apoptotic pathway in many different cell types (Table1). For instance, low glucose levels induce Bax translocation, a drop in mitochondrial membrane potential and cytochrome c release in hematopoietic FL5.12 cells [11]. Moreover, glucose withdrawal-induced death can be inhibited by Bcl-2 in MCF-7 cells [12] or by Bcl-xL in Baf3 [13].

Recently, a number of studies have shown the importance of the amino acid glutamine as a tumor-specific nutrient. Transformation by the oncogene myc drives tumor progression, but it also confers sensitivity to glutamine depletion [14]. So far, only a few studies have provided insight into death induced by glutamine deprivation [15, 16]. Myc-transformed fibroblasts have been shown to die through the intrinsic pathway of apoptosis when deprived of glutamine because overexpression of Bcl-2 or a dominant-negative form of caspase-9 prevented death [15]. The authors also demonstrated that caspase-8, a caspase implicated in the extrinsic pathway, was not involved, since the expression of a viral inhibitor of caspase-8 did not prevent death.

Mitochondrial apoptosis is regulated by BH3-only proteins, which contain a Bcl-2 homology motif (the BH3 motif) which promotes activation of Bax and Bak leading to cytochrome c release. Amongst these proteins, Bad has been extensively linked to glucose metabolism and glucose deprivation-induced cell death [17]. Bad has been recently shown to behave as a “moonlighting” protein, serving a role in cell death but also in glucose metabolism. Bad is present in a complex in the mitochondria which includes the glycolytic enzyme glucokinase (hexokinase IV). This complex displays glucose phosphorylating activity and helps provide mitochondria with metabolic intermediates for ATP production [18]. Moreover, Bad participates in glucose sensing and blood glucose clearing. Bad-deficient mice develop glucose intolerance, and

isolated pancreatic islets from Bad deficient animals secreted significantly lower amounts of insulin when perfused with glucose [19] .

Involvement of Bad in glucose deprivation-induced cell death is supported by a few experiments. Treatment of human leukemic cells with a glycolytic inhibitor led to Bad dephosphorylation and BAX oligomerization on mitochondria [20]. Moreover, analysis of Bad-deficient mice revealed that Bad mediates apoptosis induced by glucose deprivation in mouse hepatocytes [18]. These experiments suggest that Bad serves as a BH3-only protein to directly mediate mitochondrial outer membrane permeabilization. However, the fact that this protein is involved in glucose sensing and metabolism complicates the interpretation of these results. The same region of the protein, the BH3 domain, mediates both functions of the protein: glucose metabolism and cell death. It remains to be determined whether the implication of Bad in glucose withdrawal-induced apoptosis is direct, through its effect on Bcl-2 family proteins, or indirect, through its effects on glycolysis, or both.

PUMA is a BH3-only protein which is strongly induced in response to DNA damage and growth factor withdrawal [see review by Ekert and Jabbour in this issue]. It has been recently described that PUMA is induced by glucose deprivation in murine hematopoietic cells [21]. Downregulation of PUMA with siRNA was sufficient to reduce death induced by glucose deprivation, indicating that PUMA mediates glucose withdrawal-induced cell death. PUMA can be induced in a p53-dependent manner after DNA damage and growth factor withdrawal [22]. Zhao et al showed that PUMA induction after glucose deprivation was also mediated by the transcription factor p53 [21]. Moreover, downregulation of p53 conferred a moderate protection from cell death, consistent with the moderate downregulation of PUMA and p53 levels that could be achieved by RNAi. Intriguingly, however, although p53 was activated, its levels were not altered upon glucose deprivation. Therefore, cell death after glucose deprivation seemed to be dependent on PUMA induction and p53 activity, but not on induction of p53.

Bim is one of the best studied BH3 proteins. Bim is essential for the execution of some of the apoptotic stimuli that can be antagonized by Bcl-2, including growth factor withdrawal and deletion of autoreactive T cells [23]. It was recently determined that Bim is responsible for activation of the mitochondrial pathway in some cell lines after endoplasmic reticulum (ER) stress [24]. This suggests that Bim may be involved in death induced by nutrient deprivation, since one of the consequences of nutrient deprivation is ER stress. Glucose is necessary for protein glycosylation, and amino-acids are necessary for protein synthesis. Malfunctioning of protein glycosylation or synthesis can cause accumulation of misfolded proteins, which leads to ER stress. For this reason, it is possible that ER stress, rather than ATP deprivation, is the cause for many of the consequences of glucose deprivation, including cell death. Supporting this idea, it has been demonstrated that the glucose analog 2-deoxyglucose kills some cell lines due to its effects on protein glycosylation rather than on ATP synthesis [25].

Bim is induced by ER stressors, and it was recently shown that Bim is also induced upon glucose withdrawal in murine hematopoietic cells, possibly due to ER stress caused by impairment of glycosylation [21]. Moreover, Bim mediates glucose deprivation-induced cell death of these cells, as revealed by the use of RNAi. It was not reported whether induction of Bim in this system was due to transcriptional or posttranscriptional regulation; it is possible that both levels of regulation were altered, since ER stress can induce both stabilization of the protein and transcription of Bim mRNA [24]. Interestingly, the same transcription factor involved in upregulation of Bim after ER stress, CHOP, is induced by amino acid deprivation [26]. This suggests that upregulation of Bim could be the cause for apoptosis induced by lack of several types of nutrients: glucose or amino acids.

Noxa is another BH3-only protein which can mediate apoptosis induced by either ER stress [27] or by glucose deprivation. Noxa was shown to be involved in apoptosis of Jurkat cells after glucose withdrawal, and downregulation of Noxa conferred a competitive survival advantage to primary T cells under low glucose conditions [28]. The authors hypothesized that the role of Noxa in this setting was



related to its ability to neutralize the antiapoptotic Bcl-2 homolog Mcl-1, and when they generated Jurkat cells with low levels of Mcl-1, they observed that these cells were more sensitive to glucose deprivation than the wild type cells. Thus, Mcl-1, like Bcl-2 and Bcl-xL, can protect cells from glucose deprivation-induced apoptosis. Moreover, as we will discuss later, Mcl-1 is regulated by glycolytic metabolism, which suggests that downregulation of Mcl-1 may be relevant for apoptosis induced by absence of glucose in different systems [29].

### **Nutrient deprivation also triggers necrosis and caspase-8 dependent apoptosis**

Apoptosis has been defined as “controlled cell death”, in contrast to necrosis that was described as a form of uncontrolled death that leads to the release of cytoplasmic content. Recently it has been described that necrosis is not just a passive process, but there are molecular mechanisms that are regulated during some forms of necrosis. For instance, necroptosis (RIP dependent necrosis), is a form of caspase independent, RIP kinase-dependent cell death [30]. Golstein and Kroemer reviewed the events that frequently occur during necrosis, some of which are related with mitochondrial dysfunction and can also occur during apoptosis: ATP depletion, mitochondrial swelling, cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> increase, Reactive Oxygen Species (ROS) production, activation of proteases like calpains, and finally, membrane rupture [31].

As discussed above, cells frequently die by apoptosis through the mitochondrial pathway when deprived of nutrients. However, many tumors have acquired resistance to the mitochondrial pathway through the overexpression of the pro-survival Bcl-2, Bcl-xL or Mcl-1, or mutations in pro-apoptotic BH3-only proteins or Bax and/or Bak. Bax and Bak are Bcl-2 family proteins required for cytochrome c release, and cells which are deficient in Bax and Bak cannot undergo apoptosis upon treatment with inducers which kill through the mitochondrial pathway. In the absence of Bax and Bak, some apoptotic stimuli trigger necrosis. E. White and colleagues studied death induced by metabolic stress (glucose deprivation under hypoxic conditions) in Akt-overexpressing mouse baby kidney cells [32]. They showed that when subjected to metabolic stress,

Bax, Bak-deficient cells died by necrosis. Conversely, their wild-type counterparts died by apoptosis, indicating that metabolic stress induces apoptosis when Bax and Bak are present, but necrosis in cells which cannot die by the mitochondrial pathway.

Intriguingly, however, a recent report indicated that mouse embryonic fibroblasts (MEFs) deficient in Bax and Bak die by apoptosis in response to glucose deprivation under normoxia [33]. These cells bypassed the mitochondrial pathway by engaging caspase-8, which is the apical caspase in the death receptor pathway of apoptosis. Unfortunately, the caspase-8 activating complex was not identified. Caspase-8-dependent apoptosis in response to glucose deprivation is not restricted to MEF: this protease is also involved in death of HeLa cells upon glucose starvation. Since HeLa cells die through the mitochondrial pathway in response to many stimuli, these results suggest that caspase-8 may mediate death induced by glucose deprivation in other cell types, perhaps through direct cleavage of caspase-3, or through the cleavage of the BH3-only protein Bid which could trigger the release of mitochondrial pro-apoptotic proteins.

Human adult cardiomyocytes downregulate many proteins of the apoptotic machinery during development, including Apaf-1, Bax and caspases. Cardiomyocytes were shown to die in a necrotic manner during experimental ischemia, which was achieved by incubating cells in a saline solution under hypoxia [34]. Since heart and brain ischemia (stroke) kill millions of people every year, it will be of great relevance to understand the mechanism of this form of caspase-independent cell death. ROS are common mediators of ischemic cell death, suggesting that oxidation of cellular components is the cause for necrosis, in the presence or absence of the apoptotic machinery [35]. It is well known that nutrient deprivation frequently triggers generation of Reactive Oxygen Species (ROS), since the lack of certain metabolic intermediates impairs the production of antioxidants like glutathione or NADPH [36]. Thus, under some circumstances, cells may die of necrosis upon ischemia or nutrient deprivation due to massive ROS production. It remains to be determined what tips the balance towards apoptosis or necrosis in cells with an intact apoptotic machinery.

Another example of non-apoptotic cell death induced by metabolic stress was described by Yuneva *et al.* [15], who observed that glucose withdrawal induced cell death in untransformed human fibroblasts. This form of death did not display classical chromatin condensation, and was not inhibited by the antiapoptotic protein Bcl-2. While caspase activation was not looked at in this model, the authors suggested that this form of death was not apoptotic. However, it is possible that in this system, as in Bax, Bak deficient MEFs, caspase-8 mediates cell death. Cell death without classical chromatin condensation was observed after subjecting human HepG2 hepatoma cells to glucose deprivation [37]. These authors also used the term 'necrosis' to describe this form of cell death, as neither Annexin binding or nuclear condensation could be observed. However, caspase inhibitors prevented cell death, and death was accompanied with caspase activation which shows that, by definition, this death was apoptotic. Thus in the absence of glucose, cells can die in a manner which is dependent on caspases but which can be mistaken with necrosis due to the lack of classical chromatin condensation. Indeed, Caro-Maldonado *et al* reported atypical, non-apoptotic chromatin condensation upon glucose deprivation in Bax, Bak-deficient MEFs, although these cells showed all other hallmarks of apoptosis [33].

As a summary, we can conclude that nutrient deprivation can induce apoptosis, necrosis, and caspase-dependent cell death without some classic apoptotic features, such as chromatin condensation (Fig. 1 and Table 1). It remains to be determined which factors determine whether cells die by apoptosis or necrosis. It has been suggested that ATP depletion can promote a switch to necrotic cell death in response to certain pro-apoptotic stimuli. Apoptosis is considered to be an ATP-dependent process and frequently described as "energy dependent death" while necrosis is thought to be a more 'passive' form of death. For this reason, it could be hypothesized that nutrient deprivation could induce apoptosis or necrosis depending on how much ATP is depleted by nutrient removal. However, the assumption that apoptosis requires ATP remains to be formally proven, since so far it is not possible to deplete ATP from a whole cell without altering many other parameters. Original experiments that led to the hypothesis of requirement of ATP for apoptosis were performed in Jurkat cells which

were incubated with an inhibitor of respiration in the absence of glucose. Under these ATP depleting conditions, apoptosis inducers such as staurosporine or a death ligand triggered a necrotic death without apoptotic features [38-40]. Thus, it was concluded that ATP depletion leads to a switch from apoptosis to necrosis. However, ATP depletion is only one of the many consequences of the simultaneous inhibition of respiration and glycolysis. This severe form of starvation could potentially lead to a reactive oxygen species burst which could be responsible for the switch between apoptosis and necrosis. Moreover, since tumor cells frequently make fatty acids and nucleotides from glucose, it remains possible that apoptosis was inhibited due to the loss of certain lipids or nucleotides, and not as a consequence of a drop in ATP.

In vitro studies had shown that formation of the apoptosome requires ATP or dATP [41]. It was thus argued that the switch from apoptosis to necrosis observed in Jurkat cells was due to the inability to activate the apoptosome. However, levels of dATP inside cells are usually high enough to allow apoptosome formation. Furthermore, in recent years it has been shown that ATP inhibits -rather than promote- apoptosome formation [42, 43]. Moreover, in several cell lines, reduction of ATP levels by glucose removal does not switch the form of death to necrosis, but it enhances apoptosis. Apoptosis induced by TRAIL, TNF or Fas ligation occurs faster when ATP levels are reduced by incubating cells in the absence of glucose [44, 45]. Moreover, ATP levels decrease during apoptosis, and it was shown that when mitochondrial ATP production is maintained during the apoptotic execution phase, cell membrane permeabilization is delayed [46]. Thus, at present, there is not enough evidence to conclude that apoptosis is an energy dependent process.

**Table 1. Nutrient starvation induces cell death.**

INDUCTORS	Response	Molecules implicated	References

Glucose withdrawal	Apoptosis	Bax, Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1	Vander Heiden <i>et al</i> [11], Lee <i>et al</i> [12], Gonin-Giraud <i>et al</i> [13], Alves <i>et al</i> [28].
		Caspase-8	Caro-Maldonado <i>et al</i> [33]
		Bad, PUMA, Bim Noxa, p53	Danial <i>et al</i> [17], Zhao <i>et al</i> [21], Alves <i>et al</i> [28].
	Necrotic phenotype		Yuneva <i>et al</i> [15], Suzuki <i>et al</i> [37]
	Survival	AMPK, mTOR, p53	Jones <i>et al</i> [4], Liang <i>et al</i> [5], Wang <i>et al</i> [6]
Ischemia, ischemic-like <i>in vitro</i> conditions	Necrosis, apoptosis	AKT, ROS, Bax, Bak	Degenhardt <i>et al</i> [32], Bahi <i>et al</i> [34]. For reviews, see Lee <i>et al</i> [47], Broughton <i>et al</i> [35]
Glutamine withdrawal	Apoptosis	Myc, Bcl-2, caspase-9	Yuneva <i>et al</i> [15], Julie <i>et al</i> [16]

### **Deciding whether to die or to live depending on food availability.**

Despite the common belief that ATP is required for apoptosis, most reports indicate that impairment of glycolysis generates a stress that would sensitize cells to other death inducers. Glucose deprivation or treatment with glycolytic inhibitors would thus synergize with chemotherapy, a phenomenon that can be exploited for therapeutic purposes. For instance, glycolytic inhibitors reverse resistance of leukemia cells to glucocorticoids [48] and sensitize cells from solid tumors to cisplatin, adriamycin and paclitaxel [49, 50]. The mechanism behind these effects is still unknown. It is possible that metabolic stress, like other forms of stress, promotes an imbalance in the amount of pro-apoptotic versus anti-apoptotic members of the Bcl-2 family. As discussed, nutrient levels can affect the levels or activity of p53, PUMA, Bad and Bim, which may be responsible for the sensitization or 'synergistic' effects of glucose deprivation with

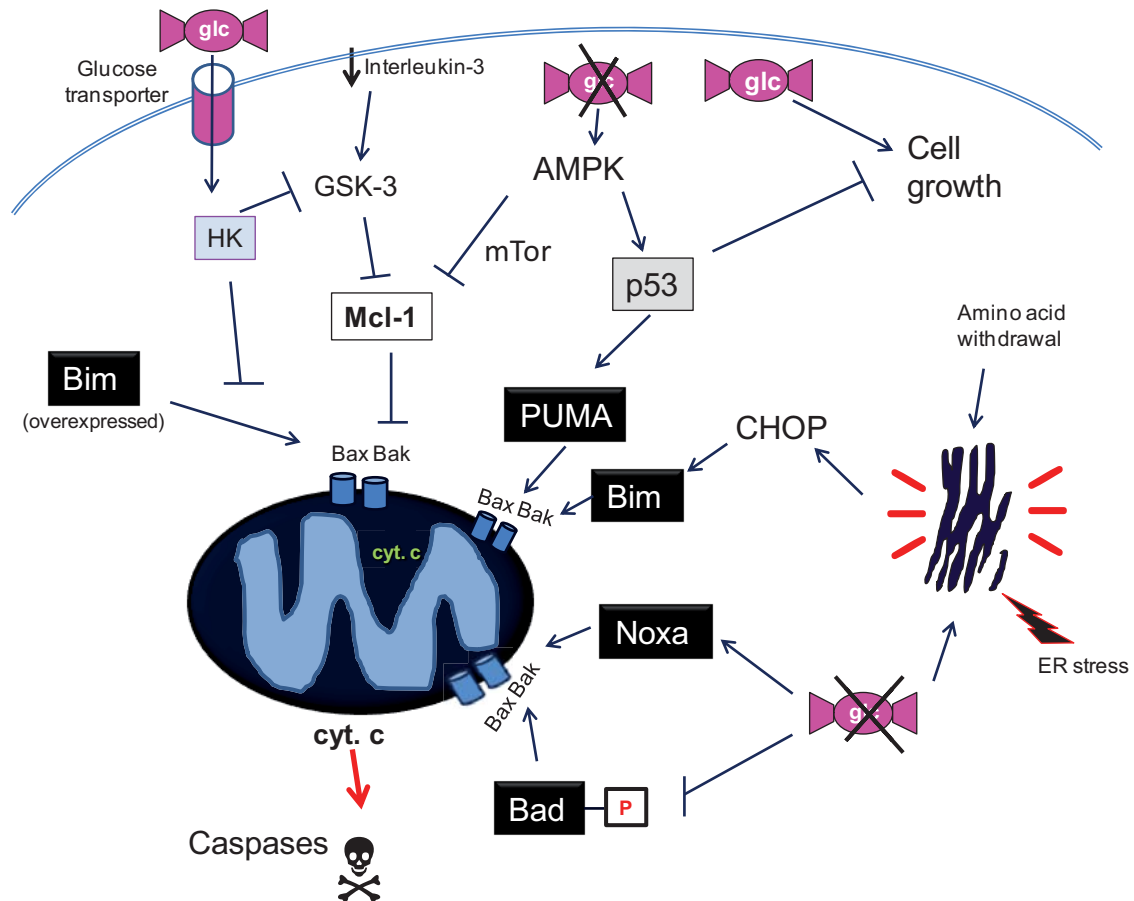
other apoptotic inducers (Fig.2). Moreover, it was described that glucose deprivation and 2-deoxyglucose downregulate Mcl-1 protein levels [21, 51]. In a recent report, Ricci and colleagues showed that Mcl-1 levels are reduced through an AMPK- and mTor-mediated block in translation upon inhibition of glycolysis. This makes cells susceptible to death ligands [51]. Indeed, a synergism between glycolytic inhibitors and death ligands TRAIL, FasL and TNF has been observed in several systems [44, 52, 53]. It is possible that in many cell lines glucose regulates death-ligand induced apoptosis at other levels besides Bcl-2 proteins. Sensitization to death ligands was shown to occur in some cell lines through glucose withdrawal-triggered downregulation of FLIP levels [45]. Moreover, glucose deprivation also conferred sensitivity to FasL to cells that do not require mitochondrial permeabilization to die (type I cells), and it enhanced the association of caspase-8 with TRAIL Receptor [44].

These results indicate that lack of nutrients sensitizes cells to apoptosis. A slightly different interpretation of this phenomenon is that an active glucose metabolism generates a signal that protects cells from apoptosis. Could this then mean that one of the consequences of having an active glycolytic metabolism is to generate a signal that protects from death? Could an enforcement of glycolysis help cells avoid apoptosis? An elegant approach was used by Rathmell and colleagues to demonstrate that the upregulation of glycolysis *per se* is sufficient to confer resistance to cytokine deprivation [54]. Overexpression of a glucose transporter and a hexokinase (the enzyme that catalyzes the first step of glycolysis) was sufficient to prevent death of IL-3-dependent cells when they were deprived of this cytokine (Fig. 2). Using this same system they showed that upregulation of glycolysis prevented cytochrome c release through maintenance of levels of Mcl-1. Mcl-1 is normally downregulated after IL-3 deprivation due to its phosphorylation by GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), which is a kinase that triggers Mcl-1 degradation when active [55]. Zhao *et al* [56] observed that the enforcement of glucose metabolism keeps GSK-3 $\alpha$  and 3 $\beta$  inactive, thus preventing the loss of Mcl-1. Interestingly, they also showed that glucose metabolism protected from the overexpression of Bim after transfection. Thus, a higher glycolytic

metabolism is sufficient to confer resistance not only to growth factor removal, but also to the expression of a 'killer' BH3-only protein.

Another manner in which glucose metabolism impinges on apoptosis is through regulation of induction of PUMA. As we have discussed above, glucose deprivation induces PUMA. Conversely, enforcement of glucose uptake and metabolism was shown to prevent PUMA induction by growth factor withdrawal [21]. Thus, an active glycolytic metabolism may be part of the strategy that tumor cells use in order to escape social controls and survive in the absence of growth factors.

Intriguingly, nutrient deprivation can inhibit apoptosis induced by certain stimuli. For instance, apoptosis induced by some DNA-damaging chemotherapeutic agents can be reduced in the absence of glucose, or when cells are treated with 2-deoxyglucose [57, 58]. It is unclear why inhibition of glycolysis would impair cell death induced by DNA damaging agents. It is tempting to speculate that the reason is that nutrient deprivation generally causes cell cycle arrest. Since many chemotherapeutic drugs require cells to be proliferating in order to kill them, the use of an antiglycolytic agent which induces cell cycle arrest may be counterproductive.



**Figure 2. Nutrients regulate the mitochondrial apoptotic machinery at multiple levels.**

Nutrients regulate Bcl-2 family proteins. Enforcement of glucose metabolism through overexpression of a glucose transporter plus hexokinase (HK) leads to maintenance of Mcl-1 and protection from Interleukin-3 withdrawal or Bim overexpression. Lack of glucose (glc, depicted as boiled sweets) activates p53, which can lead either to apoptosis mediated by induction of PUMA, or to cell growth arrest. Glucose deprivation also causes Bad dephosphorylation and Noxa-mediated apoptosis. Glucose withdrawal leads to induction of Bim, possibly mediated by the ER stress response. Amino acid withdrawal could also potentially lead to Bim induction as part of a CHOP-mediated ER stress response.

### Targeting glucose and glutamine metabolism for cancer therapy.

One of the hallmarks of cancer is the acquisition of resistance to apoptosis. This resistance is achieved through mutations or deregulation of levels of multiple proteins of the mitochondrial and the extrinsic pathway. Despite this, we use chemotherapy to treat tumors. Chemotherapy works because it kills proliferating cells better than non-dividing cells, and because chemotherapeutic drugs can kill cells in a non-apoptotic manner.



Interestingly, 2-deoxyglucose and other inhibitors of glycolysis are stimuli which can kill tumor cells better than non transformed cells [1]. 2-deoxyglucose is now being tested for use as a single agent or in combination as an anti-cancer agent in the United States [59] and has shown efficacy in India as a radiosensitizer [60]. The rationale behind the use of an anti-glycolytic agent for tumor treatment was provided by Warburg many years ago who showed that tumor cells have a different metabolism to normal cells. A consequence of this is that transformed cells are more sensitive to deprivation of some nutrients; particularly, glucose [1]. It was thought for many years that tumors are more glycolytic than non transformed cells because of mutations in mitochondrial DNA, which would lead them to rely on anaerobic glycolysis instead of respiration. Indeed, these mutations are frequent in tumors. Another possibility is that tumor cells have “learnt” to live without oxygen, and thus use glycolysis instead of respiration because they have to grow under low oxygen conditions. However, recently it has been realised that many of the genes that initiate tumorigenesis (oncogenes and tumor suppressors) are closely linked to metabolic regulation. p53 deficiency, transformation with c-myc or Ras, or alterations in PTEN/Akt pathway can all alter glucose and glutamine metabolism allowing cells to proliferate faster [4]. Alterations in metabolism are thought to allow tumors to avidly take nutrients and use them as building blocks for proliferation. Glucose, for instance, could mainly be used to produce nucleotides, instead of as an ATP source.

But why do tumor cells die when deprived of nutrients? This could be a similar scenario to standard chemotherapy. For example, tumor cells are more sensitive to inhibitors of DNA synthesis because they need to make more DNA than non-transformed cells. Extending this line of reasoning we could say that tumor cells are more sensitive to nutrient deprivation because they need more nutrients than non-proliferating cells. But still, why do these cells not stop cycling instead of dying? In other words, what makes a cell try to commit suicide instead of arrest and wait for better times? Although we are still far from an answer, it is possible that the reason why these cells die may be related with the inability to undergo autophagy and/or to stop the cell cycle, which occurs frequently in tumors.

One factor that can determine whether a cell dies or lives in response to nutrient deprivation is whether autophagy is engaged. As we have discussed, AMPK, the major energy sensor, is involved in cell cycle arrest and adaptation to stimuli which produce a drop in ATP levels. The signaling pathway downstream of AMPK protects cells from undergoing apoptosis in response to glucose deprivation [61]. One of the consequences of AMPK activation is induction of autophagy to help generate energy and building blocks (Figure 1). Since tumor cells frequently display a reduced capacity to undergo autophagy, this may contribute to their susceptibility to nutrient deprivation [32].

Other downstream targets of AMPK are cell cycle inhibitors p27 and p53, which are activated by AMPK and glucose deprivation. Both of these proteins have been reported to protect cells from nutrient deprivation downstream of AMPK, an effect that may be related to the ability of these proteins to stop cell cycle but also to induce autophagy [5, 62-64]. We are hereby presented with a situation in which p53, the “bona-fide” apoptotic inducer, instead of being pro-apoptotic, protects from apoptosis. In conclusion, targeting tumor metabolism may be doubly selective for tumor cells, since it would affect proliferating cells more than quiescent cells, and on the other hand, cells that lack p53, which are frequently resistant to chemotherapy, would be more sensitive than p53-positive cells.

## **Conclusions and future perspectives**

Starvation can induce cell death, but it also regulates death induced by other inducers. Solid tumors are a mass of rapidly growing cells that frequently have an imperfect blood supply and many cells within the mass may be starving or close to starvation. The high energy needs and special metabolism of tumors provide a potential that the cells natural responses to starvation can be used to target tumor cells and potentially synergise with other therapies. Therefore there is a great interest in trying to understand how cells respond to starvation and how this might interfere with

existing tumor therapies. However, most researchers culture their (mostly transformed) cells in rich medium with plenty of nutrients thereby limiting their ability to detect processes that can occur *in vivo*, where cells compete with each other for nutrients. As an example, Alves *et al* observed upregulation of Noxa by TCR stimulation, but a role for this protein on cell survival could only be detected when cells were grown in low glucose [28].

A number of questions concerning relations between cell metabolism and cell death remain to be solved. Since nutrients regulate Bcl-2 proteins, inhibitors of metabolism could synergize, positively or negatively, with other therapies. But, which apoptotic stimuli, especially the ones of clinical relevance, are more effective when combined with inhibitors of metabolism? Which BH3-only or anti-apoptotic Bcl-2 homologs are responsible for the synergistic effects observed *in vitro* between glucose deprivation and chemotherapy? Can this synergy be proven in animal models? Regarding the use of inhibitors of glycolysis and glutaminolysis, it remains to be determined which BH3-only proteins are responsible for death induced by inhibitors of these routes in tumor cells. Mutations in these proteins should thus predict sensitivity to anti-metabolic drugs. Moreover, could nutrient deprivation lead to autophagy-dependent necrotic cell death –since nutrient deprivation is a potent autophagic inducer- or to caspase-independent cell death, as observed in cardiomyocytes under ischemia? What are the differences, in terms of cell death, of targeting glucose metabolism, glutamine metabolism, oxygen availability or all of them? Answers to these questions may help us protect cells during ischemia, and may help us design better, more selective therapies against tumors.

## Acknowledgements

We would like to thank J. Silke, D. Walter, S. Ramírez-Peinado and N. El Mjiyad for critical reading of this manuscript. Research in our group is supported by AICR grant 08-0621 and by grants PI071027 and RTICC RD06/0020 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII.

## Figure and table legends

### **Figure 1. Nutrient deprivation triggers pro-survival signals or cell death.**

Amino acid deprivation inhibits Tor activity, thus promoting autophagy and inhibition of protein synthesis. Activation of AMPK by a high AMP/ATP ratio promotes catabolism and inhibits anabolic processes such as protein and DNA synthesis; some of these effects are mediated by p53 activation or Tor inhibition. The unfolded protein response (UPR) is activated by ER stress caused by misfolded proteins when cells lack amino acids or glucose required for protein synthesis. Under some circumstances, lack of nutrients promotes cell death by classical apoptosis (left), apoptosis with atypical DNA condensation (middle) or necrosis (right).

**Figure 2. Nutrients regulate the mitochondrial apoptotic machinery at multiple levels.** Nutrients regulate Bcl-2 family proteins. Enforcement of glucose metabolism through overexpression of a glucose transporter plus hexokinase (HK) leads to maintenance of Mcl-1 and protection from Interleukin-3 withdrawal or Bim overexpression. Lack of glucose (glc, depicted as boiled sweets) activates p53, which can lead either to apoptosis mediated by induction of PUMA, or to cell growth arrest. Glucose deprivation also causes Bad dephosphorylation and Noxa-mediated apoptosis. Glucose withdrawal leads to induction of Bim, possibly mediated by the ER stress response. Amino acid withdrawal could also potentially lead to Bim induction as part of a CHOP-mediated ER stress response.

### **Table 1. Nutrient starvation induces cell death.**

## References

1. Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006;25(34):4633.
2. Nicotera P, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*;23(16):2757.
3. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(10):774-85.
4. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 2009;23(5):537-48.
5. Liang J, Shao SH, Xu Z-X, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 2007;9(2):218.
6. Wang X, Proud CG. Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. *Trends Cell Biol* 2009;19(6):260-7.
7. Findlay GM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochemical Journal* 2007;403(1):13.
8. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, et al. The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science* 2008;320(5882):1496-1501.
9. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(3):231-41.
10. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(1):47.
11. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21(17):5899-5912.
12. Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Tong WP, Kim HR, Corry PM. Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death. *J Cell Sci* 1997;110(Pt 5):681-6.
13. Gonin-Giraud S, Mathieu AL, Diocou S, Tomkowiak M, Delorme G, Marvel J. Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3-starvation. *Cell Death Differ* 2002;9(10):1147-57.
14. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(48):18782-7.
15. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 2007;178(1):93-105.
16. Julie CP, Paul JG, Eric RG. Rapid induction of the intrinsic apoptotic pathway by L-glutamine starvation. *Journal of Cellular Physiology* 2005;202(3):912-921.
17. Danial NN. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* 2009;27(S1):S53.

18. Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 2003;424(6951):952-6.
19. Danial NN, Walensky LD, Zhang C-Y, Choi CS, Fisher JK, Molina AJA, et al. Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med* 2008;14(2):144.
20. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005;65(2):613-21.
21. Zhao Y, Coloff JL, Ferguson EC, Jacobs SR, Cui K, Rathmell JC. Glucose Metabolism Attenuates p53 and Puma-dependent Cell Death upon Growth Factor Deprivation. *J. Biol. Chem.* 2008;283(52):36344-36353.
22. Jabbour AM, Daunt CP, Green BD, Vogel S, Gordon L, Lee RS, et al. Myeloid progenitor cells lacking p53 exhibit delayed up-regulation of Puma and prolonged survival after cytokine deprivation. *Blood* 2010;115(2):344-52.
23. Pinon JD, Labi V, Egle A, Villunger A. Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene*;27(S1):S41.
24. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007;129(7):1337-49.
25. Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, et al. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol Cancer Ther* 2007;6(11):3049-3058.
26. Bruhat A, Jousse C, Wang X-Z, Ron D, Ferrara M, Fafournoux P. Amino Acid Limitation Induces Expression of CHOP, a CCAAT/Enhancer Binding Protein-related Gene, at Both Transcriptional and Post-transcriptional Levels. *J. Biol. Chem.* 1997;272(28):17588-17593.
27. Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis: MULTIPLE PATHWAYS AND ACTIVATION OF p53-UP-REGULATED MODULATOR OF APOPTOSIS (PUMA) AND NOXA BY p53. *J. Biol. Chem.* 2006;281(11):7260-7270.
28. Alves NL, Derks IA, Berk E, Spijker R, van Lier RA, Eldering E. The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity* 2006;24(6):703-16.
29. Zhao Y, Altman BJ, Coloff JL, Herman CE, Jacobs SR, Wieman HL, et al. Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Mol Cell Biol* 2007;27(12):4328-39.
30. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2006;1757(9-10):1371.
31. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007;32(1):37-43.
32. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006;10(1):51-64.

33. Caro-Maldonado A, Tait SWG, Ramirez-Peinado S, Ricci JE, Fabregat I, Green DR, et al. Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells. *Cell Death Differ* 2010;doi: 10.1038/cdd.2010.21.
34. Bahi N, Zhang J, Llovera M, Ballester M, Comella JX, Sanchis D. Switch from Caspase-dependent to Caspase-independent Death during Heart Development: ESSENTIAL ROLE OF ENDONUCLEASE G IN ISCHEMIA-INDUCED DNA PROCESSING OF DIFFERENTIATED CARDIOMYOCYTES. *J. Biol. Chem.* 2006;281(32):22943-22952.
35. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 2009;40(5):e331-9.
36. Ahmad IM, Aykin-Burns N, Sim JE, Walsh SA, Higashikubo R, Buettner GR, et al. Mitochondrial O<sub>2</sub>\*- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J Biol Chem* 2005;280(6):4254-63.
37. Suzuki A, Kusakai G, Kishimoto A, Lu J, Ogura T, Esumi H. ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene* 2003;22(40):6177-82.
38. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997;185(8):1481-6.
39. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997;57(10):1835-40.
40. Ferrari D, Stepczynska A, Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J Exp Med* 1998;188(5):979-84.
41. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 1997;91(4):479.
42. Chandra D, Bratton SB, Person MD, Tian Y, Martin AG, Ayres M, et al. Intracellular nucleotides act as critical prosurvival factors by binding to cytochrome C and inhibiting apoptosome. *Cell* 2006;125(7):1333-46.
43. Samali A, O'Mahoney M, Reeve J, Logue S, Szegezdi E, McMahon J, et al. Identification of an inhibitor of caspase activation from heart extracts; ATP blocks apoptosome formation. *Apoptosis* 2007;12(3):465.
44. 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(15):12759-68.
45. Nam SY, Amoscato AA, Lee YJ. Low glucose-enhanced TRAIL cytotoxicity is mediated through the ceramide-Akt-FLIP pathway. *Oncogene* 2002;21(3):337-46.
46. Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, et al. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 2004;117(6):773-86.
47. Lee Y, Gustafsson Å. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* 2009;14(4):536.

48. Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A, VanderWeele DJ, Rudin CM, Broekhuis MJC, et al. Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2009;113(9):2014-2021.
49. Simons AL, Ahmad IM, Mattson DM, Dornfeld KJ, Spitz DR. 2-Deoxy-D-Glucose Combined with Cisplatin Enhances Cytotoxicity via Metabolic Oxidative Stress in Human Head and Neck Cancer Cells. *Cancer Res* 2007;67(7):3364-3370.
50. Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF, et al. 2-Deoxy-D-glucose Increases the Efficacy of Adriamycin and Paclitaxel in Human Osteosarcoma and Non-Small Cell Lung Cancers In Vivo. *Cancer Res* 2004;64(1):31-34.
51. Pradelli LA, Beneteau M, Chauvin C, Jacquin MA, Marchetti S, Munoz-Pinedo C, et al. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. *Oncogene* 2010;29(11):1641.
52. Volland S, Amtmann E, Sauer G. Glucose depletion enhances the anti-tumor effect of TNF. *Int J Cancer* 1992;52(3):384-90.
53. Wood TE, Dalili S, Simpson CD, Hurren R, Mao X, Saiz FS, et al. A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death. *Mol Cancer Ther* 2008;7(11):3546-3555.
54. Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB. Akt-Directed Glucose Metabolism Can Prevent Bax Conformation Change and Promote Growth Factor-Independent Survival. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23(20):7315-7328.
55. Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 2006;21(6):749-60.
56. Zhao Y, Altman BJ, Coloff JL, Herman CE, Jacobs SR, Wieman HL, et al. Glycogen Synthase Kinase 3 {alpha} and 3 {beta} Mediate a Glucose-Sensitive Antiapoptotic Signaling Pathway To Stabilize Mcl-1. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(12):4328-4339.
57. Haga N, Naito M, Seimiya H, Tomida A, Dong J, Tsuruo T. 2-Deoxyglucose inhibits chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells with inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1/stress-activated protein kinase activation. *Int J Cancer* 1998;76(1):86-90.
58. Munoz-Pinedo C, Robledo G, Lopez-Rivas A. Thymidylate synthase inhibition triggers glucose-dependent apoptosis in p53-negative leukemic cells. *FEBS Lett* 2004;570(1-3):205-10.
59. Raez LE, Langmuir V, Tolba K, Rocha-Lima CM, Papadopoulos K, Kroll S, et al. Responses to the combination of the glycolytic inhibitor 2-deoxy-glucose (2DG) and docetaxel (DC) in patients with lung and head and neck (H/N) carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25(18S):14025.
60. Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL, et al. Optimizing Cancer Radiotherapy with 2-Deoxy-D-Glucose. *Strahlentherapie und Onkologie* 2005;181(8):507.
61. Kato K, Ogura T, Kishimoto A, Minegishi Y, Nakajima N, Miyazaki M, et al. Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene* 2002;21(39):6082-90.



62. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* 2005;18(3):283.
63. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, et al. Systemic Treatment with the Antidiabetic Drug Metformin Selectively Impairs p53-Deficient Tumor Cell Growth. *Cancer Res* 2007;67(14):6745-6752.
64. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, et al. DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. *Cell* 2006;126(1):121.