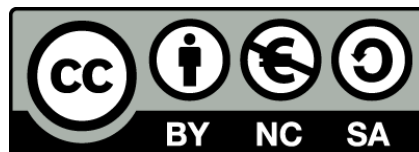




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Limitació de la plasticitat metabòlica per incrementar l'eficàcia dels fàrmacs inductors de dany a l'ADN en càncer

Ferran Medina Jover



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

**Limitació de la plasticitat metabòlica per
incrementar l'eficàcia dels fàrmacs inductors de
dany a l'ADN en càncer**

FERRAN MEDINA JOVER

2024



Program Against
Cancer Therapeutic Resistance

ProCURE
Programa
Contra la Resistència
Terapèutica del Càncer



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

**Limitació de la plasticitat metabòlica per incrementar
l'eficàcia dels fàrmacs inductors de dany a l'ADN en càncer**

FERRAN MEDINA JOVER

2024

Memòria presentada per Ferran Medina Jover per optar al grau de Doctor per la
Universitat de Barcelona

Dr. José Carlos Perales Losa

Director

Dr. Francesc Viñals Canals

Director

Ferran Medina Jover

Autor

***“Tota la força del moviment obrer modern descansa
sobre el coneixement científic”.***

Rosa de Luxemburg

TAULA DE CONTINGUTS

TAULA DE CONTINGUTS.....	1
LLISTA D'ABREVIATURES	7
LLISTA DE FIGURES	15
LLISTA DE TAULES.....	19
RESUM.....	21
SUMMARY.....	27
INTRODUCCIÓ.....	33
1. EL DANY A L'ADN.....	35
1.1. REPARACIÓ PER ESCISSIÓ DE BASES (BER).....	36
1.2. REPARACIÓ PER ESCISSIÓ DE NUCLEÒTIDS (NER).....	36
1.3. REPARACIÓ PER DISCORDANCES DE BASES (MMR)	37
1.4. DANY DE DOBLE CADENA.....	37
1.4.1. <i>Reparació per recombinació homòloga (HR)</i>	38
1.4.2. <i>Reparació per unió d'extrems no homòlegs (NHEJ)</i>	40
1.4.3. <i>Reparació alternativa d'unió d'extrems (A-EJ)</i>	40
1.4.4. <i>Reparació per anellament de cadena simple (SSA)</i>	41
2. PAPER DEL DANY A L'ADN EN EL CÀNCER.....	41
2.1. CÀNCER I MUTACIONS EN LES VIES DE RESPOSTA A DANY	43
2.1.1. <i>P53</i>	43
2.1.2. <i>Deficiència de recombinació homòloga (HRD)</i>	44
2.1.3. <i>A-EJ en HRD</i>	45
2.2. INDUCCIÓ DE DANY COM A TERÀPIA CONTRA EL CÀNCER	45
2.2.1. <i>Radioteràpia</i>	46
2.2.2. <i>Agents modificadors de l'ADN</i>	47
2.2.3. <i>Inhibidors de topoisomereses</i>	48
2.2.4. <i>Inhibidors de PARP (PARPi)</i>	49

2.3. RESISTÈNCIA A TRACTAMENTS	52
2.3.1. Mecanismes de resistència a PARPi.....	53
2.3.2. Estratègies per superar la resistència a PARPi	55
3. METABOLISME	55
3.1. METABOLISME ENERGÈTIC.....	56
3.1.1. Glicòlisi	57
3.1.2. Lactat deshidrogenasa (LDH)	59
3.1.3. Piruvat deshidrogenasa (PDH).....	60
3.1.4. El cicle de Krebs	61
3.1.5. Cadena respiratòria	65
3.1.6. Altres vies rellevants.....	68
3.1.7. Regulació integrativa del metabolisme energètic central	70
3.1.7.1. Al·losterisme	71
3.1.7.2. Factors de transcripció.....	71
3.1.7.3. Proteïnes sensores de l'estatus metabòlic.....	72
3.1.7.4. Senyals extracel·lulars.....	73
3.2. METABOLISME DEL NAD ⁺	74
3.2.1. Vies de síntesi de NAD ⁺	74
3.2.2. Degradació i consum de NAD ⁺	76
3.2.3. Regulació dels pools de NAD ⁺	76
3.3. METABOLISME DELS ROS.....	77
3.3.1. Mecanismes antioxidants.....	78
4. METABOLISME I CÀNCER	79
4.1. INHIBIDORS DEL METABOLISME EN LA CLÍNICA.....	81
4.1.1. Antimetabòlits	81
4.1.2. Inhibició del metabolisme glicolític.....	82
4.1.3. Inhibició del metabolisme oxidatiu	83
4.1.4. Inhibició del catabolisme de la glutamina	85
4.2. PLASTICITAT METABÒLICA.....	86
4.3. RELACIÓ ENTRE EL METABOLISME I EL DANY AL DNA	86

HIPÒTESI I OBJECTIUS	89
HIPÒTESI 1	91
<i>OBJECTIUS 1</i>	91
HIPÒTESI 2	91
<i>OBJECTIUS 2</i>	91
MATERIALS I MÈTODES	93
1. ANÀLISI BIOINFORMÀTICS	95
1.1. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE TUMORS DEL TCGA	95
1.2. ANÀLISI DE LA RESPOSTA A FÀRMACS DE CÈL·LULES DE CÀNCER.....	96
1.3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE TUMORS RESISTENTS A PARPI.....	96
2. CULTIUS CEL·LULARS	97
2.1. LÍNIES CEL·LULARS.....	97
2.2. PRODUCCIÓ DE LENTIVIRUS I INFECCIÓ	99
3. TÈCNiques D'ANÀLISI MOLECULAR	100
3.1. PCR QUANTITATIVA	100
3.2. WESTERN BLOT.....	102
3.3. IMMUNOHISTOQUÍMICA DE MOSTRES EN PARAFINA I QUANTIFICACIÓ	103
4. ASSAJOS FUNCIONALS	105
4.1. ASSAIG DE MORT CEL·LULAR.....	105
4.2. ASSAIG DE VIABILITAT CEL·LULAR.....	105
4.3. MESURA DELS ROS TOTALS	105
4.4. ASSAIG DE FLUX GLICOLÍTIC I OCR AMB SEAHORSE	106
4.5. ASSAIG DE METABOLÒMICA PER ANALITZAR L'ACTIVITAT DEL COMPLEX PDH	106
5. EXPERIMENTS IN-VIVO	107
5.1. AVALUACIÓ DE LA COMBINACIÓ DE IACS-10759 AMB DOXORUBICINA <i>IN-VIVO</i>	107
5.2. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL ID8-BRCA HRE <i>IN-VIVO</i>	108
6. REACTIUS	110

7. ANÀLISIS ESTADÍSTICS	111
RESULTATS.....	113
1. EL DANY DE DOBLE CADENA INDUEIX UN METABOLISME OXIDATIU REGULANT L'ACTIVITAT DEL COMPLEX PDH	115
1.1. EL DANY A L'ADN CORRELACIONA AMB L'EXPRESSION DE GENS DEL METABOLISME OXIDATIU	115
1.2. LA INDUCCIÓ DE DSB PROMOU UN INCREMENT DEL OXPHOS	118
1.3. L'EIX PDHK1/PDH ÉS EL RESPONSABLE D'ACTIVAR EL METABOLISME OXIDATIU DESPRES DE LA INDUCCIÓ DE DSB.	123
2. LA INDUCCIÓ DE DANY COMPORTA A UNA ACTIVACIÓ DE NRF2 QUE INHIBEIX L'EXPRESSION DE HIF-1 INHIBINT PDHK1	131
2.1. LA INHIBICIÓ DE HIF-1A DEGUT A LA INDUCCIÓ DE DSB ES RESPONSABLE DEL CANVI METABÒLIC CAP A OXPHOS.....	131
2.2. ROS INDUÏTS PELS DSB ACTIVEN NRF2 I PROMOUEN LA REPRESSION DE L'EIX HIF- 1/PDHK1	140
3. LA COMBINACIÓ D'INHIBIDORS DE L'OXPHOS AMB INDUCTORS DE DSB TÉ UN EFECTE SINERGÍSTIC EN EL CREIXEMENT TUMORAL <i>IN-VITRO</i> I <i>IN-VIVO</i>	150
3.1. LA INDUCCIÓ DE DSB COMBINADA AMB LA INHIBICIÓ DE HIF-1 O L'ACTIVACIÓ DE NRF2 NO INCREMENTA LA MORT SINERGÍSTICAMENT	150
3.2. LA INHIBICIÓ DEL METABOLISME OXIDATIU AMB LA INDUCCIÓ DE DSB REDUEIX EL CREIXEMENT TUMORAL.....	154
4. L'ADQUISICIÓ D'UN METABOLISME MÉS GLICOLÍTIC PROMOU LA RESISTÈNCIA A PARPI.....	158
4.1. EL PRECONDICIONAMENT METABÒLIC MODIFICA LA RESPOSTA A PARPI EN CÈL·LULES NAÏVE.....	158
4.2. GENERACIÓ DE CÈL·LULES RESISTENTS A PARPI	165
4.3. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LES CÈL·LULES RESISTENTS A PARPI.....	166

5. LA MODULACIÓ DE HIF-1 REGULA LA RESISTÈNCIA A PARPI	169
5.1. HIF-1 ACTUA COM A INDUCTOR DE RESISTÈNCIA A PARPI PROMOVENT EL METABOLISME GLICOLÍTIC I INHIBINT LA VIA D'A-EJ	170
5.2. LA INHIBICIÓ DE HIF-1 AUGMENTA LA SENSIBILITAT A PARPI EN MODELS RESISTENTS <i>IN-VITRO</i>	173
6. TUMORS REFRACTARIS A PARPI PRESENTEN UN METABOLISME MÉS GLICOLÍTIC.....	180
6.1. LA PFS DELS PACIENTS TRACTATS AMB PARPI CORRELACIONA AMB EL METABOLISME DEL TUMOR PRIMARI.....	180
6.2. LES RECIDIVES DE PACIENTS AMB BONA RESPOSTA A PARPI PRESENTEN UN METABOLISME MÉS GLICOLÍTIC	184
7. ANÀLISI DEL ROL DELS NÍNIXOLS HIPÒXICS EN LA RESISTÈNCIA A PARPI	186
7.1. GENERACIÓ I VALIDACIÓ D'UN MODEL ID8-BRCA AMB UN SISTEMA REPORTER D'HIPÒXIA	186
7.2. DESCRIPCIÓ DE LES DIFERENTS POBLACIONS GENERADES AL TRACTAR <i>IN-VIVO</i> AMB PARPI	189
DISCUSSIÓ	191
1. LA RESPOSTA METABÒLICA I ELS MECANISMES DE REPARACIÓ DE L'ADN	193
1.1. SOBRE L'INCREMENT DEL METABOLISME OXIDATIU A L'INDUIR DANY DE DOBLE CADENA	193
1.2. SOBRE EL MECANISME MOLECULAR DE RESPOSTA A L'ACUMULACIÓ DE DSB I LA INDUCCIÓ DEL METABOLISME OXIDATIU	194
1.3. SOBRE LES OPORTUNITATS TERAPÈUTIQUES DERIVADES DE LA PROMOCIÓ DE OXPPOS PER PART DELS FÀRMACS INDUCTORS DE DSB.....	197
2. L'ESTATUS METABÒLIC DEL TUMOR EN LA RESPOSTA A PARPI.....	199
2.1. SOBRE EL PRECONDICIONAMENT METABÒLIC DEL TUMOR I LA RESPOSTA A PARPI	199

2.2. SOBRE EL ROL DUAL DE HIF-1 EN LA INDUCCIÓ DE LA RESISTÈNCIA A PARPI	201
2.3. SOBRE EL ROL DELS NÍNXOLS HIPÒXICS COM A ORIGEN DE LA RESISTÈNCIA A PARPI...	203
2.4. SOBRE LES POSSIBLES APLICACIONS TRANSLACIONALS	205
3. LA PLASTICITAT METABÒLICA I LA SEVA LIMITACIÓ	206
CONCLUSIONS.....	209
REFERÈNCIES.....	213
ANNEX 1: PUBLICACIONS	247

LLISTA D'ABREVIATURES

Nota: Per facilitar la lectura i la comprensió s'ha decidit mantenir les abreviatures en anglès dels noms de proteïnes, gens i d'alguns processos (o anàlisis), amb la seva traducció en català entre parèntesi (quan era possible). Pels noms de fàrmacs i metabòlits s'ha fet servir directament el català.

2DG: 2-deoxiglucosa

53BP1: p53-binding protein 1 (proteïna de unió a p53)

5-FU: 5-fluorouracil

ABC: ATP-Binding Cassette (cassette de unió d'ATP)

ACC: Acetyl-CoA carboxylase (carboxilasa d'acetil-CoA)

ACMS: α -amino- β -carboximuconat- ϵ -semialdehid

ACMSD: α -amino- β -carboximuconate- ϵ -semialdehyde descarboxilase (α -amino- β -carboximuconat- ϵ -semialdehid descarboxilasa)

ACTA1: actin alfa 1 (alfa actina 1)

ADN: Àcid desoxiribonucleic

ADPR: Ribosa adenosina difosfat

A-EJ: Alternative End Joining (unió d'extrem alternativa)

AKT: Protein kinase B (quinasa de proteïnes B)

AML: Leucèmia mieloide aguda

AMPK: AMP-activated protein kinase (quinasa de proteïnes activada per AMP)

APE1: AP endonuclease 1 (endonuclease AP 1)

ARN: Àcid ribonucleic

ATF4: Activating Transcription Factor 4 (factor de transcripció activador 4)

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated (mutat d'ataxia telangiectàsia)

ATMi: ATM inhibitor (inhibidor d'ATM)

ATP: Adenosina trifosfat

ATR: ATM and Rad3-related (relacionat amb ATM i Rad3)

ATRi: ATR inhibitor (inhibidor d'ATR)

BACH1: BTB and CNC homology 1 (BTBT i CNC homòleg 1)

BARD1: BRCA1-associated RING domain 1 (associat al domini 1 RING de BRCA1)

BER: Base Excision Repair (reparació per excisió de bases)

BNIP3: Bcl-2/adenovirus interacting protein 3 (proteïna d'interacció amb Bcl-2)

Llista d'abreviatures

BPE: 3-bromopiruvat

BPTES: Bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il) etil sulfòrid

BRCA: BReast CAncer gene (gen del càncer de mama)

BSA: Albúmina de sèrum bovi

C2P: Curated gene sets canonical pathways (Selecció de gene sets de les vies canòniques)

CD38: Differentiation clúster 38 (Clúster de diferenciació 38)

CDK: Cyclin-dependent kinase (quinasa dependent de ciclina)

cDNA: ADN complementari

CDPP: Cisplatí

CHIP-seq: Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (seqüenciació de immunoprecipitació de cromatina)

CHK: Checkpoint Kinase (quinasa de punt de control)

CHX: Cicloheximida

CM-H2DCFDA: Diacetat de diclorodihidrofluoresceïna

CoA: Coenzim A

COX5A: Cytochrome c oxidase subunit 5A (subunitat 5A de la citocrom c oxidasa)

CPA: Ciclofosfamida

CPT1A: Carnitine palmitoyltransferase 1A (carnitina palmitoiltransferasa 1A)

CTIP: Retinoblastoma binding protein 8 (Proteïna d'unió a retinoblastoma 8)

DAB: Diaminobenzidina

DEPMAP: Dependency Map

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (medi de cultiu modificat de Dulbecco).

DMF: Dimetilfumarat

DMSO: Dimetil sulfòxid

DNA2-BLM: DNA2 helicase and Bloom syndrome protein (helicasa DNA2 i proteïna del síndrome de Bloom)

DNA-PKs: DNA-dependent protein kinases (quinases de proteïnes dependents d'ADN).

DOXO: Doxorubicina

DPX: Xilè de dibutilftalat de poliestirè

DSB: Double-Strand Break (trencament de doble cadena)

ECL: Enhanced Chemiluminescence (quimioluminescència millorada)

EDTA: Àcid etilènediaminatetraacètic

EMA: European Medicines Agency (Agència Europea del Medicament)

ERCC: Excision Repair Cross-Complementing (reparació de creuament excisió)

EXO1: Exonuclease 1 (exonuclease 1)	GSVA: Gene Set Variation Analysis (Anàlisi de variació de gene sets)
FADH2: Dinucleòtid de flavina adenina	GTP: Guanosina trifosfat
FDA: Food and Drug Administration (Administració d'Aliments i Medicaments)	Gy: Gray
FDR: False Discovery Rate (Taxa de falsos descobriments)	H2AX: H2A histone family member X (membre de la família de histones H2AX)
FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded (fixat en formalina inclòs en parafina)	HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2 (receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà)
FPKM-UQ: Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads - Upper Quartile (fragments per kilobase de transcrit per milió de lectures mapejades - quartil superior)	HGSOC: High-grade serous ovarian cancer (càncer d'ovari serós d'alt grau)
G6PD: Glucose-6-phosphate dehydrogenase (deshidrogenasa de glucosa-6-fosfat).	HIF-1: Hypoxia-Inducible Factor 1 (factor induïble per hipòxia 1)
GC/MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry (cromatografia de gas-espectrometria de masses)	HIFi: Hypoxia-Inducible Factor inhibitor (inhibidor del factor induïble per hipòxia)
GFP: Green Fluorescent Protein (proteïna fluorescent verda)	HK2: Hexokinase 2 (hexoquinasa 2)
GLS1: Glutaminase 1 (glutaminasa 1)	HMOX1: Heme oxygenase 1 (hemo oxigenasa 1)
GLUT: Glucose Transporter (transportador de glucosa)	HR: Homologous Recombination (recombinació homòloga)
GO: Gene Ontology	HRD: Homologous Recombination Deficiency (deficiència en recombinació homòloga)
GSEA: Gene Set Enrichment Analysis (Anàlisi d'enriquiment de gene sets)	HRE: Hypoxia Response Element (element de resposta a hipòxia)
GSH: Glutathione (glutatió).	HRP: Homologous Recombination Proficient (competent per recombinació homòloga)
GSSG: Oxidized glutathione (glutatió oxidat).	IACS: IACS-010759

Llista d'abreviatures

IC50: Concentració Inhibidora 50	MDM2: Mouse Double Minute 2
IDH: Isocitrate Dehydrogenase (deshidrogenasa d'isocitrat)	MMR: Mismatched Repair (reparació de discordances de bases)
IHQ: Immunohistoquímica	MPC: Mitochondrial Pyruvate Carrier (transportador de piruvat mitocondrial)
IRINO: Irinotecan	MPCi: MPC inhibitor (inhibidor de MPC)
KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1 (Proteïna 1 associada a Kelch-like ECH)	MRE11: MRE11 Homolog (homòleg de MRE11)
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Enciclopèdia de Kyoto de gens i genomes).	MRN: MRE11-RAD50-NBS1 complex (complex MRE11-RAD50-NBS1)
RAS: Rat sarcoma virus proteïn (Proteïna de virus de sarcoma de rata)	MSH: MutS Homolog (homòleg de MutS)
KU70-80: Ku70/80 heterodimer (heterodímer Ku70/80).	MSIGDB: Molecular Signatures Database (base de dades de signatures moleculars)
LDH: Lactate Dehydrogenase (Lactat deshidrogenasa).	mTORC: Mammalian Target of Rapamycin Complex (complex diana de rapamicina en mamífers)
LIG4: Ligase IV (Lligasa IV).	MYC: MYC oncogene (oncogen MYC)
LOXP: LoxP (seqüència de reconeixement de recombinasa Cre)	NAC: N-acetil cisteïna
MADH1: Mothers Against Decapentaplegic Homolog 1	NAD ⁺ : Dinucleòtid de nicotinamida
MAF: Maf protein (proteïna Maf).	NADH: Dinucleòtid de nicotinamida reduït
MCT: Monocarboxylate Transporter (transportador de monocarboxilats).	NADP ⁺ : Dinucleòtid de nicotinamida fosfat
MDC1: Mediator of DNA Damage Checkpoint 1 (Mediador del punt de control de dany a l'ADN 1)	NADPH: Dinucleòtid de nicotinamida fosfat reduït
	NAM: Nicotinamida
	NAMN: Mononucleòtid de nicotinamida

NAMPT: Nicotinamide phosphoribosyltransferase (nicotinamida fosforibosiltransferasa)	NRF2: Nom de la proteïna del gen NFE2L2
NAPRT: Nicotinate phosphoribosyltransferase (nicotinat fosforibosiltransferasa)	OCR: Oxygen Consumption Rate (taxa de consum d'oxigen)
NBS1: Nijmegen breakage syndrome 1 (síndrome de ruptura de Nijmegen 1)	OCT: Optimal cutting temperature compound (Compost de temperatura de tall òptima).
NDUFA4: NADH Oxidoreductase Subunit A4 (Subunitat A4 NADH oxidoreductasa)	ODD: Oxygen-Dependent Degradation (degradació dependent d'oxigen).
NDUFB1: NADH Oxidoreductase Subunit B1 (Subunitat B1 NADH oxidoreductasa)	OXPHOS: Oxidative Phosphorylation (fosforilació oxidativa).
NER: Nucleotide Excision Repair (reparació per excisió de nucleòtids)	OXPHOSi: OXPHOS inhibitor (inhibidor d'OXPHOS).
NES: Normalized enrichment score (Puntuació d'enriquiment normalitzada)	P53: Tumor Protein 53 (proteïna tumoral 53).
NFE2L2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Factor nuclear relacionat amb el factor eritroide 2)	PACLI: Paclitaxel.
NHEJ: Non-Homologous End Joining (unió d'extremes no homòlegs).	PAR: Poly(ADP-ribose) (poly(ADP-ribosa))
NMN: Mononucleòtid de nicotinamida	PARG: PAR glycohydrolase (PAR glicohidrolasa)
NMNAT: Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMN adenil-transferasa)	PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase (polimerasa de poli(ADP-ribosa))
NNMT: Nicotine N-methyltransferase (nicotina N-metiltransferasa)	PARPi: PARP inhibitor (inhibidor de PARP).
NOVO: Novobiocina	PBS: Phosphate Buffered Saline (solució salina tamponada amb fosfat).
NQO1: NAD(P)H quinone dehydrogenase 1(NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1)	PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen (antigen nuclear de cèl·lules proliferants).
	PCR: Polymerase Chain Reaction (reacció en cadena de la polimerasa).
	PDH: Pyruvate Dehydrogenase (deshidrogenasa de piruvat)

Llista d'abreviatures

PDHK: Pyruvate Dehydrogenase Kinase (quinasa de la deshidrogenasa de piruvat)	qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction (reacció en cadena de polimerasa quantitativa)
PDX: Patient-Derived Xenograft (xenograft derivat de pacient)	RAD23: RAD23 Homòleg
PEPCK: Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (carboxiquinasa de fosfoenolpiruvat)	RAD50: RAD50 Homòleg
PET: Positron Emission Tomography (tomografia d'emissió de positrons)	RAD51: RAD51 Homòleg
PFA: Paraformaldehid	RFP: Red Fluorescent Protein (proteïna fluorescent vermella).
PFK1: Phosphofructokinase 1 (fosfofructoquinasa 1)	RMA: Robust Multi-array Analysis
PFKFB: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose- 2,6-biphosphatase 3 (6-fosfructo-2- quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa)	RNASeq: RNA Sequencing (secuenciació d'ARN)
PFS: Progression-Free Survival (supervivència sense progressió)	ROS: Reactive Oxygen Species (espècies reactives d'oxigen)
PHGDH: Phosphoglycerate Dehydrogenase (deshidrogenasa de fosfoglicerat)	ROT: Rotenona
PI: Propidium Iodide (iodur de propidi)	RPA: Replication Protein A (proteïna de replicació A)
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase (fosfoinositol- 3-quinasa)	RUCA: Rucaparib
PMS2: Postmeiotic Segregation Increased 2	SARM1: SAM and HD domain-containing protein 1 (Proteïna 1 amb dominis SAM i HD)
POL: Polimerasa	SD: Desviació estàndard
PRPP: Phosphoribosyl pyrophosphate (pirofosfatasa de fosforibosil)	SDS: Sulfat dodecil sòdic
P-VAL: p-valor	SDS/PAGE: electroforesi en gel de poliacrilamida SD
PYRI: Piridostatina	SEM: Error estàndard de la mitjana
	SER: Serina

SDHD: Succinate Dehydrogenase Complex Subunit D (Subunitat D del complex deshidrogenasa de succinat)

SIRT: Sirtuin (sirtuïna)

SLC25A51: Solute Carrier Family 25 Member 51 (Familia 25 dels transportador de soluts membre 51)

SOD: Superoxide Dismutase (dismutasa de superòxid)

SSA: Single-Stranded Annealing (anellament de cadena senzilla)

ssGSEA: Single Sample Gene Set Enrichment Analysis. (Anàlisi d'enriquiment de gene set d'una sola mostra)

TALAZO: Talazoparib

TBS: Tris-buffered saline (salina tamponada amb Tris)

TCA: Tricarboxylic Acid Cycle (cicle dels àcids tricarbòxílics)

TGCA: The Genome Cancer Atlas (Atlas del genoma del cancer)

THF: Tetrahydrofolate (tetrahidrofolat)

TIGAR: TP53 Inducible Glycolysis and Apoptosis Regulator (Regulador de la glicolisi i apoptosi induït per P53)

TKM: Transcripts per Million (Transcrits per milió)

TOP: Topoisomerasa

VELI: Veliparib

VHL: Von Hippel-Lindau tumor suppressor (supressor de tumor Von Hippel-Lindau)

VITK: Vitamin K (Vitamina K)

WEE1: G2 Checkpoint Kinase (quinasa del punt de control G2).

WT: Wild Type (forma no mutada)

XP: Xeroderma Pigmentosum (xeroderma pigmentós)

XRCC1: X-ray repair cross-complementing protein 1 (proteïna de reparació creuada XRCC1)

LLISTA DE FIGURES

Figura 1: Tipus de dany a l'ADN i principals mecanismes de reparació	35
Figura 2: Vies de reparació del dany de doble cadena	38
Figura 3: Principals mecanismes de resistència a inhibidors de PARP	54
Figura 4: Esquema general de la via de la glicòlisi	59
Figura 5: El cicle de Krebs	62
Figura 6: Rol del cicle de Krebs com productor d'intermediaris	64
Figura 7: La cadena respiratòria a la membrana interna del mitocondri	66
Figura 8: Interconnexions de les diferents vies metabòliques descrite	69
Figura 9: Metabolisme del NAD ⁺	75
Figura 10: Els tumors amb HRD presenten un elevat metabolisme oxidatiu	87
Figura 11: El dany a l'ADN correlaciona amb un metabolisme oxidatiu incrementat	116
Figura 12: El dany agut a l'ADN produeix un increment del metabolisme oxidatiu	117
Figura 13: La quimioteràpia incrementa el flux glicolític sense afectar a la mort cel·lular	118
Figura 14: El metabolisme oxidatiu apareix quan s'acumulen els DSB	121
Figura 15: El dany agut a l'ADN produeix un increment del metabolisme oxidatiu en diverses línies cel·lulars de diferents tipus tumorals	122
Figura 16: L'activitat de la PDH correlaciona amb la seva fosforilació	124
Figura 17: La inducció de DSB provoca una disminució en la fosforilació de la PDH	126
Figura 18: La PDHK1 és l'encarregada de regular l'activitat de la PDH	128
Figura 19: L'eix PDHK1/PDH també es troba reprimat en tumors humans amb mutacions en BRCA1/2	129
Figura 20: Identificació de BACH-1 i HIF-1 α com a possibles candidats a regular l'expressió de <i>PK1</i>	132
Figura 21: BACH-1 i HIF-1 α estan infraexpressats en els models amb dany crònic a l'ADN	134

Figura 22: BACH-1 i HIF1- α es troben infraexpressats en tumors amb mutacions a <i>BRCA1/2</i>	136
Figura 23: BACH-1 no és el principal responsable de la regulació del eix PDHK1/PDH	137
Figura 24: HIF-1 regula l'expressió de la PDHK1 així com l'activitat de la PDH	138
Figura 25: La inducció de DSB reprimeix l'expressió de HIF-1 α i de PDHK1	140
Figura 26: Els DSB promouen un increment de ROS que provoca un canvi cap al metabolisme oxidatiu	142
Figura 27: La inhibició dels ROS promoguda pels DSB impedeix el canvi metabòlic cap el metabolisme oxidatiu	144
Figura 28: La inducció de NRF2 independent de ROS també indueix el metabolisme oxidatiu	146
Figura 29: NRF2 és necessari per reprimir l'eix HIF-1/PDHK1	148
Figura 30: Esquema del mecanisme de resposta a DSB que comporta l'activació del metabolisme oxidatiu	151
Figura 31: La inhibició de HIF-1 o l'activació de NRF2 no sensibilitzen sinèrgicament a inductors de DSB	152
Figura 32: La inhibició del metabolisme oxidatiu augmenta sinèrgicament la sensibilitat a inductors de DSB <i>in-vitro</i>	154
Figura 33: La inducció de DSB i l'ús de inhibidors del metabolisme oxidatiu té un efecte sinèrgic en la reducció del volum tumoral	157
Figura 34: El estatus metabòlic de les cèl·lules tumorals modula la sensibilitat a PARPi	159
Figura 35: Mecanismes d'acció dels diferents PARPi segons el model de Murai et al.	159
Figura 36: El estatus metabòlic no modifica la sensibilitat a inhibidors d'altres efectors de la via d'A-EJ	162
Figura 37: Cèl·lules amb HRD crescudes en hipòxia són capaces d'activar HIF-1 i augmentar el metabolisme glicolític	163
Figura 38: La hipòxia augmenta la resistència a PARPi en cèl·lules HRD	164
Figura 39: Validació dels models cel·lulars resistents a PARPi	165

Figura 40: Les cèl·lules resistents reprimeixen l'expressió de gens involucrats en el metabolisme oxidatiu	166
Figura 41: Les cèl·lules resistents a Olaparib presenten tenen un metabolisme més glicolític	168
Figura 42: La inhibició de HIF-1 fomenta el metabolisme oxidatiu en les cèl·lules ID8-B-RO	170
Figura 43: La inhibició de HIF-1 fomenta el metabolisme oxidatiu en les cèl·lules A2780-RO	173
Figura 44: La inhibició mitjançant shRNA de <i>Hif1a</i> també comporta una disminució dels marcadors del metabolisme glicolític	174
Figura 45: La inhibició del metabolisme glicolític resensibilitza les cèl·lules ID8-B-RO a PARPi	176
Figura 46: La inhibició del metabolisme glicolític resensibilitza les A2780-RO a PARPi	178
Figura 47: Les pacients que responen a PARPi tenen enriquides vies del metabolisme oxidatiu	181
Figura 48: Les pacients que responen millor a PARPi presenten un metabolisme més oxidatiu	183
Figura 49: Les recidives de les pacients bones respondedores adopten un metabolisme més glicolític	185
Figura 50: Posada a punt del model reporter d'hipòxia	187
Figura 51: Anàlisi de les diferents poblacions tumorals en tumors tractats amb PARPi	190

LLISTA DE TAULES

Taula 1: Inhibidors de topoisomerases.	49
Taula 2: Usos dels inhibidors de PARPi a la clínica	51
Taula 3: Encebadors emprats per qPCR	101
Taula 4: Anticossos emprats per Western Blot	103
Taula 5: Taula de reactius emprats	110

RESUM

Les alteracions en la reparació de l'ADN són clau en el procés tumorigènic. Així, la reparació dels trencaments de doble cadena (DSB) és una tasca fonamental en la preservació de la integritat dels cromosomes. La reparació dels DSB implica diversos mecanismes, sent la via de recombinació homòloga (HR) crítica en el context tumoral. Les mutacions en gens clau d'aquesta via (com BRCA1/2, Rad51) augmenten la inestabilitat genòmica del tumor i s'han descrit en diversos tipus de tumors, com el càncer d'ovari, de mama i de pròstata. Aquest tipus de tumors, anomenats tumors amb deficiència de recombinació homòloga (HRD), es tornen cada cop més dependents d'A-EJ, especialment de l'activitat de PARP1, que detecta el dany a l'ADN i s'autoPARila, a la vegada que també modifica a altres proteïnes implicades en la resposta al dany de l'ADN. Quan s'inhibeix PARP1 en un context de HRD, els tumors no poden reparar eficaçment el dany de l'ADN i moren, en un fenomen conegut com letalitat sintètica. Així, en l'última dècada, s'ha establert l'eficàcia clínica dels inhibidors de PARP (PARPi) per tractar tumors HRD.

Aquesta tesi s'ha dividit en dues parts. La primera part se centra en les adaptacions metabòliques a l'acumulació de DSB. La inducció de dany a l'ADN és un mecanisme d'acció comú de diversos agents quimioterapèutics utilitzats a la clínica. El NAD⁺ és un factor crític en l'activitat de PARP, ja que actua com a substrat per a la PARilació i serveix com a coenzim vital en nombroses reaccions del metabolisme energètic. Per mantenir les demandes de NAD⁺, els tumors HRD presenten un metabolisme més oxidatiu en comparació amb els tumors amb una recombinació homòloga eficient. En aquesta primera part de la tesi, s'ha descrit que, quan els tumors s'enfronten a DSB en el seu genoma, causats ja sigui per dany crònic de l'ADN o pel tractament amb agents anti-tumorals convencionals, la seva plasticitat metabòlica facilita una adaptació en l'ús de les fonts de carboni i energia.

Concretament, els tumors transiten d'una oxidació parcial però ràpida de la glucosa, conegut com el fenotip Warburg, a una oxidació mitocondrial completa. L'oxidació mitocondrial completa és molt eficient i permet a les cèl·lules tumorals produir nivells elevats d'ATP i restaurar els nivells de NAD⁺, ambdós essencials per mantenir la reparació de l'ADN a través de la via A-EJ. Això fa que aquests tumors siguin més sensibles als inhibidors d'OXPPOS quan es combinen amb inductors de DSB.

La segona part d'aquesta tesi es centra en la reprogramació metabòlica dels tumors HRD que són resistents als inhibidors de PARP (PARPi). Cada vegada més pacients estan sent tractats amb PARPi. No obstant això, diversos treballs han descrit la resistència als PARPi, principalment per la restauració de les vies de recombinació homòloga o en la regulació del cicle cel·lular. Tanmateix, no s'ha explorat altres mecanismes com és el cas de les adaptacions metabòliques. Tenint en compte els resultats de la primera part de la tesi, es va formular la hipòtesi que la resposta als PARPi està condicionada per l'estat metabòlic del tumor. S'ha observat que les cèl·lules resistents als PARPi, així com els tumors dels pacients, presenten un metabolisme més glicolític, mentre que aquells que mostren un metabolisme basat en el metabolisme oxidatiu són més sensibles als PARPi. A més, la regulació dels nivells de HIF-1 es destaca com un punt clau en l'adquisició del fenotip glicolític, augmentant els nivells de PDHK1, que pot inhibir la PDH i bloquejar l'entrada de carbonis al cicle de Krebs. A més, l'ús d'inhibidors de HIF-1 reverteix aquest metabolisme glicolític i resensibilitza les cèl·lules als PARPi.

La plasticitat és una característica clau en la progressió del càncer, i reduir-la limita el potencial del tumor per evadir les diferents estratègies terapèutiques. En aquesta tesi, l'ús d'agents que indueixen dany a l'ADN ha demostrat limitar la plasticitat metabòlica de les cèl·lules tumorals, forçant-

les a dependre d'un metabolisme determinat. Per contra, la capacitat de les cèl·lules tumorals per augmentar la seva plasticitat, com ara recuperant l'expressió de HIF-1, els hi permet sobreviure a escenaris que inicialment haurien conduït a la seva mort, com és el cas dels tumors HRD tractats amb PARPi. Per tant, atacar les dependències metabòliques que les cèl·lules tumorals desenvolupen sota la pressió terapèutica pot augmentar l'eficàcia del tractament, fins i tot en escenaris de dosis limitades de fàrmacs a causa de la toxicitat o en casos de resistència a la teràpia. En aquesta tesi es demostra el potencial d'aplicar aquestes estratègies en diferents models preclínics de progressió tumoral *in-vivo*. A més, aquestes estratègies tenen el potencial d'augmentar les oportunitats terapèutiques, incrementant l'eficàcia dels fàrmacs, reduint la recaiguda tumoral i millorant la salut dels pacients.

SUMMARY

Alterations in DNA repair are key in the tumorigenic process. Thus, the repair of double-strand breaks (DSB) is a fundamental task in preserving the integrity of chromosomes. DSB repair involves several mechanisms, with the homologous recombination (HR) pathway being critical in the tumour context. Mutations in key genes of this pathway (such as BRCA1/2, Rad51) increase the tumour's genomic instability and have been described in various types of cancer, such as ovarian, breast, and prostate cancer. These types of tumours, called homologous recombination-deficient (HRD) tumours, become increasingly dependent on A-EJ, especially on PARP1 activity, which detects DNA damage and autoPARylates, while also modifying other proteins involved in the DNA damage response. When PARP1 is inhibited in an HRD context, the tumours cannot efficiently repair DNA damage and die, in a phenomenon known as synthetic lethality. Thus, in the past decade, the clinical efficacy of PARP inhibitors (PARPi) has been established for treating HRD tumours.

This thesis has been divided into two parts. The first part focuses on metabolic adaptations to the accumulation of DSBs. Inducing DNA damage is a common mechanism of action for several chemotherapeutic agents used in clinical settings. NAD⁺ is a critical factor in PARP activity, as it acts as a substrate for PARylation and serves as a vital coenzyme in numerous energy metabolism reactions. To meet NAD⁺ demands, HRD tumours exhibit a more oxidative metabolism compared to tumours with efficient homologous recombination. In this first part of the thesis, it has been described that when tumours face DSBs in their genome, caused either by chronic DNA damage or by treatment with conventional anti-tumoral agents, their metabolic plasticity facilitates an adaptation in the use of carbon and energy sources. Specifically, the tumours shift from a partial but rapid glucose oxidation, known as the Warburg phenotype, to complete mitochondrial oxidation.

Complete mitochondrial oxidation is highly efficient and allows tumour cells to produce high levels of ATP and restore NAD⁺ levels, both essential for maintaining DNA repair via the A-EJ pathway. This makes these tumours more sensitive to OXPHOS inhibitors when combined with DSB inducers.

The second part of this thesis focused on the metabolic reprogramming of HRD tumours that are resistant to PARP inhibitors (PARPi). An increasing number of patients are being treated with PARPi. However, several studies have described resistance to PARPi, mainly due to the restoration of homologous recombination pathways or cell cycle regulation. Nevertheless, other mechanisms, such as metabolic adaptations, have not been explored. Based on the results of the first part of the thesis, it was hypothesized that the response to PARPi is conditioned by the metabolic state of the tumour. It was observed that PARPi-resistant cells, as well as tumours from patients, exhibit a more glycolytic metabolism, while those that show a metabolism based on oxidative metabolism are more sensitive to PARPi. Additionally, the regulation of HIF-1 levels stands out as a key point in the acquisition of the glycolytic phenotype, increasing PDHK1 levels, which can inhibit PDH and block the entry of carbons into the Krebs cycle. Moreover, the use of HIF-1 inhibitors reverses this glycolytic metabolism and resensitizes the cells to PARPi.

Plasticity is a key characteristic in cancer progression, and reducing it limits the tumour's potential to evade different therapeutic strategies. In this thesis, the use of DNA-damaging agents has been shown to limit the metabolic plasticity of tumour cells, forcing them to depend on a specific metabolism. In contrast, the ability of tumour cells to increase their plasticity, such as by recovering HIF-1 expression, allows them to survive in scenarios that would have initially led to their death, as in the case of HRD tumours treated with PARPi. Therefore, targeting the metabolic dependencies that

tumour cells develop under therapeutic pressure can enhance treatment efficacy, even in scenarios of drug dose limitations due to toxicity or cases of therapy resistance. This thesis demonstrates the potential of applying these strategies in various preclinical models of tumour progression *in-vivo*. This has the potential to increase the therapeutic opportunities currently in use, improving drug efficacy, reducing tumour relapse, and improving patient outcomes.

INTRODUCCIÓ

1. EL DANY A L'ADN

L'ADN és la molècula on es conserva la informació genètica de les cèl·lules¹. Tot i que el dany a l'ADN té un paper fonamental en alguns processos fisiològics, com en la generació de diversitat d'anticossos en limfòcits o en la producció de gàmetes, en la majoria d'escenaris representa un problema per la supervivència de l'organisme. La conservació de l'ADN és cabdal per l'homeòstasi de la cèl·lula, i per això al llarg de l'evolució han aparegut diferents sistemes que permeten detectar, senyalitzar i reparar l'ADN en funció del tipus de dany que es generi² (Fig 1).

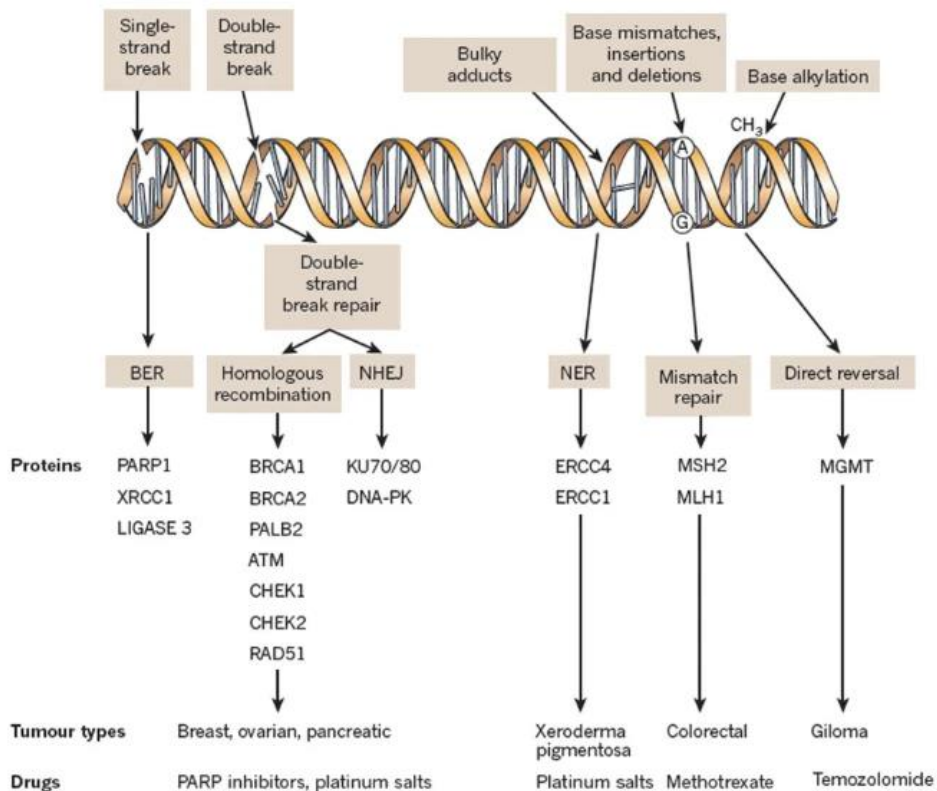


Figura 1: Tipus de dany a l'ADN i principals mecanismes de reparació. Esquema obtingut de²:

1.1. Reparació per escissió de bases (BER)

El sistema de reparació per escissió de bases (BER) és un dels mecanismes més conservats en l'arbre de la vida³. S'encarrega de reparar modificacions patides en bases nitrogenades, com l'alquilació o la desaminació, així com dels trencaments d'una sola cadena d'ADN. Els enzims inicials del BER són les ADN glicosilases, específiques per cada tipus concret de dany. Aquests enzims trencaran l'enllaç fosfodièster entre la desoxiribosa i la base nitrogenada, resultant en la producció d'un lloc abàsic (*AP site*). Seguidament APE1 actuarà com endonucleasa eliminant el nucleòtid. En funció de si s'eliminen més o menys nucleòtids actuaran diferents ADN polimerases, associades a diferents proteïnes com XRCC1 o PCNA, i ADN lligases (normalment LIG1 o LIG3)⁴.

Un dels sensors importants en aquesta via de reparació és PARP1. Aquest és un enzim que a l'activar-se utilitza com a substrat NAD^+ , un cofactor implicat en el metabolisme, per poli-ADP-ribosilar-se (PARilar-se) a ell mateix i a altres proteïnes. Aquestes modificacions comporten el reclutament d'altres proteïnes del sistema de reparació, facilitant la resposta i permeten corregir de manera més ràpida l'ADN. PARP1 és una proteïna molt important en el marc d'aquesta tesi i més endavant es profunditzarà sobre el seu rol⁵.

1.2. Reparació per escissió de nucleòtids (NER)

El sistema de reparació per escissió de nucleòtids (NER) detecta la formació d'enllaços covalents entre diferents bases nitrogenades, cosa que provoca la pèrdua de l'estructura de la doble hèlix en aquella regió. Aquest canvi d'estructura permet la detecció d'aquest tipus de dany. El NER es basa en tallar la zona on es troba la lesió i seguidament utilitzar el filament d'ADN

complementari per tornar a sintetitzar la regió eliminada, permetent d'aquesta manera eliminar la lesió existent. En tot el procés intervenen més de 30 proteïnes diferents, essent especialment rellevant els complexos de proteïnes de la família de xerodèrmia pigmentosa (XP) així com ERCC1, Rad23 i la proteïna de replicació A (RPA)⁶.

El punt limitant del procés és el moment del tall de la cadena amb la lesió, ja que cal que tot el complex de reparació estigui en una conformació i posició concreta. Un cop s'ha escindit el fragment, les polimerases i l'ADN lligasa 1 finalitzen el procés⁴.

1.3. Reparació per discordances de bases (MMR)

La funció principal del sistema de reparació per discordances de bases (*mismatch repair* (MMR), en anglès) és eliminar incongruències en un aparellament de bases (per exemple una G amb una T), així com errors produïts durant la replicació o la transformació d'algunes bases. Aquestes discordances són detectades pel sistema format per MSH2 i MSH6, que un cop localitzades queden unides en el lloc de la lesió. Llavors, permeten el reclutament de la resta de maquinària de reparació (PCNA, MADH1, PMS2 i EXO1), que eliminaran la lesió i permetrà a la Pol- δ i a l'ADN lligasa 1 finalitzar el procés⁷.

1.4. Dany de doble cadena

El trencament de doble cadena (DSB, en anglès) és el tipus de dany més greu, ja que compromet la integritat de tot el cromosoma. Si no es repara, pot comportar la mort cel·lular, així com, si es repara de manera incorrecta, pot resultar en la formació de translocacions cromosòmiques, un dels esdeveniments més primerencs en el procés carcinogènic. Clàssicament

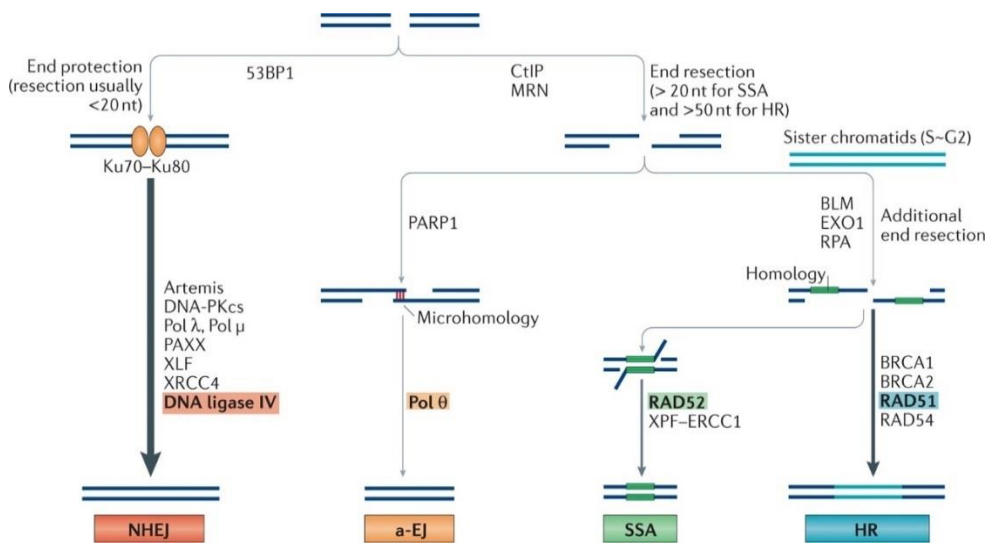


Figura 2: Vies de reparació del dany de doble cadena. Esquema obtingut de ⁹

hi havia dos mecanismes descrits per reparar els DSB, la recombinació homòloga (HR), i la unió per extrems no homòlegs (NHEJ), tot i que més recentment s'han descrit dos sistemes més que comparteixen mecanismes similars però amb diferents efectors (Fig 2). Aquestes són la reparació alternativa d'unió d'extrems (A-EJ) i l'anellament per cadena simple (SSA)^{4,8}.

1.4.1. Reparació per recombinació homòloga (HR)

Aquest sistema de reparació és un procés força complex que involucra a moltes proteïnes diferents, però que permet reparar l'ADN de manera molt fidel, ja que utilitza la cromàtide homòloga. Quan es detecta un DSB el complex MRN (format per MRE11-Rad50 i NBS1) reconeix la lesió i comença a reclutar altres proteïnes, entre elles CtIP, que permetrà activar l'activitat endonucleasa de MRE11^{10,11}. També es recluta a ATM, una quinasa de la família de PI3K i és un dels principals reguladors de la senyalització de dany i intervé en diverses cascades de senyalització¹². Quan hi ha dany, s'autofosforila i comença a fosforilar altres substrats, com p53, CHK2 i H2AX. L'activació de p53 aturarà el cicle cel·lular, i si el dany no es resol,

podrà promoure l'apoptosi de la cèl·lula. Per altra banda, la fosforilació de la histona H2AX dona lloc a γ -H2AX, un dels principals indicadors de dany de doble cadena, que promou el reclutament de MDC1 i permet l'amplificació del senyal, ja que el complex γ -H2AX-MDC1 recluta més complexos MRN-ATM¹³. A més a més, MDC1 promou el reclutament de ubiquitina lligases que modifiquen les histones properes a la lesió^{14,15}. Aquestes modificacions seran qui acabin reclutant el complex BRCA1-BARD1, que promourà l'activitat de MRE11, generant un ADN d'una sola cadena, que ràpidament serà protegit per RPA¹⁶. BRCA2 promourà que RAD51 reemplaci a RPA i promogui la invasió de la cadena homòloga¹⁷⁻¹⁹. Un cop s'ha aconseguit aquesta estructura, les ADN-polimerases poden regenerar el fragment de manera precisa, utilitzant la cadena homòloga com a motlle. Després de la síntesi d'ADN, es resol aquesta estructura, produint un doble tall seguit per les posteriors lligacions. En funció de com es produeixin aquests talls, pot donar lloc a recombinació, és a dir, un intercanvi de fragment entre els dos cromosomes²⁰. Apart d'ATM, els DSB poden activar a ATR, una quinasa relacionada amb ATM, que també promou la supressió de cicle a través de l'eix CHK1-WEE1-CDK1 i així com també està involucrada en la resposta a l'estrès replicatiu²¹. L'estrès replicatiu es defineix per la frenada o aturada de la progressió de la forqueta de replicació durant la síntesi d'ADN, i pot ser degut a diverses causes, com la presència de lesions a l'ADN o la manca d'elements per seguir amb la replicació (com la falta de nucleòtids). Mantenir una forqueta de replicació aturada compromet la integritat de l'ADN, ja que en aquell punt no es troba en forma de doble hèlix i és molt més vulnerable a patir qualsevol tipus de dany²².

La HR és un mecanisme complex que involucra diferents molècules d'ADN, i és un procés més lent que els altres mecanismes de reparació, però és predominant en lesions més complexes o que no han pogut ser resoltes

per altres mecanismes²³. Tot i això, és altament fidel i permet una reparació reduint l'aparició de mutacions.

1.4.2. Reparació per unió d'extrems no homòlegs (NHEJ)

La reparació utilitzant la via NHEJ és la més emprada per les cèl·lules per resoldre DSB de manera ràpida, ja que és molt més simple i no requereix cap cadena motlle. Tampoc necessita que hi hagi homologia en els extrems del trencament. No obstant, degut a que no intervé cap cadena motlle és un mecanisme que introdueix errors alhora de reparar l'ADN²⁴.

El complex Ku70-80 és el responsable de detectar els DSB. Quan es troba amb un DSB, s'uneix a aquest i llavors recluta a les DNA-PKs que s'uneixen al complex i s'autofosforilen. Un cop actives, fosforilen altres proteïnes que alhora són reclutades per prosseguir amb la reparació, i que permeten el processament de la lesió per permetre l'accés a les polimerases (Pol λ i Pol μ). Un cop sintetitzat el fragment entrarà en joc XRCC4²⁵. XRCC4 és essencial per aquesta via, ja que permet el reclutament de la LIG4 formant un complex que permetrà la lligació dels fragments sintetitzats²⁶.

1.4.3. Reparació alternativa d'unió d'extrems (A-EJ)

La reparació alternativa és més similar al NHEJ, però a diferència d'aquest necessita una resecció a 5'. Per això, s'utilitza el complex MRN-CtIP. PARP1 és l'encarregat de promoure l'A-EJ, i per això competeix amb el complex Ku70-80 per unir-se al lloc danyat²⁷. Seguidament PARP1, s'automodificarà i PARilarà proteïnes del voltant de la lesió, generant una xarxa que permet el reclutament de la resta de maquinària²⁸. Entre ells destaca el reclutament de la Pol θ , que és el principal efector d'aquesta via i sintetitzarà l'ADN²⁹. Finalment, la lligasa 1 o el complex ADN lligasa-XRCC1 unirà els fragments.

1.4.4. Reparació per anellament de cadena simple (SSA)

Aquest sistema es basa en una resecció més extensa que en el cas de l'A-EJ, ja que el SSA succeeix entre seqüències homòlogues localitzades al final 3' de les cues de ssDNA⁹. Aquestes seqüències homòlogues estan disponibles a causa de la presència de seqüències repetitives a cadascuna de les bandes del tall. La resecció es duu a terme per el complex MRN i CtIP i l'extensió per EXO1 i el complex DNA2-BLM^{30,31}. La cadena simple d'ADN serà coberta per la RPA. A diferència de la HR, la finalització d'aquest procés no es duu a terme per RAD51, sinó per RAD52 que acabarà el procés. Aquest mecanisme de reparació pot introduir mutacions, ja que les seqüències intermèdies entre les regions complementàries es perden³².

2. Paper del dany a l'ADN en el càncer

El càncer es caracteritza per tenir desregulats els processos que intervenen en l'homeòstasi i la proliferació normal de les cèl·lules. Aquest fet provoca que tots els tipus tumorals, encara que tinguin les seves característiques pròpies, comparteixin una sèrie d'elements comuns. Aquests elements comuns, anomenats en anglès *Hallmarks of cancer*, han estat extensivament descrits i revisats al llarg dels anys³³⁻³⁵. Entre ells destaquen la capacitat de les cèl·lules tumorals de replicar-se de manera il·limitada, alhora que potencien els senyals proliferatius i inhibeixen els senyals antiproliferatius i apoptòtics³³. A la vegada, es caracteritzen per la seva capacitat de generar noves mutacions, cosa que genera una diversitat de poblacions en un mateix tumor. Aquesta capacitat és essencial per la supervivència de les cèl·lules cancerígenes, ja que es troben en un procés de selecció natural. Per tant, aquelles que tinguin mutacions que permetin adquirir noves característiques que comportin un avantatge evolutiu seran seleccionades i acabaran representant la població dominant dins del tumor³⁴.

A part de la il·limitada capacitat proliferativa, així com de la generació de mutacions, els tumors també adopten altres canvis respecte d'una cèl·lula no transformada. Com es troben en una situació d'alta competència pels recursos, degut a aquesta proliferació descontrolada, els tumors promouen la formació de vasos sanguinis (angiogènesi) per obtenir més nutrients. Per altra banda, també reprogramen el seu metabolisme cap a un de més glicolític, per poder sostenir els nivells elevats de proliferació. Aquests *hallmarks* també són imprescindibles en el procés de metastatització, així com en el de desenvolupament de resistències al tractament³⁴. La plasticitat de la cèl·lula tumoral, així com la seva capacitat de generar noves mutacions per poder-se adaptar marcarà l'èxit o el fracàs d'una teràpia. Aquest punt serà desenvolupat en capítols posteriors³⁵.

El procés de malignització tumoral (o carcinogènesi) és el procés pel qual es desenvolupa un tumor des d'una cèl·lula no transformada. Com s'acaba de descriure, el paper de la proliferació així com de la generació de variabilitat tenen un paper fonamental en la progressió tumoral. Durant la vida de l'individu, l'exposició a estressos, tant interns com externs, produeixen l'acumulació de mutacions fruit d'una mala reparació de l'ADN³⁶⁻³⁸. En la immensa majoria de casos, aquestes mutacions no tenen cap mena d'efecte, però en un reduït nombre de casos aquestes mutacions poden conduir al procés de malignització tumoral³⁹. Cal destacar que en molt pocs casos una sola mutació és capaç de transformar una cèl·lula normal a cancerígena, si no que aquest procés és un procés gradual d'acumulació de mutacions en gens clau. Aquests gens solen estar relacionats amb mecanismes de control de la proliferació, el cicle cel·lular o la reparació de l'ADN^{40,41}. Podem distingir dos tipus de gens claus, els oncogens (com *KRAS*) o els gens supressors tumorals (com *TP53*). Mutacions en oncogens, en la majoria dels casos, promouran la sobreactivació d'aquests, facilitant el procés

de malignització⁴². En canvi, mutacions en els gens supressors de tumors, promouran la pèrdua de funció del gen, conduint a què els mecanismes de control no tinguin una correcta regulació⁴³.

Alguns dels gens supressors de tumors més freqüentment mutats en càncer estan relacionats amb la integritat del genoma i en la seva reparació. La seva disfunció acaba provocant un augment important en el nombre de mutacions acumulades, i provocant alteracions que reprogramen molts aspectes del funcionament normal d'una cèl·lula.

2.1. Càncer i mutacions en les vies de resposta a dany

És àmpliament acceptat que el correcte funcionament de les vies de reparació de l'ADN modulen el risc, la progressió i la resposta terapèutica en el càncer. Gairebé tots els tipus de càncer tenen, en algun grau, deficiències en la reparació de l'ADN⁴⁴. En el marc d'aquesta tesi tenen major rellevància p53, les proteïnes implicades en HR, i la via d'A-EJ especialment en el context de deficiència en HR.

2.1.1. P53

P53 té un rol fonamental en el manteniment de la integritat del genoma. En resposta a diferents estressos, p53 és activat i promou la inhibició del cicle cel·lular, activa la reparació de l'ADN o redueix el flux glicolític, entre d'altres^{45,46}. En casos més extrems, on el dany no es resol de manera satisfactòria indueix senescència o apoptosi⁴⁷. La regulació de p53 és a nivell de l'estabilitat d'aquesta proteïna i es duu a terme per la proteïna MDM2⁴⁸. MDM2 és capaç d'ubiquitinitzar p53 i promoure la seva degradació via proteasoma. A la vegada p53 quan està actiu promou l'expressió de MDM2, en un sistema d'autoregulació negativa⁴⁹. MDM2 pot ser fosforilada per diverses proteïnes de les vies de reparació d'ADN per inactivar-la⁵⁰.

P53 té un rol clau en la supressió tumoral i es troba molt sovint mutat en diferents tipus de càncer^{44,51}. La majoria de les mutacions són de canvi de sentit en el domini d'unió a l'ADN i comporten la pèrdua de funció de la proteïna, augmentant així l'acumulació de mutacions i de lesions mal reparades, en un fenomen anomenat inestabilitat genòmica⁵². Aquest fenomen succeeix quan diversos processos involucrats en el manteniment de l'ADN no funcionen correctament.

2.1.2. Deficiència de recombinació homòloga (HRD)

La HR és un dels processos més importants en la reparació de DSB com s'ha descrit anteriorment. Tot i això, en diversos tipus de tumors trobem deficiències en aquesta via de reparació. Aquesta deficiència en la recombinació homòloga (HRD) és molt important no només a nivell biològic, ja que canvia de manera considerable la naturalesa del tumor, sinó també a nivell clínic ja que obre noves oportunitats terapèutiques.

De tots els gens implicats en aquesta via, els gens que es troben més freqüentment mutats són *BRCA1* i *BRCA2*, tot i que també s'han descrit mutacions en *RAD51* o *ATM*⁵³. A part d'aquestes mutacions també s'han descrit fenòmens de silenciament epigenètic, que impedeixen l'expressió d'algun d'aquests gens, i per tant també donen lloc a HRD⁵⁴. Mutacions germinals en *BRCA1* o *BRCA2* han estat descrites com un factor de risc en el desenvolupament de càncer de mama i d'ovari familiar^{55,56}.

Els tumors que presenten més casos de HRD són els tumors d'ovari serosos d'alt grau (HGSOC), els de mama i els de pròstata. S'estima que un 25% dels casos de HGSOC tenen mutacions en *BRCA1* o *BRCA2* i un altre 25% afectacions en altres gens o silenciaments epigenètics⁵⁷, els tumors de mama es calcula que un 40% dels tumors són HRD⁵⁸, i en els tumors de pròstata metastàtics resistents a castració presenten mutacions en *BRCA1/2*

en un 20% dels casos. En menor mesura, s'han descrit mutacions en gens de la via de HR en càncer de pàncrees (8%)⁵⁹ i en càncer gàstric (7-12%)⁶⁰.

2.1.3. A-EJ en HRD

Tot i que cert grau d'instabilitat genòmica afavoreix el procés de carcinogènesi així com la resistència a tractaments, ja que afavoreix la presència de mutacions, un excés comporta la mort cel·lular degut a l'elevat nivell d'estrès que es provoca a la cèl·lula tumoral. A causa d'aquesta deficiència en la HR, aquests tumors depenen d'altres vies per reparar l'ADN. En aquest context, la via d'A-EJ guanya rellevància⁶¹.

De fet, aquesta via és essencial per la supervivència de tumors amb HRD. La inhibició de PARP1 en un context de HRD comporta la mort de la cèl·lula tumoral per letalitat sintètica^{62,63}. Aquest fenomen es caracteritza per produir la mort cel·lular quan hi ha una disrupció de dos processos a la vegada. En canvi, la inhibició de cadascun per separat no comporta la mort de la cèl·lula. En aquest cas en concret, la presència de mutacions en la via HR impedeix la funció d'aquesta, mentre que la inhibició farmacològica de PARP1 impedeix també la reparació de l'ADN per la via d'A-EJ. Pel fet que a la cèl·lula li manquen 2 mecanismes diferents de reparació, aquesta es mor. Això fa que els tumors amb HRD siguin especialment sensibles a inhibidors de PARP. Aquest descobriment ha comportat l'aprovació de diferents fàrmacs contra PARP1 en el context de HRD, com es detallarà més endavant.

2.2. Inducció de dany com a teràpia contra el càncer

Actualment, s'han descrit centenars de teràpies diferents per eliminar o reduir l'afectació del càncer en els pacients. Aquests tipus de teràpies depenen de les circumstàncies de cada cas, no només del tipus de tumor, sinó del seu estadi en el moment del diagnòstic, del seu perfil molecular, així com

de les circumstàncies pròpies de cada pacient, entre d'altres. Aquestes teràpies poden incloure des de la cirurgia, la radioteràpia o l'ús de fàrmacs (tant compostos químics com productes biològics).

Històricament, la inducció de dany a les cèl·lules tumorals ha estat una estratègia molt emprada⁶⁴. Com s'ha descrit anteriorment, molts tumors tenen algun tipus de deficiència alhora de reparar l'ADN. A més, a l'estar en constant divisió, encara són més sensibles a l'acumulació de dany, ja que a part d'haver de combatre el dany generat pel tractament, també han de suportar l'alt estrés replicatiu. Fins als anys 60, la cirurgia i la radioteràpia eren les estratègies més emprades. Les primeres experiències en l'ús de compostos químics com a teràpia contra el càncer es van dur a terme a mitjans dels 40 utilitzant el gas mostassa per tractar limfomes, ja conegut per les seves propietats alquilants⁶⁵. No va ser fins finals dels anys 50 que es va desenvolupar el primer compost inductor de dany per a càncers sòlids, el 5-fluorouracil (5-FU)⁶⁶. Des de llavors fins a l'actualitat s'han generat múltiples compostos que han augmentat l'eficàcia del tractament i l'esperança de vida dels pacients.

2.2.1. Radioteràpia

La radioteràpia es basa en l'ús de radiació ionitzant que promou diferents tipus de lesions (entre elles DSB) així com la producció de espècies reactives d'oxigen (ROS), que entre d'altres, també poden generar dany l'ADN. Tot i que el nombre de DSB és en nombre menor que altres tipus de lesions, la capacitat de la cèl·lula tumoral en reparar-les són les que acaben determinant la sensibilitat a la radioteràpia. S'ha descrit, que la pèrdua de funció de BRCA1 augmenta la sensibilitat a la radioteràpia^{67,68} així com la combinació amb inhibidors d'ATM en models preclínic⁶⁹⁻⁷¹. També s'ha observat que la inhibició de la via de NHEJ sensibilitza a la radiació⁷²⁻⁷⁴. En

canvi, l'ús d'inhibidors d'ATR no han resultat eficaços a causa del seu paper en resoldre dany a l'ADN derivat de l'estrès replicatiu^{75,76}. Tot i que el seu potencial citotòxic és menor, les lesions a nivell de bases nitrogenades són molt més abundants. La sobreexpressió de gens del sistema BER s'ha correlacionat amb la radioresistència en càncer de cèrvix i tumors de cèl·lules germinals^{77,78}. Atès al seu rol en l'A-EJ, així com en el BER, els inhibidors de PARP en combinació amb radioteràpia estan sent testats en assajos clínics⁷⁹. L'ús de la radioteràpia està molt estès en diferents tipus de càncer i es combina amb cirurgia, quimioteràpia o immunoteràpia en funció de cada cas⁸⁰.

2.2.2. Agents modificadors de l'ADN

L'ús de compostos químics que directament modifiquen l'ADN van establir les bases del desenvolupament de fàrmacs per tractar el càncer. Podem trobar diferents tipus de compostos que alteren l'ADN. Fàrmacs com la temozolomida promouen la metilació de l'ADN, mentre que d'altres com la ciclofosfamida (CPA) o els platins, promouen l'alquilació de l'ADN induint enllaços creuats entre els filaments d'ADN o entre diferents bases nitrogenades.

La majoria de les lesions produïdes per aquest tipus de tractament sol ser reparada pel sistema NER. S'ha observat que mutacions en ERCC1 o en proteïnes de la família de XP sensibilitzen al tractament amb platins⁸¹. Tot i això, altres sistemes de reparació es poden veure involucrats, sobretot si les lesions són complexes, com seria el cas de la formació d'enllaços entre les dues cadenes d'ADN on pot intervenir el sistema de HR. De fet, s'ha observat que mutacions en BRCA1/2 sensibilitzen el tractament amb platins^{82,83}.

La gran diversitat d'aquests compostos així com la seva eficàcia com a fàrmacs de primera línia ha fet que trobem molts tipus de tumors on s'utilitza aquest tipus de teràpia. Per exemple, la teràpia amb platins s'empra en tumors sòlids, com el testicular o el d'ovari⁸⁴; en canvi, la ciclofosfamida s'utilitza en tractar majoritàriament leucèmies, tot i que també té usos aprovats en càncer de mama o d'ovari⁸⁵.

2.2.3. Inhibidors de topoisomereses

Les topoisomereses són enzims encarregats de reduir les tensions produïdes per l'enrotllament de l'ADN sobre si mateix. Per reduir aquestes tensions, les topoisomereses poden tallar un filament (TOP I) o els dos filaments (TOP II), desfer aquests enrotllaments i tornar a unir el tall⁸⁶. La inhibició d'aquests enzims provoca que aquestes tensions s'acumulin, i que a causa del mecanisme d'acció d'aquests fàrmacs, continuïn units al filament d'ADN un cop han produït el tall i no el puguin reparar, acumulant talls de cadena simple com de doble cadena⁴.

Actualment hi ha una desena d'inhibidors de topoisomereses, que inhibeixen a diferents classes d'aquests enzims i són emprades en diferents tipus de càncer (Taula 1, adaptada de ⁸⁷). Addicionalment, s'ha descrit que els tumors amb HRD són més sensibles a l'ús d'inhibidors de topoisomereses⁸⁸, així com s'ha vist que l'ús d'inhibidors d'ATM o d'inhibidors de DNA-PKs augmenta la sensibilitat a aquest tipus de fàrmacs^{71,89,90}.

Taula 1: Inhibidors de topoisomereses.

Fàrmac	Tipus	Diana	Aplicació
Topotecan	Campto- tecines	Top IB	Càncer d'ovari metastàtic, de pulmó de cèl·lula petita resistent a platí, de cervix recurrent
Irinotecan			Càncer de colon
Belotecan			Càncer d'ovari i de pulmó de cèl·lula petita
Etopòsid	Epipodofilo-		Càncer de pulmó de cèl·lula petita, limfomes, d'ovari i testicular
Tenipòsid	toxines		Gliomes, càncer de bufeta, leucèmia limfocítica aguda infantil
Doxorubicina	Antra- ciclins	Top IIA	Càncer d'ovari, pulmó, gàstric, de tiroides, limfomes, sarcomes, etc.
Epirubicina			Càncer de mama avançat
Valrubicina			Càncer de bufeta
Mitoxantrona	Antracene- diones		Leucèmia aguda, limfomes, càncer de mama i de pròstata
Amsacrina	Acridines		Pacients amb leucèmia limfocítica aguda refractària i leucèmia mieloide aguda

2.2.4. Inhibidors de PARP (PARPi)

D'entre tots els tipus de teràpies dirigides contra proteïnes de reparació a l'ADN els inhibidors de PARP (PARPi) tenen un paper important en el marc d'aquesta tesi i per això es fa especial èmfasi. El primer PARPi,

l'Olaparib, es va aprovar a finals de 2014 tant per la FDA com per la EMA, i va suposar una millora substancial en el tractament del càncer d'ovari i de mama^{91,92}. Des de llavors s'han aprovat 3 fàrmacs més i s'han augmentat els usos pels quals es poden emprar^{93,94}. A més a més, aquests mateixos inhibidors es troben en assajos clínics en altres tipus de tumors^{60,95}. A més d'aquests hi ha altres PARPi que es troben en assajos clínics de fase 3, com el veliparib. En la taula 2 s'exposen els diferents tipus de PARPi i en quins escenaris es contempla el seu ús segons la FDA (data abril 2024).

La família de PARP consta de 17 membres però no tots tenen activitat PAR. De tota l'activitat PAR el 80% és produïda per PARP1, i el restant per PARP2^{96,97}. Com ja s'ha descrit en apartats anteriors i es pot observar en la taula 2, l'ús de PARPi està restringit a pacients amb mutacions en *BRCA1/2* o tenen HRD. Això és per l'elevada dependència que tenen els tumors HRD en els mecanismes de reparació on intervé PARP1 (principalment A-EJ). Quan PARP1 detecta el dany, s'uneix a la regió de l'ADN on es troba la lesió i allà utilitza el NAD⁺ per PARilar-se a ell mateix i altres proteïnes⁹. Aquestes modificacions tenen càrrega negativa, i això permet generar la repulsió suficient entre les càrregues negatives de l'ADN i PARP1 modificat per desvincular-se del punt de la lesió i permetre que se segueixi amb el procés de reparació⁹⁸.

Tots els PARPi amb aprovació per ús clínic tenen un mecanisme d'acció dual⁹⁹. Per una banda, competeixen amb el NAD⁺ per unir-se al centre actiu de l'enzim i impedir l'activitat PAR. Per l'altra banda, impedeixen la desvinculació de PARP1 de la cromatina, deixant a PARP1 atrapat a l'ADN. La suma d'aquests dos fets fa que, per una banda, el dany no es pugui seguir reparant, i per l'altra es sumi un estrès addicional, que és tenir les molècules de PARP1 atrapades a la cromatina.

Taula 2: Usos dels inhibidors de PARPi a la clínica

Inhibidor de PARP	Tipus de càncer	Caracterització molecular	Indicacions per l'administració
Olaparib	Càncer de mama	Mutacions germinals en BRCA1/2 i tumor HER2 negatiu	Adjuvència després de quimioteràpia
	Càncer d'ovari	Mutacions germinals o somàtiques en BRCA1/2	Adjuvència després de resposta completa o parcial a platí
		Tumor HRD	Adjuvència amb bevacizumab després de resposta completa o parcial a platí
	Càncer de pròstata	Mutacions BRCA1/2	en Amb abiraterona i prednisona quan el tumor ha metastatitzat i és resistent a castració
		Tumor HRD	Adjuvència quan el tumor ha metastatitzat i és resistent a castració
Càncer de pàncrees	Mutacions germinals en BRCA1/2	Adjuvència quan no hi ha progressió després de la primera línia amb platí	
Rucaparib	Càncer d'ovari	No s'especifica	Adjuvència en càncer recurrent amb resposta completa o parcial a platí
	Càncer de pròstata	Mutacions germinals o somàtiques en BRCA1/2	El tumor és metastàtic, resistent a castració i ja ha rebut antiandrògens en combinació amb un taxol.
Talazoparib	Càncer de mama	Mutacions germinals en BRCA1/2 i tumor HER2 negatiu	En casos on el tumor només ha envaït els teixits veïns
	Càncer de pròstata	Tumor HRD	Amb enzalutamida quan el tumor és metastàtic i resistent a la castració

Niraparib	Càncer d'ovari	Mutacions germinals BRCA1/2	Com manteniment en pacients on hi ha recaiguda però presenten una resposta completa o parcial a platí
		No s'especifica	Càncer avançat amb resposta completa o parcial a la primera línia de platí

2.3. Resistència a tractaments

La resistència a la teràpia és un dels grans problemes a l'hora de poder curar el càncer. A causa de l'elevada capacitat del tumor d'adaptar-se (per exemple, generant noves mutacions), en molts casos, el tractament redueix la massa tumoral, però no elimina per complet totes les cèl·lules canceroses, deixant les cèl·lules resistents^{34,35}. Això provoca que les supervivents tornin a proliferar i a generar noves masses tumorals. Aquestes noves masses tumorals, al tornar-se a enfrontar al mateix tractament, presenten mecanismes de protecció que limiten l'eficàcia d'aquests. Amb l'exposició consecutiva a un mateix tractament, el tumor s'acaba tornant completament resistent a la teràpia i es perd qualsevol efecte terapèutic. Per això, l'estudi de la resistència al tractament és de vital importància per millorar l'eficàcia d'aquests, així com permetre a pacients amb tumors resistents noves opcions terapèutiques, que promoguin la resensibilització a la teràpia, o aprofitin nous punts febles generats durant l'adaptació al fàrmac.

Tot i que els mecanismes de generació de resistència dependran de les característiques concretes de cada tumor, així com del fàrmac (o combinació de fàrmacs) al que es veu exposat, hi ha una sèrie de respostes que són compartides. Per exemple, l'expressió de bombes d'eflux de drogues,

pertanyents a la superfamília de transportadors ABC; així com la sobreactivació de vies de supervivència o antiapoptòtiques.

2.3.1. Mecanismes de resistència a PARPi

Tot i que l'aprovació dels primers usos dels PARPi va ser fa poc més de deu anys, ja hi ha múltiples estudis que descriuen mecanismes de resistència a aquests fàrmacs¹⁰⁰ (Fig 3). A més, l'estudi d'aquests mecanismes cada vegada guanya més rellevància degut a l'ampliació dels usos de PARPi, ja no només en diferents tipus de tumors, sinó en l'ús com a teràpia de primera línia. De fet, els primers estudis poblacionals demostren que el 50% de les pacients amb càncer d'ovari progressen mentre es troben en tractament amb PARPi¹⁰¹.

De tots els mecanismes que s'han descrit els més habituals són els relacionats amb la restauració de la recombinació homòloga. S'estima que el 25% de tots els casos de resistència a PARPi es deuen a l'aparició de segones mutacions que restauren completa o parcialment la funció de BRCA1/2¹⁰². També s'ha observat el mateix fenomen en pacients amb mutacions en altres gens de HR com *RAD51C* o *RAD51D*¹⁰³. També s'ha observat que pacients amb silenciaments epigenètics en gens de HR perden aquest silenciament a mesura que es veuen exposats a PARPi^{104,105}. Així mateix, s'han descrit mecanismes que impliquen la pèrdua de 53BP1, proteïna implicada en el sistema de NHEJ, i això promou la sobreactivació d'ATM, potenciant la formació dels loci de RAD51 tot i en l'absència de BRCA1^{106,107}. També, s'han observat altres mecanismes independents de la restauració de la HR. Per exemple, la pèrdua de funció de PARG, l'enzim que degrada les PAR, permetent la recuperació parcial de l'activitat PARP1, revertint la letalitat

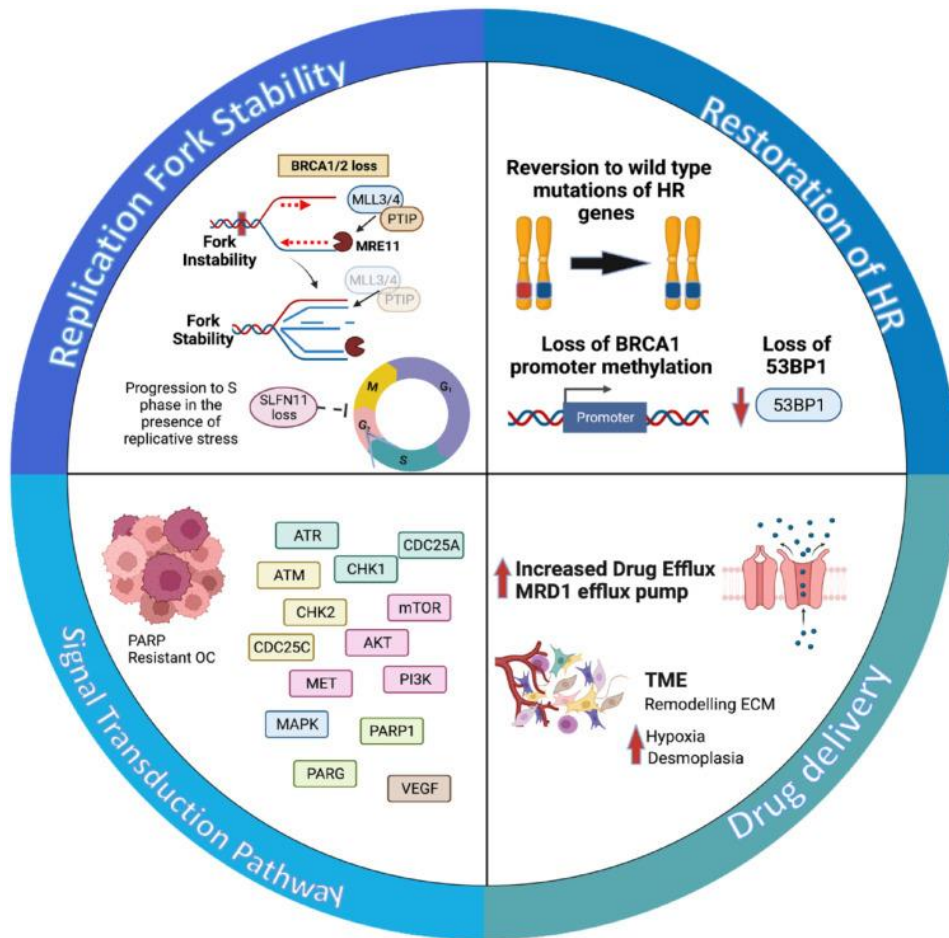


Figura 3: Principals mecanismes de resistència a inhibidors de PARP. Esquema obtingut de¹⁰⁰

sintètica¹⁰⁸. S'ha vist que la pèrdua de PARG correlaciona amb un nivell alt d'estrès replicatiu i promou una elevada dependència en l'eix d'ATR-CHK1-WEE1, augmentant la sensibilitat a inhibidors d'aquesta via^{109,110}. Vinculat també a l'estrès replicatiu s'han descrit que altres mecanismes de resistència promouen l'estabilitat de la forqueta de replicació. La inhibició del complex MRE11 s'ha descrit que augmenta l'estabilitat de la forqueta de replicació en cèl·lules amb mutacions en *BRCA1/2* i promou la resistència a PARPi¹¹¹.

Per altra banda, també s'han descrit mecanismes de sobre activació de vies de supervivència com la via de PI3K/AKT¹¹² així com de la sobre

activació de c-MET que modifica a PARP1 reduint així l'afinitat dels PARPi¹¹³. La sobreexpressió de MDR1, una proteïna vinculada a la resistència fàrmacs també ha estat descrita en pacients de càncer d'ovari tractades amb PARPi¹¹⁴.

2.3.2. Estratègies per superar la resistència a PARPi

Recentment, s'han suggerit diverses estratègies per prevenir o superar la resistència a PARPi. S'han proposat combinar PARPi amb quimioteràpia, com platins; amb inhibidors de vies de reparació a dany al DNA, com inhibidors de Pol θ ^{115,116}, de DNA-PK o ATR^{117,118} així com inhibidors de cicle cel·lular, com de CDK4/6¹¹⁹; o immunoteràpia¹²⁰, entre d'altres. L'eficàcia d'aquests estudis a nivell clínic actualment està sent testada, amb resultats desiguals en funció de la combinació emprada^{121,122}. Finalment, les noves generacions de PARPi en l'actualitat es troben en assajos clínics de fase I. Per una banda, són més selectius per PARP1, reduint la toxicitat associada a la inhibició de PARP2¹²³, i per l'altra, estan sent també testats en pacients que ja han estat tractades prèviament amb PARPi¹²⁴.

3. Metabolisme

El metabolisme són totes aquelles reaccions bioquímiques que succeeixen dins d'un organisme i tenen com a objectiu utilitzar uns metabòlits amb l'objectiu d'obtenir-ne d'altres, així com energia o poder reductor. Quan ens referim a energia, ens referim a l'acumulació d'energia química en forma d'ATP^{125,126} (o els seus anàlegs com el GTP), així com en determinats casos, en forma de gradient electroquímic o de calor. El poder reductor fa referència a la capacitat de la cèl·lula de dur a terme reaccions redox a partir dels electrons acumulats en el NADH (també en el NADPH o FADH₂)¹²⁷.

A grans trets podem distingir dos tipus de reaccions depenent de la funció que realitzin: les catabòliques i les anabòliques. Les reaccions catabòliques són aquelles destinades a la degradació de molècules per obtenir energia i poder reductor a partir dels enllaços químics de molècules complexes. Pel contrari, les anabòliques, empen energia i poder reductor per sintetitzar metabòlits més complexes¹²⁷. Per altra banda, les reaccions les podem classificar en reversibles i irreversibles. Les reversibles es caracteritzen en que el seu sentit és altament depenent a la concentració dels substrats. En canvi, les irreversibles són independents de la concentració de substrat o del producte i, per tant, només catalitzen la reacció en un sentit, fonamentalment com a conseqüència d'una caiguda important de potencial químic (reaccions altament exergòniques)¹²⁸. De manera general, en aquestes reaccions es formen enllaços fosfat, és a dir, on es forma ATP.

Una via metabòlica és la concatenació de reaccions concretes on el producte d'una és el substrat de la següent i és una de les principals maneres d'organització dels processos metabòlics fomentant la regulació independent de cada via i evitant l'aparició de cicles fútils. Aquest tipus d'organització permet a la cèl·lula un estalvi energètic important a l'hora de regular el metabolisme, ja que la regulació d'alguns nodes en particular permet regular el flux de tota la via. Normalment, els punts de regulació solen trobar-se en reaccions irreversibles a causa de la seva naturalesa unidireccional¹²⁸.

3.1. Metabolisme energètic

El metabolisme energètic són un grup de vies metabòliques principalment dedicades a l'obtenció d'energia i poder reductor. De totes maneres, són també emprades com vies intermediàries d'altres vies metabòliques, compartint metabòlits que són essencials per sintetitzar altres molècules indispensables per la cèl·lula.

3.1.1. Glicòlisi

La glicòlisi és la principal via del catabolisme dels glúcids¹²⁹ (Fig 4). És una via que permet l'oxidació dels substrats de manera molt ràpida i independent de l'oxigen. A més, és una via que genera una sèrie de metabòlits intermediaris que són imprescindibles per a la síntesi d'altres compostos essencials per la cèl·lula, com bases nitrogenades o alguns aminoàcids. De manera general, per cada glucosa que completa tota la via de la glicòlisi s'obtenen dos ATP, dues molècules de NADH i dues molècules de piruvat. Mentre que l'ATP serà utilitzat per suplir les demandes energètiques, tant el NADH com el piruvat seran emprats de manera diferencial en funció de la situació en que es trobi la cèl·lula¹²⁷.

Podem distingir dues fases de la glicòlisi, una primera fase preparatòria, on hi ha una despesa d'ATP, i una segona fase on la glucosa és trenca en dos i s'aconsegueix energia. La primera reacció de la glicòlisi es tracta de la conversió de la glucosa a glucosa-6-fosfat. Aquest primer pas és realitzat per les hexoquinases, essent en càncer la HK2 la més rellevant¹³⁰. Aquesta reacció és cabdal per mantenir l'import de la glucosa per part dels transportadors (GLUTs). La membrana plasmàtica no sol tenir transportadors de sucres fosforilats, i per tant un cop modificats no poden escapar de la cèl·lula¹³¹. En conseqüència, no es necessita més energia que l'emprada en aquesta reacció de fosforilació per retenir-los, permetent tenir una concentració intracel·lular de glucosa molt més elevada que l'extracel·lular.

Posteriorment, la glucosa-6P és isomeritzada a fructosa-6P per la fosfohexosa isomerasa. La següent reacció és una nova fosforilació en el carboni 1 de la fructosa, catalitzada per la fosfofructoquinasa-1, donant lloc a la fructosa 1,6-bisfosfat. Aquesta reacció es troba altament regulada, ja que mentre la glucosa-6P i la fructosa-6P poden derivar-se cap a altres vies, la

fructosa-1,6P ja només pot seguir la via glicolítica. La regulació d'aquest enzim és de manera al·lostèrica essent la fructosa 2,6-bisfosfat i la ràtio AMP/ATP els principals activadors al·lostèrics ¹³². L'enzim productor d'aquest metabòlit és la 6-fosfructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB), que és regulat a nivell transcripcional. No obstant també s'han descrit enzims com TIGAR⁴⁵ que són capaços de metabolitzar la fructosa 2,6-bisfosfat reduint així el flux glicolític. Pel que fa a la ràtio AMP/ATP és un dels mecanismes més estesos de regulació metabòlica. Quan una cèl·lula es troba en una situació d'escassetat energètica els nivells d'AMP augmenten mentre que els d'ATP decauen¹³³. En aquest cas s'activen diversos senyals d'alarma que potencien les vies catabòliques i inhibeixen les anabòliques. Més endavant s'exposaran els mecanismes de regulació del metabolisme de manera integrativa.

Seguidament, la fructosa 1,6-bisfosfat és trencada per l'aldolasa en dues molècules de tres carbonis: el gliceraldehid 3-fosfat i la dihidroxiacetona fosfat¹³⁴. En el cas de la dihidroxiacetona és isomeritzada en una reacció reversible a gliceraldehid 3-fosfat. Fins aquest punt és la fase preparatòria de la glicòlisi, i a partir d'ara s'entra en la fase d'obtenció d'energia. Primerament el gliceraldehid 3-fosfat serà oxidat donant lloc a 1,3-bisfosfoglicerat. En aquesta oxidació es redueix NAD^+ a NADH i s'incorpora un fosfat inorgànic. El proper pas, és la conversió de l'1,3-bisfosfoglicerat a 3-fosfoglicerat, donant lloc a una molècula d'ATP^{135,136}, la primera que s'obté en tota la glicòlisi. Després el 3-fosfoglicerat és convertit a 2-fosfoglicerat per una mutasa i posteriorment deshidratat per una enolasa, donant lloc al 2-fosfoenolpiruvat. L'últim pas de la glicòlisi és la transformació del 2-fosfoenolpiruvat en piruvat donant lloc a un altre ATP. Aquesta reacció està catalitzada per la piruvat quinasa, i és molt exergònica i irreversible en condicions fisiològiques. D'aquesta manera la cèl·lula s'assegura que no hi ha

marxa enrere en les altres reaccions de la via i promou la formació del piruvat. Això obliga la cèl·lula a activar altres vies (com la gluconeogènesi) en un escenari d'escassetat de glucosa per tal de superar aquesta reacció¹³⁷.

Un cop obtingut el piruvat, aquest pot ser utilitzat en diferents vies en funció del context cel·lular. En el marc d'aquesta tesi doctoral els destins més rellevants del piruvat són el de lactat, catalitzat per la lactat deshidrogenasa, i el d'acetil-CoA, catalitzat per la piruvat deshidrogenasa¹³⁸.

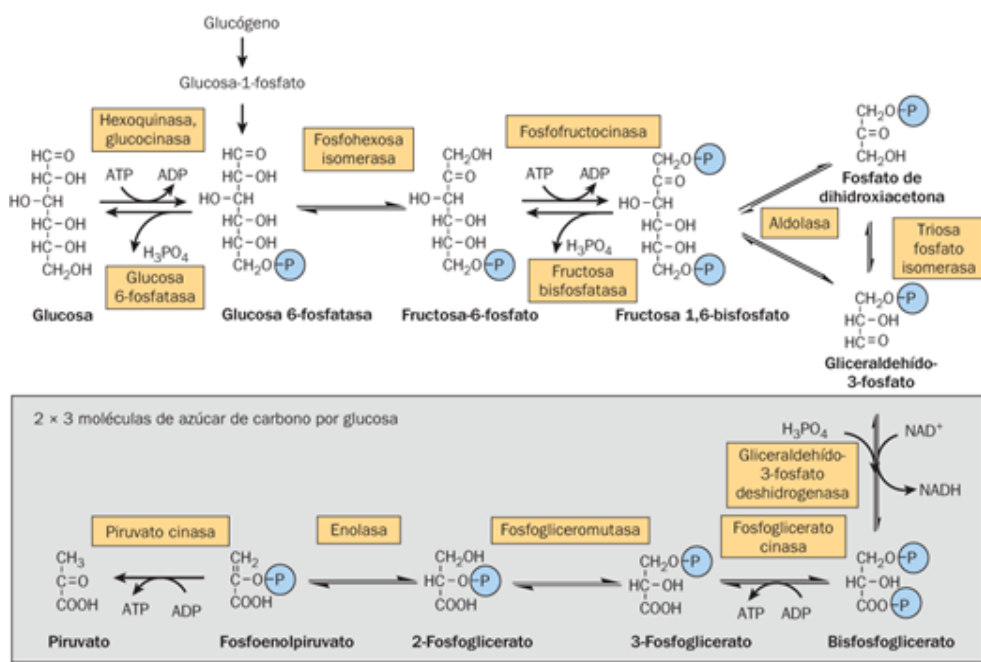


Figura 4: Esquema general de la via de la glicòlisi. Figura obtinguda de¹²⁹

3.1.2. Lactat deshidrogenasa (LDH)

La lactat deshidrogenasa (LDH) és l'enzim encarregat de transformar el piruvat a lactat consumint NADH. Posteriorment, aquest lactat és secretat fora de la cèl·lula pels transportadors de lactat (MCT1-4). Aquesta reacció, anomenada fermentació làctica, té un rol cabdal en situacions d'una alta demanda d'energia o d'hipòxia^{139,140}, ja que permet la reoxidació del NADH a NAD⁺, cosa que permet mantenir activa la glicòlisi independentment de

l'activitat mitocondrial. Cal remarcar que aquest procés permet obtenir ATP de manera molt ràpida a partir de glucosa, però és altament ineficient, perquè aquesta glucosa només s'oxida parcialment i es perd el poder reductor generat¹⁴¹. En el cas del càncer, com es descriurà més endavant, part de la reprogramació metabòlica passa per una sobreactivació de la fermentació làctica per potenciar la glicòlisi, permetent així la ràpida obtenció d'energia¹⁴².

3.1.3. Piruvat deshidrogenasa (PDH)

Fins ara totes les reaccions que s'han descrit del catabolisme de la glucosa es donaven en el citoplasma. La reacció catalitzada per la piruvat deshidrogenasa (PDH) és la primera reacció que es dona dins del mitocondri. El mitocondri és un orgànul que té una doble membrana, essent la interna una membrana molt impermeable. Per tant, per accedir a la matriu mitocondrial, cal que els metabòlits tinguin transportadors. Hi ha metabòlits, com el cas del piruvat, que tenen transportadors mitocondrials, però en altres casos, com en el de l'acetil-CoA o de l'oxalacetat, no existeixen¹⁴³. Aquest fet és important, ja que manipulant l'entrada dels diferents metabòlits dins el mitocondri es pot modificar l'activitat mitocondrial i l'estatus metabòlic.

La piruvat deshidrogenasa és un complex enzimàtic, compostat per 3 enzims, que converteixen el piruvat a acetil-CoA donant lloc també a un NADH. L'E1 és la piruvat deshidrogenasa, que descarboxila el grup carboxil del piruvat alliberant un CO_2 i l'uneix al fosfat de tiamina que actua com a grup prostètic a la vegada. L'E2 és la hidropoïl transacetilasa, que capta l'acetil utilitzant el seu corresponent grup prostètic, l'àcid lipoic, que alhora es redueix. Quan està en aquesta forma reduïda es transfereix el grup acetil al CoA, formant l'acetil-CoA. Per finalitzar la reacció L'E3, la hidropoïl deshidrogenasa, transmet els electrons captats per L'E2 a un NAD^+ , reduint-lo a NADH ^{144,145}.

La PDH està altament regulada, ja que és l'enzim que dirigeix al piruvat cap a les vies del metabolisme oxidatiu i és un dels principals punts de regulació del cicle de Krebs, puix és la productora del substrat d'aquest. Per una banda, té múltiples reguladors alostèrics positius, entre ells, el piruvat, la ràtio AMP/ATP o la de NAD^+/NADH , i d'altres negatius com, l'acetil-CoA, l'ATP i el $\text{NADH}^{144,146}$. Per altra banda, també té regulacions posttraduccionals. L'E1 té diversos llocs de fosforilació que regulen negativament la seva activitat, per tant, aquestes fosforilacions impedeixen la transformació del piruvat^{147,148}. Aquestes fosforilacions les duu a terme la piruvat deshidrogenasa quinasa, que consta de 4 isoformes diferents. Cada isoforma té una afinitat diferent per cada residu. Alhora, la fosforilació dels diferents residus té un efecte diferent en l'activitat de la PDH. Els tres residus de regulació són a la serina 232, la serina 293 i a la serina 300¹⁴⁹. Especialment rellevants són la serina 293, ja que és la fosforilació que correlaciona més amb l'activitat del complex¹⁵⁰⁻¹⁵², i la serina 232 que només pot ser fosforilada per la PDHK1¹⁵³. Les diferents PDHKs estan regulades transcripcionalment, per diferents factors de transcripció i en funció del context cel·lular s'expressarà una o una altra.

3.1.4. El cicle de Krebs

L'acetil-CoA un cop format, és utilitzat en el cicle de Krebs (Fig 5). El cicle de Krebs (també anomenat cicle dels àcids tricarboxílics (TCA), o cicle de l'àcid cítric)^{154,155}, és una via metabòlica que es duu a terme íntegrament dins el mitocondri. És fonamental, no només per la seva importància en la producció de poder reductor i energia, sinó també perquè el catabolisme dels aminoàcids, àcids grassos i glúcids convergeixen en aquest cicle¹⁵⁶. A més, consta de vàries reaccions anapleròtiques que permeten la formació de molts metabòlits intermediaris essencials per l'anabolisme de biomolècules¹⁵⁷ (Fig

6). Per cada cicle complet es generen 3 molècules de NADH, una de FADH₂ i una molècula de GTP¹²⁷.

La primera reacció del cicle és la condensació de l'oxalacetat amb l'acetil-CoA catalitzada per la citrat sintasa^{158,159}. És una reacció irreversible la qual uneix l'oxalacetat amb l'acetil-CoA formant citrat i alliberant el grup CoA. Aquesta reacció és altament exergònica, ja que el trencament de l'enllaç tioèster de l'acetil-CoA genera molta energia, cosa essencial per promoure la reacció, perquè les concentracions d'oxalacetat solen ser molt baixes. La citrat sintasa està regulada negativament tant per la ràtio ATP/ADP com de

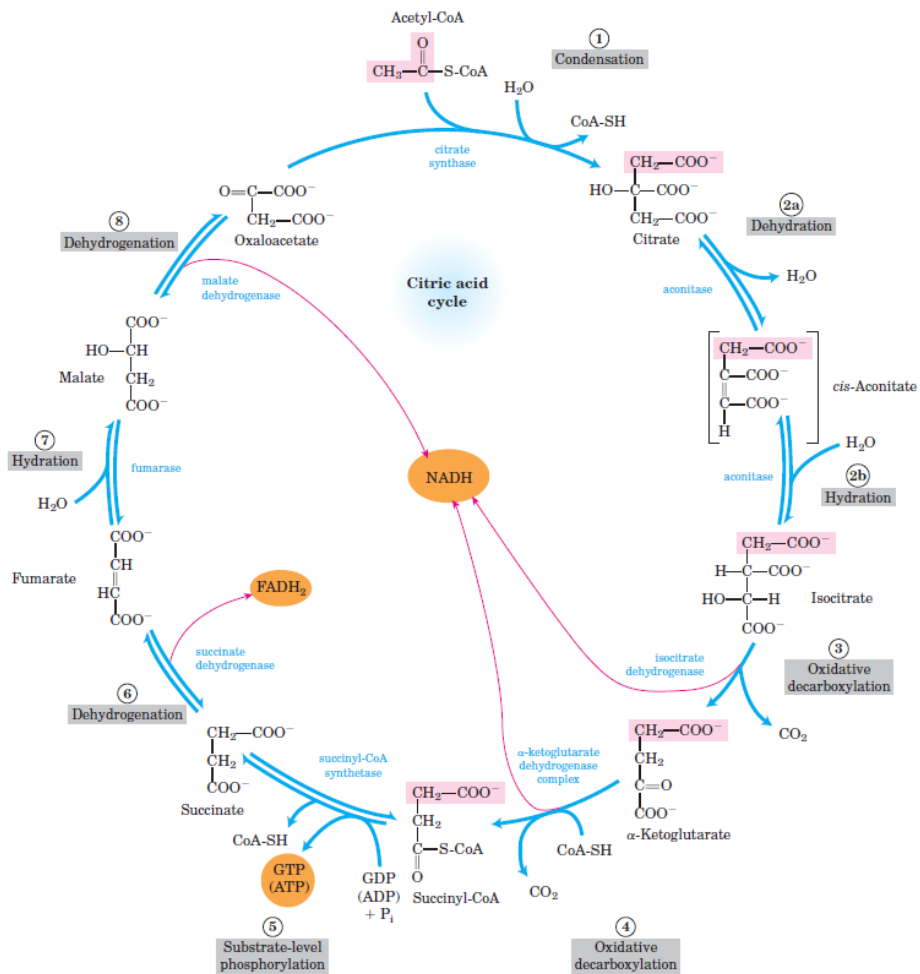


Figura 5: El cicle de Krebs. Figura obtinguda de ¹²⁷

NADH/NAD⁺, ja que són indicadors d'alts nivells energètics¹⁶⁰. En aquests casos el flux de carboni és derivat al citoplasma utilitzant la llançadora de citrat, que permet a través d'un seguit de reaccions exportar de manera neta acetil-CoA al citoplasma per poder promoure la síntesi d'àcids grassos¹⁶¹.

El següent pas del cicle és catalitzat per l'aconitasa, que transforma el citrat en isocitrat, i que seguidament és metabolitzat per la isocitrat deshidrogenasa. Aquesta reacció és irreversible i produeix una descarboxilació, produint un CO₂, i donant lloc a un NADH i una molècula d'alfa-cetoglutarat¹⁶². L'alfa-cetoglutarat és un dels altres principals punts d'entrada de carbonis dins el cicle de Krebs, ja que és format per múltiples reaccions anapleròtiques. La principal és catalitzada per la glutamat deshidrogenasa, que transforma el glutamat a alfa-cetoglutarat, eliminant un grup amino i produint un NADH. Aquesta reacció, a més, té un rol fonamental en la llançadora malat-aspartat com a redistribuïdora de grups amino entre l'aspartat/oxalacetat i el glutamat/alfa-cetoglutarat, que permet l'import de poder reductor citosòlic dins el mitocondri¹⁶³.

La reacció següent, és la conversió de l'alfa-cetoglutarat en succinil-CoA, catalitzat pel complex alfa-cetoglutarat deshidrogenasa, que és molt similar en estructura i funció a la PDH. En aquesta reacció irreversible, s'oxida l'alfa-cetoglutarat produint un succinil-CoA, un NADH i un CO₂¹⁶⁴. A partir d'aquí totes les reaccions del cicle de Krebs són reversibles i altament dependents de la concentració de substrats i productes, ja que el diferencial d'energia lliure és molt proper a 0¹²⁷. El següent pas és la transformació del succinil-CoA a succinat per la succinil-CoA sintetasa produint un GTP. La

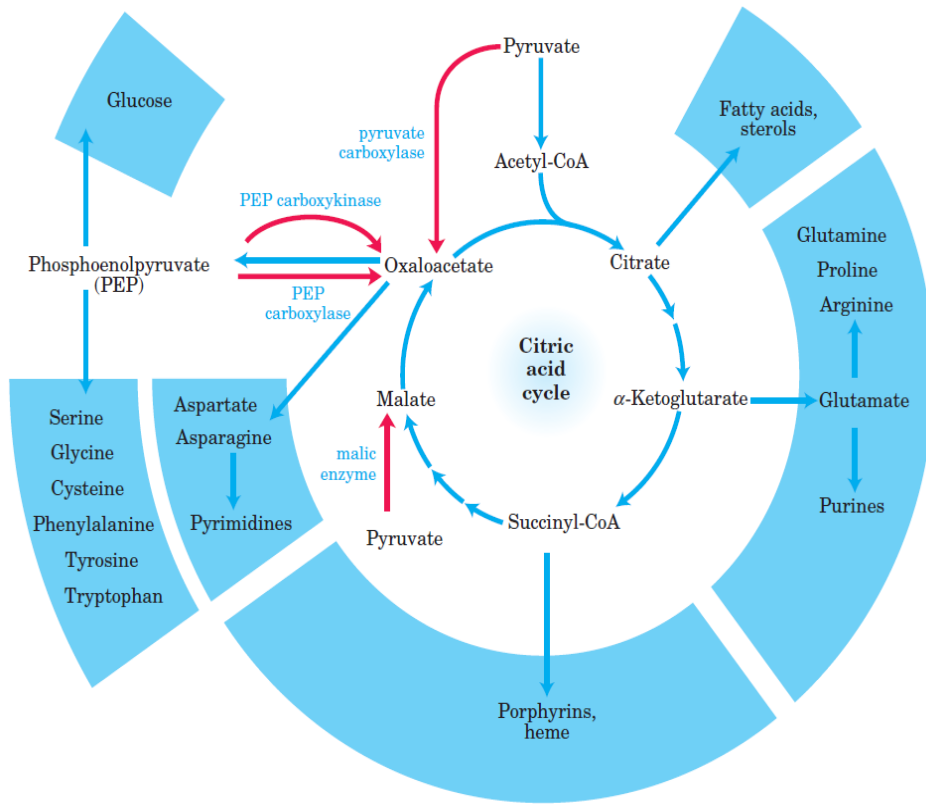


Figura 6: Rol del cicle de Krebs com productor d'intermediaris. Figura obtinguda de¹²⁷

succinat deshidrogenasa és l'encarregada d'oxidar el succinat a fumarat produint un FADH_2 ¹⁶⁵. Aquesta és l'única reacció del cicle de Krebs que no es dona en la matriu mitocondrial sinó en la cara interna de la membrana interna del mitocondri, ja que la succinat deshidrogenasa forma part del complex II de la cadena respiratòria, que serà introduïda més endavant. El fumarat serà hidratat per la fumarasa formant malat en una reacció reversible¹⁶⁶.

L'última reacció del cicle és la reconstitució de l'oxalacetat a partir de l'oxidació de malat, produint també un NADH , catalitzat per la malat deshidrogenasa¹⁶⁷. Perquè aquesta reacció tingui lloc cal que les

concentracions d'oxalacetat siguin extremadament baixes. Per això la concentració d'oxalacetat també determinarà el sentit de les reaccions del cicle de Krebs¹⁶⁸. L'oxalacetat pot reiniciar el cicle de Krebs formant de nou citrat condensant-se amb un acetil-CoA, però també és un punt de sortida de carbonis del cicle (Fig 6). Per una banda, pot rebre un grup amino i donar lloc a aspartat, un aminoàcid i precursor de la síntesi de bases pirimidíniques. També pot ser transformat en fosfoenolpiruvat per la PEP carboxiquinasa per iniciar la gluconeogènesi, la via antagònica a la glucòlisi, permetent la formació de glucosa a partir d'altres precursors. En altres la piruvat carboxilasa pot produir oxalacetat, a partir de piruvat i un CO₂ inorgànic consumint un ATP afavorint la oxidació completa de la glucosa

3.1.5. Cadena respiratòria

La cadena respiratòria és un conjunt de cinc complexos que es troben ancorats a la membrana interna del mitocondri (Fig 7). La seva funció és utilitzar el poder reductor format en les diferents vies catabòliques per generar un gradient de protons que s'acumuli a la cara externa d'aquesta membrana. Quan aquesta energia electroquímica acumulada és prou elevada es canalitza i s'usa per produir ATP de manera massiva en un procés anomenat fosforilació oxidativa^{169,170}.

Podem distingir quatre complexos associats al transport de protons i un complex formador d'ATP, anomenat ATP sintasa^{171,172}. Aquests complexos es van cedint els electrons dels uns als altres a través de molècules intermediàries¹⁷³ i es troben moltes vegades associats els uns als altres formant supercomplexos¹⁷⁴.

El complex I conegut també com a NADH:ubiquinona oxidoreductasa està compost per 42 subunitats diferents (entre elles NDUFV2, que serà de rellevància en aquesta tesi¹⁷⁵). Aquest és el complex més gran de la cadena

respiratòria i el que produeix el 40% de tot el potencial de membrana. Aquest complex s'encarrega d'oxidar el NADH a NAD^+ , cedint aquests electrons a la ubiquinona, que es transformarà en ubiquinol. Alhora, degut a aquest procés es poden translocar protons de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana¹⁷⁶.

El complex II és la succinat deshidrogenasa, mencionada prèviament en el cicle de Krebs. Aquest enzim apart d'oxidar el succinat per produir FADH_2 permet la transmissió d'aquests electrons a la ubiquinona que es reduirà a ubiquinol. Aquest és l'únic complex de la cadena respiratòria el qual no es intermembrana¹⁷⁷.

El complex III és la citocrom c reductasa i transfereix els electrons de l'ubiquinol al citocrom c, que es troba a l'espai intermembrana. Quan es dona

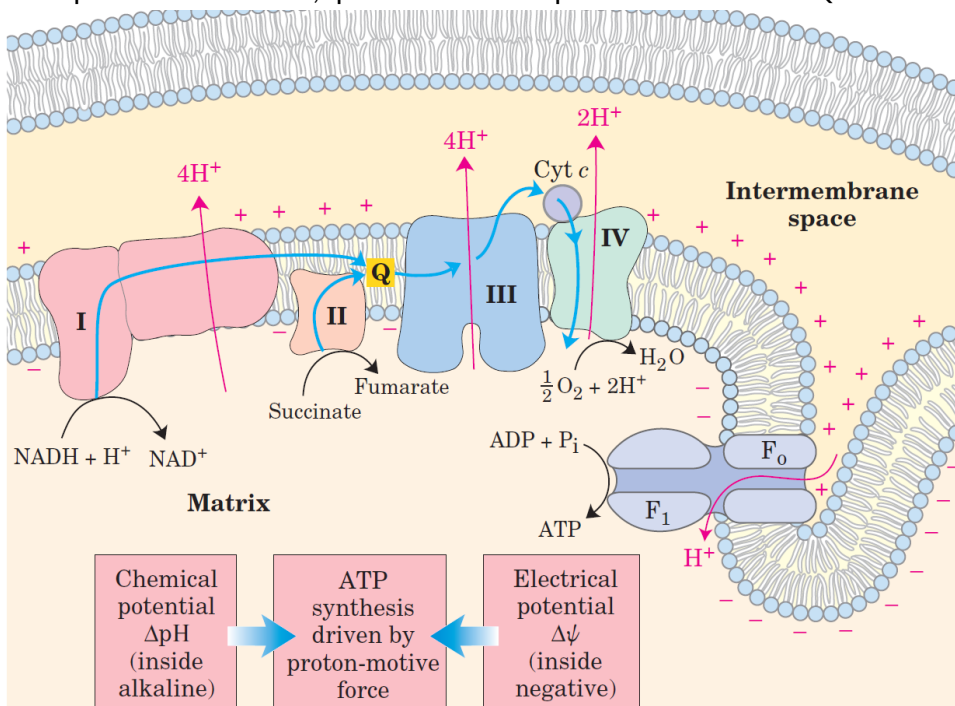


Figura 7: La cadena respiratòria a la membrana interna del mitocondri. Imatge obtinguda de¹²⁴

aquesta transferència també es transloquen protons de la matriu al complex intermembrana¹⁷⁸. El citocrom c és el responsable de transferir els electrons al complex IV, que és la citocrom c oxidasa, i s'encarrega de cedir els electrons al seu acceptor final, l'O₂ que es transformarà en H₂O. Aquest procés comporta la translocació de protons a la matriu intermembrana i el consum d'altres protons per formar les dues molècules de H₂O, promovent un potencial de membrana més elevat¹⁷⁹.

Tot aquest procés ha donat lloc a un gradient electroquímic que serà emprat pel complex V, l'ATP sintasa, per poder sintetitzar ATP a partir d'ADP i fosfat inorgànic¹⁷⁰. Aquesta síntesi es produeix aprofitant l'energia produïda per l'entrada dels protons a la matriu mitocondrial¹⁶⁹. El complex V té dos dominis funcionals, el F₀ que és intermembrana i el F₁ que es troba dins la matriu mitocondrial. El F₀ està format per diverses subunitats que formen el canal pel qual passen els protons i el F₁ consta d'altres subunitats que tenen activitat ATP sintasa¹⁸⁰. De manera breu, el flux de protons a través del domini F₀ provoca la rotació de les subunitats γ del domini F₁, promovent un canvi conformacional en la resta del domini F₁, que condueix a la formació d'ATP¹⁸¹. Aquest fenomen, de catàlisi mitjançant el gir s'anomena catàlisi rotacional¹⁸⁰.

Tot aquest procés que s'ha descrit depèn de la impermeabilitat de la membrana mitocondrial interna als protons. Per tant, la integritat de la membrana és cabdal per la supervivència de la cèl·lula, ja que si es veu compromesa, el gradient electroquímic es perd i, per tant, aquest sistema ja no serà funcional. És de tal importància que, per exemple, un dels senyals que promouen l'apoptosi cel·lular és a la presència del citocrom C en el citoplasma, senyal que els mitocondris estan danyats¹⁸². Tot i tenir una perfecta integritat pel que fa als protons, són comunes les filtracions d'electrons que provoquen l'aparició de espècies reactives d'oxigen (ROS).

Aquests radicals lliures són altament oxidants i la cèl·lula compta amb diversos sistemes antioxidants per degradar-los. A més, també juguen un paper com a molècules senyalitzadores, ja que poden activar diversos mecanismes de resposta (com el que depèn de NRF2) i poden condicionar el metabolisme. El rol dels ROS i NRF2 es descriurà més endavant.

3.1.6. Altres vies rellevants

Fins ara s'han descrit les vies catabòliques que són més rellevants en el context d'aquesta tesi. No obstant cal mencionar que aquestes vies descrites estan interconnectades amb d'altres que són també molt rellevants. Per donar una visió més ampla, ara es descriuran de manera breu una sèrie de vies que són essencials pel metabolisme cel·lular i posteriorment en altres apartats s'exposarà la seva rellevància en el context del metabolisme tumoral (Fig 8).

La beta-oxidació és la principal via del catabolisme dels àcids grassos. És una via que es duu a terme dins la matriu mitocondrial, i es basa en la segmentació dels àcids grassos de dos carbonis en dos carbonis, formant acetil-CoA, que serà després emprat en el cicle de Krebs. Un dels principals punts de regulació d'aquesta via és l'entrada dels àcids grassos dins la mitocòndria. L'entrada d'aquests es duu a terme pels transportadors anomenats carnitina palmitoil transferases (CPT), i és regulat negativament pel malonil-CoA, el substrat dedicat a la síntesi d'àcids grassos¹⁸³.

La glutaminòlisi és la degradació de la glutamina en glutamat. Posteriorment, el glutamat podrà ser desaminat i dona lloc a l'alfa-cetoglutarat. La glutamina és el principal aminoàcid en el plasma sanguini i és una font molt important de carbonis i de nitrogen per les cèl·lules, així com en el control dels ROS, ja que és essencial per la formació de glutatió¹⁸⁴, principal agent antioxidant de la cèl·lula. La transformació de glutamina a

glutamat és catalitzada per la glutaminasa dins el mitocondri. S'han descrit dos isoformes diferents de la glutaminasa, la renal i l'hepàtica i cadascuna té diferents variants de *splicing*, donant lloc a productes amb diferent activitat¹⁸⁵.

La via de les pentoses fosfat és una via emprada per obtenir diversos precursors, com la ribosa-5P, base per la síntesi de nucleòtids, i l'obtenció de poder reductor en forma de NADPH, vinculat a la síntesi d'àcids grassos i als sistemes antioxidants. Té lloc al citoplasma i s'inicia amb la glucosa-6P i

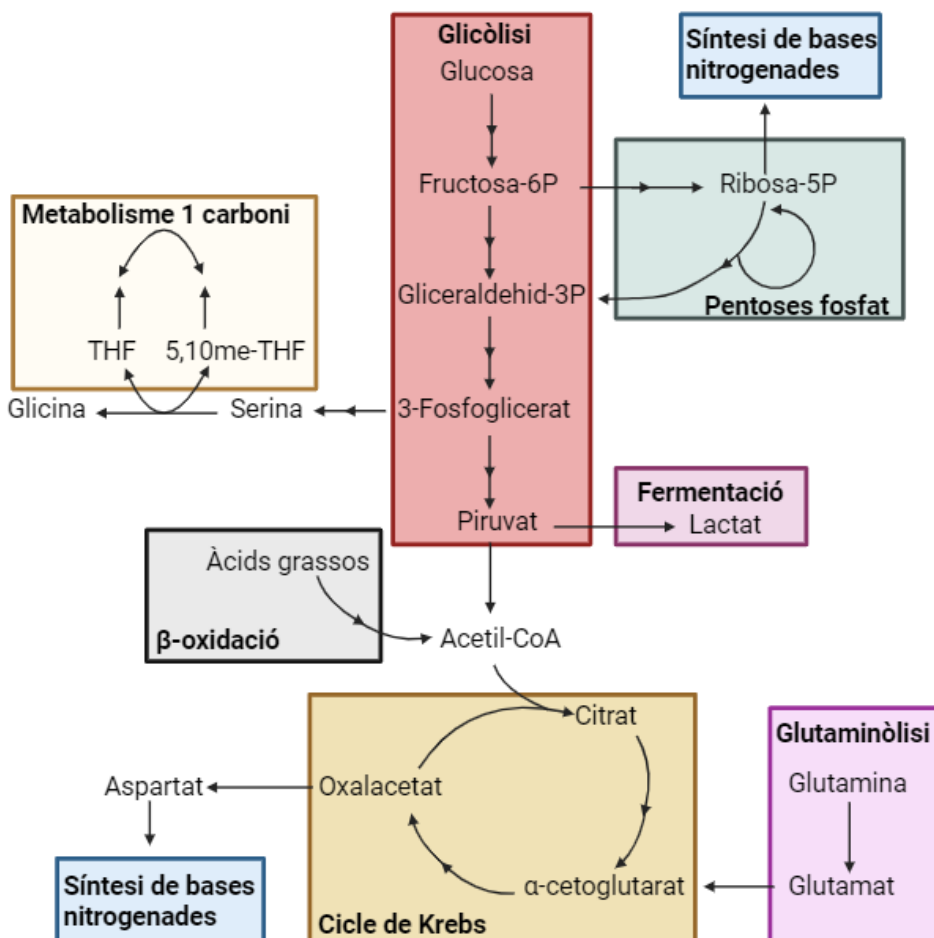


Figura 8: Interconnexions de les diferents vies metabòliques descrites. Font pròpia

consta d'una fase irreversible on s'oxida aquesta glucosa i una posterior fase reversible ramificada on s'obtenen els diferents precursors¹⁸⁶.

La síntesi de bases nitrogenades parteix de dos punts diferents en funció de si es sintetitzaran bases puríniques o bases pirimidíniques. Les puríniques es sintetitzen directament sobre la ribosa 5-fosfat consumint glicina i grups nitrogenats de la glutamina i de l'aspartat. En les bases pirimidíniques, primerament es sintetitza el seu anell, i posteriorment s'uneix a la ribosa 5-fosfat. A més, aquí directament la glutamina i l'aspartat s'utilitzen completament per la formació d'aquestes bases¹⁸⁷.

El metabolisme d'un carboni (*One-carbon metabolism*, en anglès) és un procés metabòlic que està mediat pel metabolisme del folat¹⁸⁸. Aquest conjunt de vies serveixen per activar i transferir grups d'un carboni per biosintetitzar bases nitrogenades, mantenir l'homeòstasi d'alguns aminoàcids (glicina, serina i metionina), per permetre modificacions epigenètiques així com regular la resposta antioxidant¹⁸⁹. En animals, el folat s'obté sempre a partir de la dieta, i és aquest el que donarà lloc a diferents derivats, com el tetrahidrofolat (THF) o el 5,10-metilentetrahidrofolat (5,10me-THF), que intervindran en les diferents vies biosintètiques.

3.1.7. Regulació integrativa del metabolisme energètic central

Com ja s'ha comentat amb anterioritat les diferents vies metabòliques han d'estar coordinades, ja que si no poden donar lloc a l'aparició de cicles fútils que només comporten un malbaratament energètic. Per això hi ha diferents mecanismes que la cèl·lula utilitza per regular el metabolisme a diferents nivells en funció del context cel·lular. La combinació dels diferents mecanismes atorga a la cèl·lula una capacitat d'adaptabilitat molt alta a estímuls i situacions molt diverses.

3.1.7.1. Al·losterisme

Un dels mecanismes el qual ja s'ha comentat és la regulació al·lostèrica, utilitzant metabòlits relacionats amb la via que ha de ser regulada. Aquest mecanisme es basa en la unió del regulador en una zona diferent del centre actiu de l'enzim, podent modificar igualment la seva activitat. Per exemple, l'acumulació de fructosa-6P promou la síntesi de fructosa 2,6-bisfosfat, que és el principal activador al·lostèric de la PFK1, l'enzim encarregat de metabolitzar la fructosa-6P per seguir amb la glicòlisi. També hi ha regulacions negatives, per exemple, quan la síntesi d'àcids grassos està activa, el metabòlit precursor (malonil-CoA) inhibeix els transportadors d'àcids grassos dins la mitocòndria per impedir la seva degradació.

3.1.7.2. Factors de transcripció

Un altre mecanisme essencial per la regulació integrada del metabolisme són els factors de transcripció. Els factors de transcripció són proteïnes que a l'activar-se poden promoure o inhibir l'expressió d'una sèrie de gens que estan relacionats amb un procés concret. Per tant, només amb la regulació d'un factor de transcripció s'està actuant de manera simultània en diferents punts, facilitant la resposta a un estímul. En el marc d'aquesta tesi són especialment rellevants dos factors de transcripció, HIF-1 i NRF2.

HIF-1 està relacionat amb la resposta en situació de manca d'oxigen (hipòxia)^{190,191}. Quan els nivells d'oxigen són normals HIF-1 α és hidroxilat¹⁹² i posteriorment ubiquitinitzat per la VHL i degradat via proteasoma¹⁹³. En canvi, quan els nivells d'oxigen són molt baixos aquesta hidroxilació no es dona, HIF-1 α pot dimeritzar amb HIF-1 β i fa la seva funció de factor de transcripció¹⁹⁴. Entre d'altres, HIF-1 α promou una reprogramació metabòlica inhibint tots els processos relacionats amb el metabolisme oxidatiu (inhibint

la PDH) i potencia el metabolisme anaeròbic, incrementant la glicòlisi i la fermentació (augmentant expressió de HK-2 i LDH¹⁹⁵).

NRF2 està relacionat amb la resposta a l'acumulació de ROS¹⁹⁶. Quan s'acumulen els ROS, aquests provoquen el trencament d'uns ponts disulfur de la proteïna KEAP1, la ubiquitina lligasa de NRF2¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Aquest trencament provoca un canvi conformacional que impedeix la funció de KEAP1, i per tant NRF2 no és degradat, podent dimeritzar amb les proteïnes MAF i actuar com a factor de transcripció²⁰⁰. NRF2 promou l'expressió de gens relacionats amb la degradació de ROS (com SOD i catalasa), activa la via de les pentoses fosfat (promovent l'expressió de G6PD) i l'expressió de gens relacionats amb la cadena respiratòria (com NDUFA4) i la integritat mitocondrial²⁰¹.

3.1.7.3. Proteïnes sensores de l'estatus metabòlic

Les ràtios de NADH/NAD⁺ i d'ATP/ADP són també reguladors del metabolisme energètic, ja que reflecteixen l'estatus energètic de la cèl·lula²⁰². Apart d'actuar com factors al·lostèrics modificant l'activitat d'alguns enzims poden activar-ne directament d'altres. L'AMPK (proteïna quinasa activada per AMP) és un enzim capaç de detectar la ràtio energètica cel·lular, i quan és baixa (per tant hi ha alta presència d'ADP i AMP), s'activa i comença a fosforilar diferents proteïnes per promoure el catabolisme. Per exemple, la fosforilació de l'AMPK a l'ACC (enzim clau en la síntesi d'àcids grassos) promou la seva inactivació²⁰³.

Un altre punt clau on actua l'AMPK, és a nivell del complex mTORC1, un altre sensor bioenergètic. mTORC1 és un complex proteic que promou l'anabolisme i el creixement cel·lular, i que es troba altament regulat per múltiples factors, tant a nivell de senyalització cel·lular com metabòlics. Per exemple, a nivell metabòlic, s'ha descrit que l'abundància de determinats

aminoàcids poden activar mTORC1²⁰⁴. Al seu torn, mTORC1 és capaç de modular l'activitat tant d'enzims concrets, com de factors de transcripció per promoure vies anabòliques vinculades a la síntesi de lípids, de nucleòtids i proteïnes. En cas d'escassetat energètica, AMPK és capaç de fosforilar i inactivar directament aquest complex, reprimint un munt de vies anabòliques només amb una modificació posttraduccional²⁰⁵.

També existeixen reguladors que depenen de la ràtio NAD/NADH. Les sirtuïnes són deacetilases que per dur a terme la seva funció depenen del consum de NAD⁺. En funció de la isoforma es troben en el nucli (SIRT1, 6 i 7), el citoplasma (SIRT2) o dins el mitocondri (SIRT3-5)²⁰⁶. Mitjançant la modificació posttraduccional dependent de NAD⁺ poden modular l'activitat enzimàtica d'alguns enzims, o actuar com a reguladors epigenètics per modificar l'expressió de determinats gens en funció de l'estatus energètic de la cèl·lula. Directament relacionades amb la regulació metabòlica s'han descrit 4 membres. La sirtuïna 1 s'ha vinculat amb la regulació del metabolisme dels lípids²⁰⁷ i en la resposta a dany a l'ADN²⁰⁸. La sirtuïna 3 s'ha descrit com a supressora de l'activitat de HIF-1 α ^{209,210}, mentre que la sirtuïna 4 s'ha descrit diferents funcions depenent del teixit²¹¹. Pel que fa a la sirtuïna 6 s'ha descrit com activadora de PARP1 en situacions d'estrès oxidatiu²¹², així com reguladora del metabolisme glicolític²¹³.

3.1.7.4. Senyals extracel·lulars

En el cas dels organismes pluricel·lulars no només cal una coordinació del metabolisme dins de cada cèl·lula, sinó de manera conjunta entre tots els teixits de l'organisme. Per això hi ha molècules senyalitzadores, com hormones o citoquines, que a l'unir-se als seus respectius receptors activen diferents vies de senyalització que poden modificar molts aspectes de la biologia de la cèl·lula, entre ells el metabolisme, per poder donar una resposta

unificada a un estrès que afecta a tot l'organisme (per exemple, en situació de dejuni). No és objectiu de la present tesi l'estudi del paper que aquestes senyals tenen en el metabolisme cel·lular, per això hom es restringeix a mencionar l'existència d'aquests mecanismes i la importància que tenen en la fisiologia d'un organisme.

3.2. Metabolisme del NAD⁺

El NAD⁺ és un dinucleòtid format per dos nucleòtids units pels seus enllaços fosfats, un AMP i un nucleòtid amb una nicotinamida. El NAD⁺ va ser primerament descrit com un element essencial pel metabolisme energètic²¹⁴, però també és essencial en altres processos, com per exemple s'ha descrit abans, en l'activitat de PARP1. Per tant, mantenir els nivells de NAD⁺ és essencial, i es poden modificar a partir de regular-ne la síntesi, el seu reciclatge a partir d'intermediaris, el seu consum i regulant els nivells de NADP⁺ i NADH²¹⁵ (Fig 9).

3.2.1. Vies de síntesi de NAD⁺

El NAD es pot sintetitzar de novo a partir de la via de la quinurenina o de la via de Preiss-Handler. La via de la quinurenina utilitza el triptòfan com a precursor. Un dels punts limitants d'aquesta via és en la formació de l'àcid quinolínic. El seu precursor, l'ACMS ha de ciclar de manera espontània a àcid quinolínic, però nivells alts de ACMSD poden disminuir el flux de triptòfan cap a NAD⁺ ja que aquest metabòlit és utilitzat per produir àcid picolínic. L'altre punt de regulació és la transformació de l'àcid quinolínic a NAMN, que és el primer precursor compromès únicament amb la síntesi de NAD⁺²¹⁵. És en aquest punt on es convergeix amb la via de Preiss-Handler. Aquesta via utilitza l'àcid nicotínic obtingut a partir de la dieta per sintetitzar NAMN a

causa de l'acció de NAPRT. El NAMN serà finalment modificat per un seguit d'enzims per donar lloc al NAD⁺²¹⁶.

Alternativament, es pot sintetitzar a partir del reciclatge de la nicotinamida (NAM), que és produïda a partir del consum del NAD⁺ per diversos enzims. Aquesta via és la utilitzada de manera preferent, ja que és molt més ràpida i requereix menys energia. La nicotinamida serà metabolitzada a nicotinamida mononucleòtid (NMN) per la NAMPT, la reacció limitant de la via, i posteriorment la NMNAT el transformarà a NAD⁺²¹⁷.

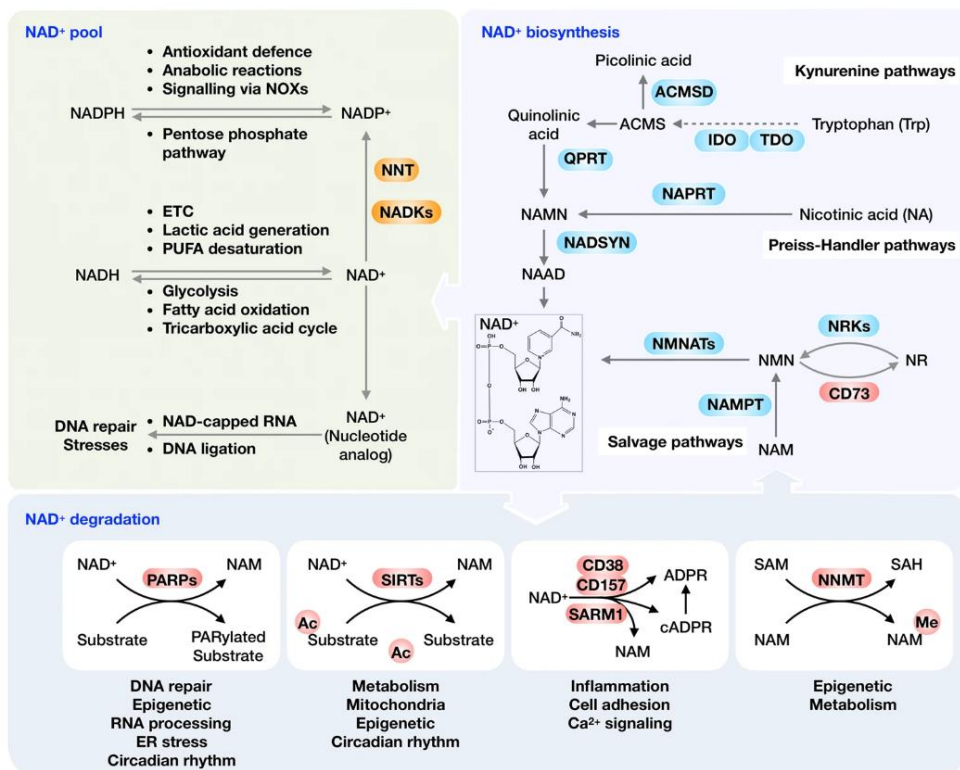


Figura 9: Metabolisme del NAD⁺. Figura obtinguda de ²¹⁵

3.2.2. Degradació i consum de NAD⁺

Hi ha 4 famílies d'enzims que consumeixen el NAD⁺ com a substrat i generen NAM i una ADP-ribosa com els productes de la reacció. Aquests són els PARP, les sirtuïnes, el CD38 i SARM1. Les famílies de sirtuïnes i de PARP ja han estat introduïdes prèviament, i hem pogut veure el seu rol com a sensors de l'estatus redox de la cèl·lula, o el seu paper en la reparació de l'ADN. El CD38 és una proteïna de membrana que metabolitza NAD⁺ extracel·lular generant ADPR i ADPR cíclica, i permet regular els fluxos de calci intracel·lular²¹⁸. Sobretot es troba expressat en cèl·lules immunitàries i té un rol immunoregulator, tot i que també s'ha descrit la seva expressió en teixits sòlids²¹⁹. SARM1 és una proteïna expressada en neurones i és un sensor de la ràtio NMN/NAD⁺. Quan s'activa, trenca el NAD⁺ residual en un cicle de retroalimentació positiva que acaba comportant la destrucció de l'axó²²⁰.

L'excés de NAM que no és reciclat a NAD⁺ és metabolitzat per la NNMT que metila al NAM que posteriorment serà excretat²¹⁵.

3.2.3. Regulació dels *pools* de NAD⁺

El NAD⁺ es pot trobar en la seva forma oxidada o en la seva forma reduïda, NADH. Com ja s'ha comentat, la cadena respiratòria així com la fermentació làctica, són les principals reaccions que permeten la reoxidació del NADH en NAD⁺. A més el sistema de llançadores, com la de malat-aspartat, permeten la importació del poder reductor del citoplasma al mitocondri, afavorint la regeneració del NAD⁺ citoplasmàtic¹⁶³. A la vegada, el NAD⁺ pot ser fosforilat per les NAD quinases, donant lloc a NADP⁺, i de manera inversa desfosforilat per les NADP⁺ fosfatases²²¹. Hi ha enzims, com la nicotinamida nucleòtid transhidrogenasa, que pot transferir el poder reductor del NADH al NADP⁺²²². El balanç d'aquestes reaccions com hem

vist condiciona no només l'estatus metabòlic de la cèl·lula, sinó altres funcions, com la reparació de l'ADN.

Diferents estudis han demostrat que la concentració de NAD^+ és diferent en funció del compartiment cel·lular^{223,224}. Aquestes diferències, es deuen en part a la via de reciclatge del NAD^+ . Mentre només hi ha una isoforma per la NAMPT i es troba en tots els compartiments cel·lulars, la NMNAT té tres isoformes, amb diferents afinitats pel NAD^+ , i cadascuna es troba en un compartiment diferent. La NMNAT1 es troba al nucli, la NMNAT2 al citoplasma i la NMNAT3 dins del mitocondri²¹⁷. Fins fa poc, s'havia assumit que els *pools* de NAD^+ mitocondrials i els citosòlics eren completament independents, ja que el NAD^+ no tenia cap transportador mitocondrial. Recentment, s'ha descrit el transportador SLC25A51 com un importador de NAD^+ ²²⁵ cap a dins del mitocondri i que és capaç de modificar els nivells de NAD^+ mitocondrials i citosòlics, influint en la regulació del metabolisme energètic^{226,227}.

3.3. Metabolisme dels ROS

Els ROS són un conjunt de substàncies derivades de l'oxigen molecular (com el peròxid d'hidrogen o els radicals superòxids) que apareixen de manera normal en els organismes de vida aeròbica, però poden veure's augmentats per fonts endògenes (per exemple degut a l'activitat de la cadena respiratòria²²⁸) o per fonts exògenes (exposició ambiental, fàrmacs, etc). Degut a la seva naturalesa química, són substàncies oxidants que reaccionaran amb les diferents biomolècules de la cèl·lula, modificant-les i alterant la seva funció, generant el que s'anomena estrès oxidatiu²²⁹.

Com s'ha anat mencionant al llarg de tota la introducció la regulació dels nivells de ROS, així com la capacitat de la cèl·lula en metabolitzar-los,

tenen un paper cabdal en la seva homeòstasi. Nivells baixos de ROS (del rang de 10-100nM) tenen una funció fisiològica intervenint en diferents processos cel·lulars²³⁰. Quan aquests nivells augmenten per sobre d'aquests límits els mateixos ROS actuen com a senyalitzadors activant diferents mecanismes antioxidants. Si els nivells no es redueixen, el dany produït pels ROS es pot acumular conduint a la mort cel·lular.

3.3.1. Mecanismes antioxidants

Les cèl·lules presenten diferents mecanismes antioxidants. Podem distingir mecanismes no enzimàtics i mecanismes enzimàtics. Els primers són substàncies sintetitzades o obtingudes per la dieta que actuen com a neutralitzadors d'aquests ROS. Entre d'elles destaquen diferents compostos d'origen vegetal com els carotens, o algunes vitamines (A, C i E); així com el glutatió²³¹. El glutatió és un tripètid compost de cisteïna, glutamat i glicina. En la seva síntesi intervenen primerament la glutamat-cisteïna lligasa, que uneix la cisteïna i el glutamat consumint un ATP; i després actua la GSH sintasa que hi afegeix la glicina, consumint un altre ATP. Quan el glutatió és oxidat dona lloc a GSSG, que pot ser reconvertit de nou a glutatió gràcies a la glutatió reductasa, consumint un NADPH¹⁸⁴. La regulació d'aquests enzims per factors de transcripció, com NRF2 descrit anteriorment, així com la disponibilitat de cisteïna són els factors més importants en la regulació de la síntesi de glutatió.

Els mecanismes antioxidants enzimàtics, són enzims especialitzats en la degradació d'aquests ROS. En funció del tipus de ROS actuarà un tipus d'enzim diferent, per exemple la superòxid dismutasa (SOD) és capaç de degradar els ions superòxid a peròxid d'hidrogen²³². El peròxid d'hidrogen, serà metabolitzat per la catalasa en aigua i oxigen molecular. Aquests enzims

es troben també sota control transcripcional de factors de transcripció vinculats a l'estrés oxidatiu, com NRF2²³³.

4. Metabolisme i càncer

Per poder cobrir totes les necessitats energètiques, una cèl·lula cancerosa reprograma el seu metabolisme per poder sostenir una taxa de divisió elevada en un ambient on hi ha una alta competència pels nutrients³⁴. Això fa que el metabolisme d'una cèl·lula transformada sigui molt diferent d'una cèl·lula normal. Tot i que en funció del tipus tumoral i del seu perfil mutacional trobarem diferents tipus de reprogramació metabòlica. De totes maneres alguns punts rellevants en la reprogramació del metabolisme és a nivell de la glicòlisi, de la metabolització de la glutamina, i en les vies del metabolisme dels folats²³⁴.

Otto Warburg va ser pioner a estudiar el metabolisme tumoral i va assentar les bases del camp a la dècada de 1920. Warburg va descriure que els tumors preferien la fermentació de la glucosa en lloc de la seva respiració, tot i estar en una situació de normòxia^{235,236}. Aquest mecanisme (anomenat efecte Warburg²³⁷) permet a les cèl·lules tumorals obtenir de manera molt ràpida grans quantitats d'energia¹⁴¹ a la vegada que intermediaris (per exemple per sintetitzar nucleòtids), per poder mantenir la seva proliferació²³⁸. De totes maneres, aquest mecanisme és altament ineficient, i produeix unes grans quantitats de lactat que la cèl·lula tumoral ha d'excretar. L'efecte Warburg, s'aconsegueix entre d'altres, per la sobreexpressió de transportadors de glucosa (GLUT1), així com de la LDH i els transportadors de lactat (MCT1 i 4)²³⁹. La supressió de p53 és un dels principals inductors del metabolisme glicolític, ja que per exemple p53 promou l'expressió de TIGAR, un potent inhibidor de l'activitat de la PFK1, degut a que elimina la fructosa 2,6-bisfosfat⁴⁵. A més, oncogens com RAS han estat descrits com a

potenciadors d'aquest metabolisme, ja que poden potenciar vies implicades en el consum de glucosa (com PI3K/AKT)²⁴⁰, directament l'expressió de gens glicolítics²⁴¹, o de factors de transcripció glicolítics, com HIF-1. De fet, diversos tipus tumorals presenten elevats nivells de HIF-1 α tot i trobar-se en normoxia, sigui per augment de la seva expressió o per mutacions en VHL (com el cas d'alguns tumors renals), i d'aquesta manera poden promoure aquest metabolisme glicolític²⁴².

Tot i l'efecte Warburg, això no implica que les cèl·lules tumorals no tinguin un actiu metabolisme oxidatiu. Com ja s'ha introduït, el cicle de Krebs és una gran font d'intermediaris que són necessaris per molts processos biosintètics. Una de les principals entrades de carboni dins el cicle de Krebs és a partir de la glutamina, que és metabolitzada fins alfa-cetoglutarat. De fet, des de la dècada dels 50 ja s'havia observat que la glutamina era un metabòlit molt consumit per les cèl·lules tumorals²⁴³. De fet, diversos tipus tumorals tenen sobreexpressat la GLS1, que catalitza la conversió de glutamina a glutamat¹⁸⁵. A més l'oncogen MYC, amplificat en molts tipus tumorals, ha estat descrit com un dels principals promotors de la glutaminòlisi en diversos tipus de tumors²⁴⁴. La glutamina és emprada principalment pel seu paper de donador de grups amino, en vies de biosíntesi de bases nitrogenades, així com els seus carbonis donen lloc a aspartat, base de la síntesi de pirimidines²⁴⁵.

El paper del metabolisme d'un carboni és essencial en càncer, ja que permet la biosíntesi de nucleòtids, regula la síntesi de metionina, contribueix a combatre l'estrès oxidatiu i intervé en els processos de modificació epigenètica¹⁸⁸. De fet, la quimioteràpia contra el metabolisme dels folats va ser el primer tipus de quimioteràpia selectiva utilitzada en el tractament del càncer²⁴⁶. Especialment, s'ha observat la sobreexpressió de la via de síntesi *de novo* de la serina així com la via mitocondrial del metabolisme d'un carboni

en diferents tipus de càncer²⁴⁷. Els carbonis de la serina serveixen per la síntesi de nucleòtids, i en diversos tumors s'ha descrit la ampliació de gens com PHGDH, clau en la síntesi d'aquest aminoàcid²⁴⁸. També s'ha descrit que NRF2 pot activar al factor de transcripció ATF4, que és un dels reguladors d'aquestes vies^{249,250}. Especialment, la via mitocondrial del metabolisme d'un carboni contribueix als mecanismes antioxidants de la cèl·lula, ja que intervé en la síntesi de glutatió²⁵¹.

4.1. Inhibidors del metabolisme en la clínica

L'ús inhibidors de vies metabòliques com a tractament antitumoral s'ha centrat clàssicament a bloquejar les vies de síntesi de nucleòtids. Més recentment, amb la millor caracterització metabòlica dels tumors, s'han desenvolupat altres inhibidors que tenen com a diana altres vies metabòliques, com per exemple la glicòlisi, el metabolisme oxidatiu o del catabolisme de glutamina.

4.1.1. Antimetabòlits

Els antifolats, com s'ha descrit anteriorment, van ser un dels primers grups de compostos emprats com antitumorals. A causa de la inhibició de la dihidrofolat reductasa, impedeixen la formació del tetrahidrofolat, cofactor de múltiples reaccions del metabolisme d'un carboni. Actualment, són emprats en el tractament de càncer de còlon²⁵², mesotelioma i càncer de pulmó entre d'altres^{253,254}. El bon funcionament dels antifolats va comportar el desenvolupament d'una classe sencera de fàrmacs anomenats antimetabòlits. Aquests fàrmacs es caracteritzen per tenir una estructura química semblant al substrat de l'enzim que es vol inhibir²⁵⁵. Alguns d'aquests exemples són els anàlegs de purines com la 6-mercaptapurina o la 6-tioguanina, que inhibeixen la PRPP amidotransferasa, enzim de la via de

síntesi *de novo* purines, i són emprats en el tractament de múltiples càncers²⁵⁶. Un altre fàrmac el qual és usat de manera habitual a la clínica, especialment en el càncer de còlon²⁵⁷, és el 5-fluorouracil, un anàleg de l'uracil. Aquest compost inhibeix la timidilat sintasa, enzim clau en la producció de timina, i per tant limita la disponibilitat d'aquest nucleòtid per la replicació⁶⁶. També trobem anàlegs de nucleòsids, com la gemcitabina, emprada per exemple en càncer de pàncrees, que poden ser incorporats a l'ADN per l'ADN polimerasa i un cop incorporats impedeixen la seva activitat²⁵⁸.

Totes aquestes teràpies es basen en l'alta demanda de nucleòtids de les cèl·lules tumorals per sustentar l'elevada proliferació. Tot i això, hi ha altres vies que són essencials per la proliferació tumoral. A més, aquestes teràpies tenen efectes secundaris importants, ja que també afecten cèl·lules no transformades que tenen proliferacions elevades²⁵⁹. Per això també s'han explorat altres vies metabòliques com a possibles dianes.

4.1.2. Inhibició del metabolisme glicolític

Una de les principals característiques del metabolisme tumoral és el seu elevat flux glicolític. Per això l'ús de diversos fàrmacs que inhibeixen la glicòlisi han estat testats com teràpies antitumorals. L'ús de la lonidamida, inhibidor de l'hexoquinasa, ha demostrat ser massa tòxica per ser utilitzada en assajos clínics²⁶⁰. Per altra banda, la 2-deoxiglucosa, que també inhibeix l'hexoquinasa, presenta efectes secundaris^{261,262} que han portat que no s'hagin continuat amb els assajos clínics²⁵⁹. Tot i això, un derivat, la fluorodeoxiglucosa, és emprada en el diagnòstic per escàners PET, ja que permet visualitzar tumors en els pacients i analitzar la resposta al tractament²⁶³. Una altre compost que ha donat bons resultats preclínic ha estat el 3-bromopiruvat, tot i que mai s'ha portat a assajos clínics, degut a

resultats contradictoris de *one case reports*^{264,265}. Finalment, els inhibidors dels transportadors de lactat també han estat contemplats. La inhibició de MCT1 amb AZD3965 ha demostrat ser ben tolerada en pacients amb càncer sòlids avançats i amb efectes antitumorals encara que només en aquells que tenen nivells alts de MCT1 i alhora nivells baixos de MCT4, un altre transportador de lactat²⁶⁶.

4.1.3. Inhibició del metabolisme oxidatiu

El metabolisme oxidatiu ha estat una de les dianes que en els últims anys ha despertat més interès a l'hora d'inhibir el creixement tumoral. Els bons resultats preclínic obtinguts en diferents tipus tumorals²⁶⁷, així com estudis epidemiològics que demostren l'efecte protector de la metformina en pacients diabètics que pateixen càncer^{268,269}, han fet que el metabolisme oxidatiu sigui una diana molt atractiva. La metformina és un inhibidor del complex I de la cadena respiratòria, que en la clínica s'utilitza de forma generalitzada per reduir la glucèmia en sang en pacients diabètics. Arran d'aquests estudis epidemiològics, diversos estudis han validat la seva eficàcia en reduir el creixement tumoral i la capacitat metastàtica en diferents tipus de càncer²⁷⁰⁻²⁷². A més, assajos clínics de fase I i II han observat un efecte protector de la metformina com a monoteràpia²⁷³ o en combinació amb quimioteràpia²⁷⁴ o radioteràpia²⁷⁵. Tot i això, hi ha altres assajos clínics que no han reportat aquests efectes protectors, així com la seva inespecificitat i el seu elevat tropisme hepàtic fa que l'ús d'aquest fàrmac com a teràpia antitumoral estigui encara en debat²⁷⁶. Per altra banda s'han dissenyat diferents inhibidors molt més selectius contra el complex I, entre ells IACS-10759. De manera semblant a la metformina, els estudis preclínic demostraven efectes antitumorals en diferents tipus de càncer. Tot i això, els dos assajos de fase I en pacients amb tumors sòlids avançats així com en leucèmia mieloide aguda, van reportar toxicitat inacceptable (acidosi làctica,

neuropaties perifèriques) en les dosis necessàries per l'acció del fàrmac²⁷⁷. A part del seu efecte antineoplàsic, altres estudis han optat per una altra estratègia per ampliar les aplicacions clíniques dels inhibidors del metabolisme oxidatiu. A causa del creixement descontrolat del tumor aquest presenta zones hipòxiques. Aquestes zones hipòxiques han estat relacionades amb la resistència a teràpies, com la radioteràpia²⁷⁸. Reduccions moderades del consum d'oxigen, per exemple utilitzant dosis baixes d'inhibidors de la cadena respiratòria, redueixen les zones hipòxiques del tumor, augmentant la radiosensitivitat. Això es degut a que al reduir parcialment el consum d'oxigen en algunes zones del tumor permet una millor distribució de l'oxigen, permetent que arribi les zones hipòxiques i es reoxigenin²⁷⁹. Per exemple, en pacients amb càncer de pulmó l'ús d'atovaquona, un inhibidor de la cadena respiratòria emprat com a antimalàric, va reduir l'efecte de la hipòxia incrementant la reoxigenació tumoral²⁸⁰ cosa que ha conduït a l'inici d'assajos clínics per valorar l'ús d'aquest fàrmac en combinació amb radioteràpia o quimioteràpia (NCT04648033 i NCT05136846).

Una de les principals funcions de la cadena respiratòria és regenerar el NAD⁺ a partir de l'oxidació del NADH. Com ja s'ha descrit anteriorment, els nivells de NAD⁺ són essencials per l'homeòstasi cel·lular, tant pel seu paper en la regulació metabòlica, com en el seu paper de substrat. L'ús d'inhibidors de NAMPT han estat eficaços per reduir el creixement tumoral en estudis preclínic^{281,282}, tot i que no s'han reportat beneficis com a monoteràpia^{283,284}. Actualment, la combinació d'inhibidors de NAMPT amb PARPi ha estat validada en estudis preclínic, cosa que obre la porta a iniciar assajos clínics^{285,286}.

Apart de la cadena respiratòria hi ha altres enzims del metabolisme oxidatiu que han aixecat interès com a potencials dianes terapèutiques. Els

tumors que presenten mutacions en la isocitrat deshidrogenasa (IDH), com algunes leucèmies o gliomes, representen un cas excepcional on un enzim metabòlic actua com a oncogen. Les mutacions en aquest enzim provoquen un canvi de funció promovent la formació de D-2-hidroxioglutarat, que s'acumula a les cèl·lules, promovent canvis epigenètics que promouen l'agressivitat del tumor^{287,288}. El desenvolupament d'inhibidors que tenen com a diana les isoformes mutades de l'IDH estan actualment en assajos clínics²⁵⁵. La pèrdua de la fumarat deshidrogenasa així com de la succinat deshidrogenasa ha estat relacionada amb l'aparició de tumors, especialment en casos familiars^{289,290}. La perdura de funció d'aquests enzims fa que aquests tumors tinguin unes vulnerabilitats concretes relacionades amb el metabolisme del grup hemo, cosa que els fa més sensible a inhibidors de l'hemo oxigenasa 1 (HMOX1)²⁹¹ així com els fa altament dependents de l'arginina, ja que degut a la acumulació de fumarat, provoca un canvi en el sentit de les reaccions del cicle de la urea, fent que es consumeixi arginina²⁹². L'ús d'enzims recombinants que degradin l'arginina han estat testats en aquest tipus de tumor, amb un benefici terapèutic limitat²⁹³⁻²⁹⁵.

4.1.4. Inhibició del catabolisme de la glutamina

Una de les altres dianes en la qual s'han desenvolupat múltiples inhibidors ha estat la glutaminasa. El BPTES és un inhibidor amb una afinitat molt més alta per la GLS1 que per la 2. En estudis preclínics s'ha vist que redueix el creixement tumoral de gliomes²⁹⁶ i de cèl·lules tumorals de càncer de mama²⁹⁷ reduint els nivells de glutamat i alfa-cetoglutarat, reduint els intermediaris del cicle de Krebs. Tot i que s'han observat limitacions a l'hora d'aplicar el BPTES a la clínica degut a la seva baixa estabilitat i solubilitat²⁹⁸, s'han generat derivats més estables i més potents, com el CB-839^{299,300}. Actualment, aquest fàrmac es troba en assajos clínics de fase II en càncer

renal de cèl·lula clara, i en fase I en diversos tipus de càncer inclouent melanoma, càncer de mama, de pulmó i colonorectal¹⁸⁵.

4.2. Plasticitat metabòlica

L'habilitat d'adaptació del tumor és un dels elements claus que permet la supervivència d'aquest, promovent que pugui metastatitzar així com generar resistències a les diferents teràpies. En aquest aspecte, el metabolisme no és una excepció, ja que les constants adaptacions metabòliques són essencials pel tumor.

Podem distingir dos processos d'adaptació metabòlica diferent, la flexibilitat metabòlica i la plasticitat metabòlica. La primera és l'habilitat del tumor per utilitzar diferents tipus de nutrients, mentre que la plasticitat metabòlica fa referència a la capacitat d'utilitzar el mateix nutrient de maneres diferents^{301,302}. Aquests processos estan limitats per les condicions de cada tumor, tant a nivell d'expressió gènica, com a nivell de la seva localització respecte a la font de nutrients, i dels nutrients que pot accedir. La limitació d'aquestes capacitats pot augmentar la resposta al tractament o reduir el potencial metastàtic del tumor³⁰³.

4.3. Relació entre el metabolisme i el dany al DNA

Aquesta tesi és la continuació de les investigacions publicades pel meu grup l'any 2020³⁰⁴ (Fig 10). En aquest article, es descrivia com els tumors amb problemes de recombinació homòloga presentaven un major consum d'oxigen comparat amb aquells que no tenien cap deficiència en HR. Això feia que fossin més sensibles a inhibidors de la cadena respiratòria. Es va observar que aquest major consum d'oxigen era a causa d'un canvi a causa de la plasticitat metabòlica dels tumors. Aquells tumors que presentaven o

se'ls induïa defectes en HR promovien l'entrada de piruvat provinent de la glucosa cap al cicle de Krebs. En canvi, els tumors sense deficiències, presentaven un metabolisme Warburg. Es va establir que un dels punts claus de regulació d'aquest canvi metabòlic era la regulació de l'activitat de la PDH. Aquest canvi metabòlic era degut al fet que els tumors amb HRD necessiten tenir grans quantitats d'ATP i elevats nivells de NAD^+ per sostenir l'activitat de PARP1. Per altra banda, es va observar que la regulació del metabolisme conferia sensibilitat o resistència a inhibidors de PARP. Bloquejar el metabolisme oxidatiu en cèl·lules HRD conferia més resistència a PARPi, mentre que promoure'l conferia més sensibilitat a PARPi.

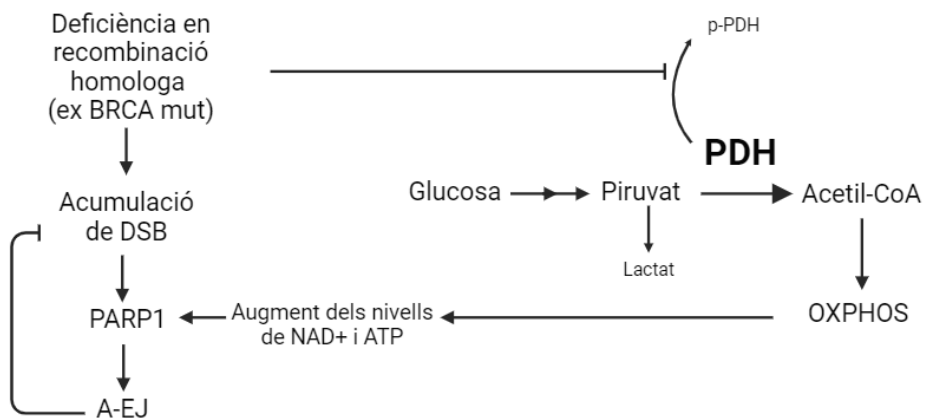


Figura 10: Els tumors amb HRD presenten un elevat metabolisme oxidatiu. Figura pròpia.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI 1

La plasticitat metabòlica té un paper en els mecanismes de resposta de dany a l'ADN.

OBJECTIUS 1

- Caracteritzar quina és la resposta metabòlica a la inducció aguda de dany a l'ADN.
- Descriure quins són els mecanismes moleculars implicats en la senyalització del dany a l'ADN i que comporten una modificació del metabolisme.
- Testar quins fàrmacs poden augmentar l'eficiència de la quimioteràpia utilitzant com a diana les vulnerabilitats metabòliques generades per la inducció de dany a l'ADN.

HIPÒTESI 2

La resposta a inhibidors de PARP es veu condicionada per l'estatus metabòlic del tumor.

OBJECTIUS 2

- Caracteritzar quin és l'estatus metabòlic en mostres de pacients que han rebut PARPi i descriure les diferències observades entre tumors que han respost al tractament i els que no han respost.
- Obtenir models cel·lulars amb HRD i resistents a PARPi, i descriure quins canvis metabòlics presenten comparant amb l'observat en les mostres de pacients.
- Descriure quins són els mecanismes metabòlics que modulen la resposta a PARPi.

- Dissenyar noves combinacions de fàrmacs que permetin la resensibilització a PARPi, *in-vitro* i *in-vivo*, a partir de la modificació del seu estatus metabòlic.

MATERIALS I MÈTODES

1. Anàlisi bioinformàtics

1.1. Anàlisi de l'expressió gènica de tumors del TCGA

Les dades d'expressió gènica així com les dades clíniques es van obtenir del The Cancer Genome Atlas (TCGA) (accedit 7 de gener de 2020). Les dades d'expressió gènica corresponen al nombre fragments per kilobase de transcrit per milió de lectures mapejades del quartil superior (FPKM-UQ) tal com estan processades i públicament dipositades pel TCGA. Els diferents valors de les signatures d'expressió o de les diferents firmes gèniques es van computar utilitzant l'algoritme de mostra simple GSEA (ssGSEA)³⁰⁵ calculat en el software GSVA amb els paràmetres estàndard (versio 1.43.1)³⁰⁶. El ssGSEA és una extensió de l'original GSEA en el qual les dades d'expressió dels RNA-seq poden ser emprades en analitzar el valor de les diferents signatures d'expressió per cada mostra individual. Les firmes emprades són les següents: gens associats específicament a la via de reparació A-EJ³⁰⁷, gens que codifiquen per components de la via OXPHOS, compilats del KEGG (n=132 gens)³⁰⁸; gens que codifiquen per components del complex I de la cadena respiratòria, compilats del terme 0045271 (n=15) del Gene Ontology (GO) cellular component³⁰⁹; gens codificant per la signatura MOOTHA_VOXPHOS (n = 87)³¹⁰; gens inclosos en els hallmarks de hipòxia i glicòlisi compilats de The Molecular Signature Database (MsigDB), i els gens que són regulats transcripcionalment per HIF-1, compilats a partir d'estudis d'unió dels factors de transcripció a la cromatina (n=314)³¹¹. El coeficient de Pearson (r) i el de Spearman (r_s) i la seva significança estadística han estat computats utilitzant la funció `cor` i `cor.test` del software R (versió 4.3.1).

1.2. Anàlisi de la resposta a fàrmacs de cèl·lules de càncer

La sensibilitat de les línies cel·lulars a dihidrorotenona es va obtenir de Genomics of Drug Sensitivity in Cancer project³¹², accedit el 9 de febrer de 2024. Es va descarregar l'anàlisi de microarray robust (RMA) normalitzat de cada línia cel·lular de la mateixa font³¹². La sensibilitat de les línies cel·lulars a oligomicina i a IACS-10759 així com les dades d'expressió gènica són públiques i corresponen al repositori de DepMap, accedit el 17 d'abril de 2024³¹³. Es va descarregar l'anàlisi de RMA normalitzat de cada línia cel·lular de la mateixa font. El valor de les diferents signatures es va calcular fent servir el mètode ssGSEA descrit prèviament i es van calcular la correlació (r_s) amb la concentració inhibidora 50 (IC50). El coeficient de Spearman (r_s) i la seva significança estadística han estat computats utilitzant la funció `cor` i `cor.test` del software R (versió 4.3.1).

1.3. Anàlisi de l'expressió gènica de tumors resistents a PARPi

L'ARN va ser obtingut de mostres de tumor primari preservades a -80°C . L'extracció va ser va dur a terme pel servei de Biobanc de l'IDIBELL utilitzant el kit *Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit* (Promega). Les mostres que complien els estàndards de quantitat i qualitat van ser enviades a MacroGen (Corea del Sud) per dur a terme el procés de RNASeq. Després de les corresponents anàlisis de qualitat, es van obtenir les dades d'expressió corresponents al nombre de fragments per kilobase de transcript per milió de lectures mapejades. Aquestes van ser les dades emprades per computar els diferents valors de les signatures d'expressió o de les diferents firmes gèniques recollides en MSigDB (C2P, canonical pathways), fent servir el software del GSEA³¹⁰.

2. Cultius cel·lulars

2.1. Línies cel·lulars

Les línies ID8-P i ID8-B van ser donades pel Dr. Iain McNeish (Imperial College, Londres, Regne Unit) i han estat caracteritzades prèviament³¹⁴. Les cèl·lules van ser cultivades en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; 25 mM glucosa, 1 mM piruvat, Biowest) suplementat amb 4% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina, ITS (5 µg/mL insulina, 5 µg/mL transferrina i 5 ng/mL selenit de sodi, Gibco) i antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomicina). Les SKOV3N van ser adquirides de Sigma-Aldrich. Es van cultivar en DMEM (25 mM glucosa, 1 mM piruvat, Biowest) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina i antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomicina). Les OVCAR4 van ser donades pel Dr. Hamilton (Fox Chase Cancer Center, Filadèlfia, Estats Units) i van ser cultivades en medi RPMI 1640 (Gibco) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina, antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomicina) i 0,25 U/mL d'insulina. Les cèl·lules A2780 van ser donades per la Dra. Josefa Giménez-Bonafé (Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya). Les cèl·lules van ser cultivades en RPMI 1640 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina i antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomicina). Les cèl·lules NP P53, 22Rv1 i DU145 van ser donades pel Dr. Alvaro Aytés (Programa ProCure, Institut Català d'Oncologia, l'Hospitalet de Llobregat, Espanya) i van ser cultivades en RPMI 1640 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina i antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomicina). Les cèl·lules T-47D van ser una donació del Dr. Miquel Àngel Pujana (Programa ProCure, Institut Català d'Oncologia, l'Hospitalet de Llobregat, Espanya). Van ser cultivades en RPMI

1640 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina i antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomina). Les cèl·lules KB2P3.4R3 van ser donades pel Dr. Jos Jonkers (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Països Baixos) i han estat prèviament caracteritzades³¹⁵. Es van cultivar en medi DMEM/F-12 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina, antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomina), 5 µg/mL d'insulina (Sigma-Aldrich), 5 ng/mL de factor de creixement epidèrmic (Sigma-Aldrich) i 5 ng/mL de toxina colèrica (Sigma-Aldrich). Les cèl·lules DMS53 i H520 van ser una donació de la Dra. Vanessa Soto (Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya). Les cèl·lules es van cultivar amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina i antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomina). Les cèl·lules SW900 van ser donades per la Dra. Cristina Muñoz-Pinedo (Oncobell Program, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Espanya). Es van cultivar en RPMI amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina i antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomina). Les cèl·lules HCT-15, SW620 i SU8686 van ser una donació del Dr. David Garcia-Molleví (ProCure Program, Institut Català d'Oncologia, Hospitalet de Llobregat, Espanya). Es van cultivar en DMEM/F-12 amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina i antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomina). Les cèl·lules RCC4 van ser una donació del Dr. Oriol Casanovas (ProCure Program, Institut Català d'Oncologia, Hospitalet de Llobregat, Espanya). Es van cultivar en RPMI amb 10% de sèrum fetal boví, 2 mM glutamina i antibiòtics (100 U/mL de penicil·lina i 0,1 mg/mL d'estreptomina).

Per a la generació de cèl·lules resistents a Olaparib es va procedir a cultivar les cèl·lules parentals amb una dosi equivalent a un quart de la IC50 d'Olaparib. Cada 4 dies es canviava el medi i es renovava la dosi d'Olaparib,

fins a un total de 3 vegades. Quan s'havien completat els 3 cicles i no s'observava mort, es doblava la dosi del fàrmac i es tornava a repetir el procés. La dosi màxima a què es van exposar les cèl·lules és 4 vegades la IC50 inicial.

2.2. Producció de lentivirus i infecció

Per a la producció de lentivirus es va sembrar 3 milions de cèl·lules 293 en una placa de 10 cm. L'endemà es va infectar amb 7,5 µg de pSPAX (Addgene, plasmidi # 12260), 5 µg de pVSV-G (Addgene, plasmidi # 8454), i 10 µg del plasmidi d'interès, dissolts en un volum final de 500 µL d'Optimem (Gibco). Es va barrejar 1:1 amb una solució de polietilenimida (Sigma) en Optimem seguint les instruccions del fabricant, i es va incubar a temperatura ambient durant 30 minuts. Seguidament, es va afegir 1 mL de transfecció en la placa amb les cèl·lules 293 barrejat amb 9 mL de DMEM basal durant 7 hores. Després el medi es va canviar per DMEM 1% de sèrum durant dos dies.

Es van plantar 200.000 cèl·lules d'interès per pou de placa de 6 pous. Es va filtrar el sobrenedant de les cèl·lules productores de lentivirus. Per cada pou de 6 es va barrejar 1mL del sobrenedant filtrat amb 150 µL de DMEM 10% sèrum i 2 µL de polibrè. Aquesta barreja es va afegir al pou amb les cèl·lules i es va centrifugar la placa 90 minuts a 1000g a 32°C. A l'endemà, es va començar la selecció. La validació es va dur a terme per Western Blot.

Les cèl·lules ID8-P53 es van infectar utilitzant la tecnologia CRISPR/CAS9, amb un vector control (plenti) o un vector contra *Bach1* amb el següent gRNA 5' GCGGTTCCGAGCCCACCGCT 3' (Crispr 4) i seleccionat amb Bleomicina (10ug/mL, Merck). Les cèl·lules ID8-P, ID8-B i ID8-B-RO es van infectar, utilitzant la tecnologia shRNA amb un vector que contenia un

shRNA control o un vector amb un shRNA contra el gen *Hif1a* (Horizon Discovery, UK) (5' AACTGGAAATCATCATCCA 3'). La selecció es va dur a terme per citometria de flux seleccionant les cèl·lules positives per GFP. Les cèl·lules ID8-P i ID8-B es van infectar, utilitzant la tecnologia shRNA amb un vector que contenia un shRNA control o un vector amb un shRNA contra el gen *Nfe2l2* (Horizon Discovery, UK) (5' CCCGAATTACAGTGTCTTAAT 3'). La selecció es va dur a terme per citometria de flux seleccionant les cèl·lules positives per TdTomato. Les cèl·lules SKOV3N amb el KO per *BRCA2* es van generar i descriure prèviament³⁰⁴.

Per la producció de la línia ID8-BRCA-HRE es van infectar les cèl·lules primer amb el vector DGM10, que conté la Cre recombinasa sota el control dels HRE i van ser seleccionades amb 1mg/mL de G418. Un cop obtinguda la línia amb aquest vector, es va tornar a infectar amb el vector DGM216, que conté la construcció amb el RFP flanquejat amb els dos llocs LoxP seguit del gen de la GFP. Aquestes cèl·lules van ser seleccionades per citometria de flux, escollint les cèl·lules negatives per GFP i positives per RFP. Ambdós plasmidis han estat generats i descrits prèviament³¹⁶.

3. Tècniques d'anàlisi molecular

3.1. PCR quantitativa

L'extracció d'ARN es va dur a terme utilitzant el reactiu TRIzol (ThermoFischer Scientific), d'acord amb les instruccions del fabricant. El cDNA es va obtenir utilitzant una reacció de transcriptasa inversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems, Life Technologies, CA). La PCR quantitativa a partir de cDNA es va dur a terme en un Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals) utilitzant Sybr Green (Roche Molecular Biochemicals) d'acord amb les instruccions del fabricant.

Taula 3: Encebadors emprats per qPCR

Gen	Encebador Directe (5' a 3')	Encebador Invers (5' a 3')	Espècie
<i>ACTA1</i>	GAGGCAGCCAGGGCTTA	AACTAAGGTGTGCACTTTTGTCCAACCT	Humà
<i>BACH1</i>	TTACAACGCGTGGGCAAAAC	CGCGTAAGAAAAGCCGAGTT	Humà
<i>COX5A</i>	ATCCAGTCAGTTCGCTGCTAT	CCAGGCATCTATATCTGGCTTG	Humà
<i>CPT1A</i>	ATCAATCGGACTCTGGAAA	TCAGGGAGTAGCGCATGGT	Humà
<i>HIF1A</i>	AGCTCCTCCAAACTTGCTC	TGAGGTTTCTTCGGCTACGTT	Humà
<i>HK2</i>	TTGACCAGGAGATTGACATGG	CAACCGCATCAGGACCTCA	Humà
<i>IDH3A</i>	CCC GCGTGGATCTCTAAGG	AATTTCTGGGCCAATACCATCTC	Humà
<i>NDUFB1</i>	GTCCCTATGGGATTTGTCATTGG	CAGTTAGCCGTTTCACTACTCTT	Humà
<i>NFE2L2</i>	GGCTGTGTCGACTGAGGAAA	ACCTATGACCTGCTTGGTGC	Humà
<i>PARP1</i>	CGGAGTCTTCGGATAAGCTCT	TTCCATCAAACATGGGCGAC	Humà
<i>PDHA</i>	TGGTAGCATCCCCTAATTTTGC	ATTCGGCGTACAGTCTGCATC	Humà
<i>PDHB</i>	GCAGCAGTGTCTCTAAAGAAGG	CCAGGAAATTGAACGCAGGAC	Humà
<i>PDK1</i>	CTGTGATACGGATCAGAAACCG	TCCACCAAACAATAAAGAGTGCT	Humà
<i>PDK2</i>	ATGAAAGAGATCAACCTGCTTCC	GGCTCTGGACATACCAGCTC	Humà
<i>PDK3</i>	CTGAAGCCGATGATTGGAGC	TCCTGGAACAGTGAGTGGGAC	Humà
<i>PDK4</i>	TGCCTGTACAGTTGACCCAG	CCAATGTGGCTTGGGTTTCC	Humà
<i>POLQ</i>	ACTTTTGCTGACCAAGATTTGCT	ACTCATGCCAACGATTTGCAC	Humà
<i>SDHD</i>	CATCTCTCCACTGGACTAGCG	TCCATCGCAGAGCAAGGATTC	Humà
<i>Acta1</i>	GGGGGTTGAGGTGTTGAG	GTCTCAAGTCAGTGTACAGGC	Ratolí
<i>Bach1</i>	TGAGTGAGAGTGCGGTATTTGC	GTCAGTCTGGCCTACGATTCT	Ratolí
<i>Bnip3</i>	TCCTGGGTAGAACTGCACTTC	GCTGGGCATCCAACAGTATT	Ratolí
<i>Cox5a</i>	GCCGCTGTCTGTTCCATTC	GCATCAATGTCTGGCTTGTGAA	Ratolí
<i>Cpt1a</i>	CTCCGCTGAGCCATGAAG	CACCAGTGATGATGCCATTCT	Ratolí
<i>Hif1a</i>	GTCCCAGCTACGAAGTTACAGC	CAGTGCAGGATACACAAGGTTT	Ratolí
<i>Hk2</i>	TGATCGCCTGCTTATTCACGG	AACCGCCTAGAAATCTCCAGA	Ratolí
<i>ldh3a</i>	ACAGGTGACAAGAGGTTTT	CTCCCACTGAATAGGTGCTT	Ratolí
<i>Ldha</i>	GGGGCTACAAGCATCTTGAGAG	GACACGTTGCACCTGACTG	Ratolí
<i>Ndufb1</i>	CCTCCAGGGCTGTAATCGC	GGTTCTTCGCGTAGACGTTTTT	Ratolí
<i>Nfe2l2</i>	TAGATGACCATGAGTCGCTTGC	GCCAACTTGCTCCATGTCC	Ratolí
<i>Nqo1</i>	AGGATGGGAGGTAATCGAATC	AGGCGTCCTTCTTATATGCTA	Ratolí
<i>Parp1</i>	CTCTGTACTTTGAAAACCACCGT	GCTCAGTCGGACACCATGTA	Ratolí

<i>Pdha</i>	GAAATGTGACCTTCATCGGCT	TGATCCGCCTTTAGCTCCATC	Ratolí
<i>Pdhb</i>	AGGAGGGAATTGAATGTGAGGT	ACTGGCTTCTATGGCTTCGAT	Ratolí
<i>Pdk1</i>	GGACTIONCGGGTCAGTGAATGC	TCCTGAGAAGATTGTCGGGGA	Ratolí
<i>Pdk2</i>	AGGGGCACCCAAGTACATC	TGCCGGAGGAAAGRGAATGAC	Ratolí
<i>Pdk3</i>	TCCTGGACTTCGGAAGGGATA	GAAGGGCGGTTCAACAAGTTA	Ratolí
<i>Pdk4</i>	AGGGAGGTGCGAGCTGTTCTC	GGAGTGTTCACTAAGCGGTC	Ratolí
<i>Polq</i>	TCTTGCCAGAGCTGATAGTGCG	GCAGATAAGCCCTTGCCAGTCA	Ratolí
<i>Sdhd</i>	TGGTCAGACCCGCTTATGTG	GGTCCAGTGGAGAGATGCAG	Ratolí

3.2. Western Blot

L'extracció de proteïnes es va dur a terme utilitzant RIPA Buffer (PBS pH 7,4, SDS 0,1%, NP-40 1%, deoxicolat sòdic 0,5%) amb inhibidors de proteases i fosfatases (100µM PMSF, 1µM pepstatina A, 1 µg/mL leupeptina, 4 µg/mL aprotinina, 0,1 µg/mL benzamidina, 200 µM ortovanadat sòdic, 10 mM NaF, 40 mM β-glicerol fosfat i 5 mM EDTA). El material insoluble va ser eliminat per centrifugació a 8000g per 15 minuts a 4 graus. Es van utilitzar gels SDS/PAGE per separar les proteïnes per pes molecular i després es van transferir a membranes d' Immobilon-P en buffer de transferència (25 mM Tris-HCl, 190 mM glicina i 10% metanol) a 4°C durant 90 minuts. Posteriorment les membranes es van bloquejar durant una hora a temperatura ambient en TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) 5% llet en pols sense greixos. Posteriorment, les membranes es van incubar amb els corresponents anticossos en TBS-1% llet tota la nit a 4°C. Després de 3 rentats en TBS 0,1% Tritó 100X, les membranes van ser incubades respectivament, amb anticossos secundaris contra conill o ratolí (Amersham Pharmacia Biotech) conjugats amb peroxidasa de rave, en TBS 1% llet per una hora a temperatura ambient. Seguidament, les membranes es van rentar tres vegades amb TBS 0,1% Tritó 100X i finalment revelades utilitzant ECL

Prime (Amersham Pharmacia Biotech). El senyal va ser mesurada amb un instrument ChemiDoc-MP (Bio-rad) i l'anàlisi quantitativa es va dur a terme utilitzant el software Image Lab (Bio-rad).

Taula 4: Anticossos emprats per Western Blot

Proteïna	Dilució	Espècie	Referència
Actina	1:2500	Ratolí	Sigma Aldrich AC-15 A5441
BACH-1	1:1000	Ratolí	Santa Cruz Biotech sc-271211
GLUT-1	1:1000	Conill	Abcam, ab115730
HIF-1 α	1:500	Conill	Descrit en ³¹⁷
NRF2	1:500	Conill	Cell Signaling #12721
PDHK1	1:1000	Conill	Cell Signaling #3820
PDHK4	1:1000	Conill	Novus Biologicals #NBP1-07049
PDH-T	1:1000	Conill	Cell Signaling #3205
p-PDH Ser232	1:1000	Conill	Sigma-Aldrich (AP1060)
p-PDH Ser293	1:1000	Conill	Abcam (ab92696)
α -Tubulina	1:2000	Ratolí	Sigma Aldrich T6079
Vinculina	1:2000	Ratolí	Sigma Aldrich V9131
γ -H2AX	1:500	Conill	Cell Signaling #9718

3.3. Immunohistoquímica de mostres en parafina i quantificació

Les mostres incloses en parafina van ser desparafinades en xilol i deshidratades en una bateria d'alcohols cada cop més dissolts en aigua.

Seguidament, les mostres van ser sotmeses a pressió i temperatura per la recuperació d'antígens seguint el protocol del fabricant (Decloaking Chamber™ NxGen, Bio Care), en buffer EDTA pH 9 o citrat pH 6 en funció de la immunotinció (Dako). Les peroxidases endògenes es van desactivar durant 5 minuts amb una solució de desactivació (30% metanol+3% H₂O₂). A continuació, es va procedir al bloqueig (TBS, 0,5% tritó 100X, 2% sèrum de cabra) durant una hora. L'anticòs primari es va incubar en la solució de bloqueig tota la nit a 4 graus (HIF-1 α , 1:200, descrit a ³¹⁷; BACH-1, 1:200, Sigma Aldrich HPA034949, MCT4 1:70 Novus Bio NBP-81251). Després, es van rentar les mostres en TBS 0,1% Tritó 100X tres vegades durant 10 minuts i després es va incubar les mostres amb EnVision Dual Link (Agilent) durant 30 minuts seguint les recomanacions del fabricant. Posteriorment, es van rentar les mostres en TBS 0,1% Tritó 100X tres vegades durant 10 minuts, i en acabat es va procedir al seu revelat utilitzant DAB+ (Agilent) durant 3 minuts. Seguidament, es van rentar les mostres en TBS 0,1% Tritó 100X un cop durant 10 minuts i es va procedir a una contratinció amb hematoxilina (Sigma Aldrich) durant 2 minuts. A continuació, es van rentar les mostres en TBS 0,1% Tritó 100X un cop durant 2 minuts i es van deshidratar i posteriorment muntar amb DPX. La quantificació es va dur a terme utilitzant el software QuPath, utilitzant l'eina de H-score³¹⁸. Totes les mostres de pacients van ser processades seguint els protocols adients, amb la corresponent aprovació del comitè d'ètica d'investigació clínica de l'Hospital Universitari de Bellvitge (nota de reunió 18/11, ref. PR236/11) i seguint els principis de la declaració de Helsinki. De cada pacient es va obtenir un consentiment informat.

4. Assajos funcionals

4.1. Assaig de mort cel·lular

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 12 pous. A les 24 hores, es van tractar amb els respectius fàrmacs i solvents per 24 hores. Seguidament, les cèl·lules es van aixecar de la placa utilitzant l'agent de dissociació Tryple (Gibco), i es va inactivar amb 2mL de medi complet. A continuació les cèl·lules es van centrifugar a 1000g per 5 minuts i es van rentar amb PBS 3 vegades. Finalment, es van resuspendre en 200 μ L PBS amb 1 μ g/mL de iodur de propidi (Sigma-Aldrich). Posteriorment, es va dur a terme la citometria de flux fent servir el citometre Gallios (Beckman Coulter, Brea, Estats Units).

4.2. Assaig de viabilitat cel·lular

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 96 pous fent 8 replicats. Un cop les cèl·lules es trobaven adherides, es van tractar amb els corresponents fàrmacs o solvents durant 72 hores. Després les cèl·lules es van fixar 10 minuts amb metanol i es van tenyir durant 20 minuts en cristall violeta (0,1% en aigua). En acabat, les cèl·lules es van rentar 3 vegades en aigua i posteriorment el cristall violeta es va resolubilitzar (5% àcid acètic, 10% metanol en aigua) i la densitat òptica es va mesurar a 595 nM en un lector de plaques. Pels assajos de sinergia es va seguir el mateix procediment, i les dades es van analitzar utilitzant el programa Combenefit³¹⁹.

4.3. Mesura dels ROS totals

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 12 pous. A les 24 hores, es van tractar amb els respectius fàrmacs i solvents per 24 hores. A continuació, les cèl·lules es van aixecar de la placa utilitzant l'agent de dissociació Tryple

(Gibco), i es va inactivar amb 2mL de medi complet. Després, les cèl·lules es van centrifugar a 1000g i rentar en PBS 3 vegades. Seguidament, les cèl·lules es van resuspendre en 100 uL de CM-H2DCFA (Invitrogene, Ref #C6827) a 2,5 µM en PBS i es van incubar a 37°C per 45 minuts a les fosques. En acabat, es va afegir 2mL de PBS i les cèl·lules es van centrifugar 5 minuts a 1000g, i seguidament es va procedir a fer 2 rentats més amb PBS. Finalment, es va resuspendre les cel·lules en 200µL PBS amb 1 µg/mL de iodur de propidi. Posteriorment, es va dur a terme la citometria de flux fent servir el citòmetre Gallios (Beckman Coulter, Brea, Estats Units).

4.4. Assaig de flux glicolític i OCR amb Seahorse

Primerament, es van plantar les cèl·lules en una placa de 96 pous de Seahorse (Agilent, Technologies Inc., Santa Clara, USA) en 80µL. L'endemà, 80µL de medi a cada pou amb el corresponent solvent o fàrmac. Al dia següent, es va dur a terme el protocol *Glycolytic Rate Assay* seguint les instruccions del fabricant. Un cop acabat l'assaig es van incubar les cèl·lules amb 2µM de Hoechst (Sigma Aldrich 370460) durant 15 minuts a 37 °C. Després utilitzant el Zeiss Axio Observer Z1+ el microscopi invertit de fluorescència d'Apotome, es van obtenir 9 imatges de cada pou. Després, utilitzant el software Fiji, es van comptar els nuclis de cada pou, que es van fer servir com a normalitzador.

4.5. Assaig de metabolòmica per analitzar l'activitat del complex PDH

Per estudiar l'activitat del complex PDH i la seva capacitat d'introduir el piruvat al cicle de Krebs es va analitzar l'enriquiment de U-13C de glucosa i piruvat a isotopòleg citrat (m+2) a temps curts. Es van sembrar 50.000 cèl·lules en plaques de 6 pous en duplicats. A l'endemà es van tractar les

cèl·lules amb els corresponents tractaments i vehicles en medi de cultiu estàndard per 24 hores. El marcatge es va dur a terme després de rentar les cèl·lules amb abundant PBS i substituint el medi per medi amb glucosa i piruvat marcat (U-13C) a 10mM i 1mM, respectivament per un total de 5, 15 i 30 minuts. Al final de l'experiment, es van rentar les cèl·lules amb PBS fred dues vegades i es van recollir utilitzant una solució a 4°C de metanol/cloroform (2:1, v:v). Tres nanomols de escilo-inositol i norleucina es van utilitzar com a estàndards interns. L'enriquiment es va mesurar utilitzant un espectròmetre GC/MS (GC/MS Agilent 5975C) i els resultats es van analitzar fent servir el MassHunter software (Agilent). La glucosa marcada va contribuir al 100% dels metabòlits de la glicòlisi per sobre del fosfoenolpiruvat. La contribució del piruvat marcat U-13C no va ser diferencial entre cap línia o tractament i contribuïa mínimament als marcatges de citrat i lactat. Tot i això, es va mantenir per mimetitzar les condicions normals de cultiu d'aquestes cèl·lules.

5. Experiments in-vivo

Tots els estudis amb ratolins descrits en aquesta tesi van ser aprovats pel comitè de cura animal de l'IDIBELL (DAAM 5766). En tots els casos l'estat de salut general dels animals es va seguir estrictament i es van eutanasiar quan els criteris de punt final així ho requerien.

5.1. Avaluació de la combinació de IACS-10759 amb Doxorubicina *in-vivo*

2 milions de cèl·lules ID8-P53 van ser injectades ortotòpicament en l'ovari dret de ratolins C57BL6J femella de 8 a 10 setmanes d'edat. Al cap de 3 setmanes, es van establir els grups de manera homogènia. La doxorubicina liposomal (Caelyx) es va obtenir d'Accord Healthcare S.L.U i va ser preparada

pel departament de farmàcia de l'Institut Català d'Oncologia a 2mg/mL. Just abans de l'administració es va dissoldre en salí 5% glucosa a una concentració final de 0,5 mg/mL. El IACS-10759 (MedChemExpress, HY-112037) es va dissoldre en 0,5% carboximetil cel·lulosa a 37,5 µg/mL. Els animals van ser tractats durant 4 setmanes. Un cop per setmana es va administrar 2mg/kg de Caelyx per via intraperitoneal i de dilluns a divendres s'administrava 0,3mg/kg d'IACS via oral. Dos cops per setmana els animals rebien una dosi subcutània de 300µL de salí 5% glucosa. El pes es va mesurar un cop per setmana. Les mesures de glucosa i lactat en sang, es van dur a terme cada dues setmanes. La sang es va obtenir de la vena safena. La glucosa es va mesurar amb tires reactives utilitzant l'aparell Glucomen® (Menarini Diagnostics), mentre que el lactat es va mesurar amb tires reactives utilitzant l'aparell Laktate (Eaglenos, Busimedica, S.L.). Per l'experiment amb dosis reduïdes, el Caelyx es va diluir just abans de l'administració es va dissoldre en salí 5% glucosa a una concentració final de 31,25 µg/mL. El IACS-10759 (MedChemExpress, HY-112037) es va dissoldre en 0,5% carboximetil cel·lulosa a 12,5 µg/mL. Els animals van ser tractats durant 4 setmanes. Un cop per setmana es va administrar 0,25 mg/kg de Caelyx per via intraperitoneal i de dilluns a divendres s'administrava 0,1mg/kg d'IACS via oral. Dos cops per setmana els animals rebien una dosi subcutània de 300µL de salí 5% glucosa. Cap dels tractaments administrats o la manipulació dels animals va tenir un efecte significatiu en el pes o el comportament.

5.2. Caracterització del model ID8-BRCA HRE *in-vivo*

Per posar a punt el sistema ID8-BRCA HRE *in-vivo* es van punxar 2 milions de cèl·lules ID8-BRCA-HRE en l'ovari dret de ratolins C57BL6J femella de 8 a 10 setmanes d'edat. Es va deixar créixer el tumor i progressivament es van eutanasiar diferents animals per tal d'analitzar quins

canvis es generaven al llarg del temps. En el cas de l'experiment amb el tractament amb Olaparib (MedChemExpress, HY-10162) es va dissoldre en 0,5% carboximetil cel·lulosa a 6,25mg/mL. Els animals van ser tractats durant 4 setmanes. De dilluns a divendres s'administrava 50mg/kg d'Olaparib via oral o el respectiu vehicle.

El protocol d'obtenció del tumor s'iniciava amb la injecció intravenosa de pimonidazol (60 mg/kg, dissolt en salí a 30 mg/mL, Sigma-Aldrich) i s'esperava 90 minuts abans d'eutanasiar l'animal. Un cop transcorregut aquest temps, s'obtenia el tumor i es dividia en dues parts: una part per procedir amb la disgregació, i una altra part que es fixava en PFA al 4% en PBS durant 4,5 hores. Seguidament, s'incubava en sacarosa al 30% en PBS tota la nit, i finalment s'inclouïa en un bloc d'OCT.

La part destinada a la disgregació es netejava de la resta de teixit adjacent i es disgregava mecànicament fins a obtenir trossos de mida inferior a 1mm³. Aquest disgregat es resuspensia en 2,35 mL de PBS fred en un tub de gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec) per continuar amb el procés de disgregació, seguint les indicacions del fabricant. Breument, s'afegia el còctel d'enzims (100 µL Enzim D, 30µL Enzim R i 12,5 µL Enzim A) i es sotmetia a la mostra a un protocol de disgregació mecànic i enzimàtic a 37 graus fins que s'observava que no quedaven fragments.

Posteriorment, es filtrava la suspensió resultant per un filtre de 100 µm i es centrifugava 5 minuts a 1500 rpms. El pellet resultant es resuspensia en un tampó de lisis d'eritròcits (RBC lysis buffer, Merck) i es tornava a centrifugar. Seguidament, el pellet s'incubava a 4 graus 20 minuts amb la solució LIVE/DEAD (ThermoFischer) per tal de poder valorar la viabilitat posteriorment. A continuació, es rentava dues vegades en PBS la mostra i seguidament es fixava en PFA 1% en PBS 10 minuts a 4 graus. Després es

centrifugava la mostra i es rentava amb PBS i finalment es resuspensia en una solució de PBS-1%BSA i es procedia a analitzar la mostra amb el citòmetre.

6. Reactius

Altres reactius que no especificats al llarg de tota la secció o en la present taula van ser adquirits a Sigma-Aldrich.

Taula 5: Taula de reactius emprats

Reactiu	Dissolvent	Referència
2-Deoxiglucosa (2-DG)	Salí	D8375, Sigma-Aldrich
3-bromo-piruvat (BPE)	Salí	16490, Sigma-Aldrich
5-Fluorouracil (5-FU)	Salí	Accord Healthcare S.L.U.
Antimicina	Etanol	A8674, Sigma-Aldrich
AZD1390 (ATMi)	DMSO	HY-109566, MCE
BAY-1895344 (ATRi)	DMSO	HY-101566A, MCE
Caelyx (Liposomal doxorubicin)	Salí, 5% glucosa	Accord Healthcare S.L.U.
Ciclofosfamida (CPA)	Salí	Baxter International
Cicloheximida (CHX)	Salí	C7698, Sigma-Aldrich
Cisplatí (CDPP)	Salí	Accord Healthcare S.L.U.
CoCl ₂	Aigua	C8661, Sigma-Aldrich
Dimetil-fumarat (DMF)	DMSO	242926 Sigma-Aldrich
Doxorubicina (Doxo)	DMSO	HY-15142A, MCE
GX604714X (MPCi)	DMSO	HY-138559, MCE
Hoechst	DMSO	62249, Sigma-Aldrich

IACS-10759 (IACS)	DMSO	HY-112037, MCE
Irinotecan (Iriño)	Salí	Accord Healthcare S.L.U.
N-Acetil-L-cisteïna (NAC)	Salí	A0737, Sigma-Aldrich
Novobiocina (Novo)	Salí	HY-B0425, MCE
Olaparib (Olapa)	DMSO	HY-10162, MCE
Paclitaxel (Pacli)	Etanol	Accord Healthcare S.L.U.
Piridostatina (Pyri)	Salí	HY-15176A; MCE
PX-478 (HIFi)	DMSO	HY-10231, MCE
Rotenona (Rot)	Etanol	R8875, Sigma-Aldrich
Rucaparib (Ruca)	DMSO	HY-10617A, MCE
Talazoparib (Talazo)	DMSO	HY-16106, MCE
VB-124	DMSO	HY-139665, MCE
Veliparib (Veli)	DMSO	HY-10129, MCE
VER246608 (PanPDHki)	DMSO	HY-12492, MCE
Vitamina K3 (VitK)	DMSO	47775, Sigma-Aldrich

7. Anàlisi estadístics

Les anàlisis estadístiques s'han dut a terme utilitzant GraphPad Prism (versió 8.3). A no ser que s'especifiqui el contrari les dades es presenten com la Mitjana \pm SD, i cada punt en el gràfic representa un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van dur a terme amb el Mann-Whitney U-test. Les diferències es van considerar significatives quan p -valor $< 0,05$.

RESULTATS

1. El dany de doble cadena indueix un metabolisme oxidatiu regulant l'activitat del complex PDH

1.1. El dany a l'ADN correlaciona amb l'expressió de gens del metabolisme oxidatiu

En anteriors treballs, el meu grup ha demostrat que el dany crònic al ADN degut a la HRD promovia un augment del metabolisme oxidatiu, cosa que suggeria una vulnerabilitat terapèutica en cèl·lules de càncer d'ovari i de mama. També van demostrar que l'expressió de gens del metabolisme oxidatiu (KEGG OXPHOS) correlacionava positivament amb l'estatus mutacional de *BRCA1* i *BRCA2*³⁰⁴. Per validar si aquesta relació era un patró general en diferents tipus de càncer es va analitzar la correlació entre l'expressió d'una signatura d'A-EJ (el mecanisme de reparació actiu en càncers amb HRD) i signatures associades a un increment d'OXPHOS (Fig 11A). Aquest anàlisi demostrava que hi ha una correlació positiva en la majoria dels tipus de càncer estudiats en el TCGA³²⁰: 20 de 32 (63%) tenien una correlació positiva significativa entre A-EJ i la firma "Oxidative phosphorylation"³⁰⁸ (coeficient de Pearson $r = 0,25$, $p\text{-val} = 4,15e-12$); 22 de 32 (69%) entre A-EJ i MOOTHA_VOXPHOS³²¹ (coeficient de Pearson $r = 0,17$, $p\text{-val} = 2,25e-05$); i 22 de 32 (69%) amb la signatura "respiratory chain complex I"³⁰⁹ (coeficient de Pearson $r = 0,28$, $p\text{-val} = 3,52e-16$).

Per ampliar i validar aquestes associacions observades es va dur a terme un altre estudi bioinformàtic analitzant la rellevància d'aquesta associació en cèl·lules tumorals. Per això es va analitzar la correlació de les corresponents signatures gèniques amb la sensibilitat a dihidrorotenona, un inhibidor del complex I de la cadena respiratòria. Per això es va emprar les dades del Genomics of Drug Sensitivity ($n = 713$)³¹² (Fig 11B). Com es va hipotetitzar, la

signatura “respiratory chain complex I” correlacionava negativament amb la concentració inhibidòria mitjana (IC50) a dihidrorotenona ($r = -0,15$, $p\text{-value}=6,24e-05$) (Fig 11B), per tant a més IC50 menys expressió d'aquesta signatura. Consistentment, una signatura que avalua l'expressió de gens glicolítics correlacionava positivament amb la IC50 al fàrmac. Al avaluar la signatura d'A-EJ es va observar que correlacionava negativament amb la

Fig. 11

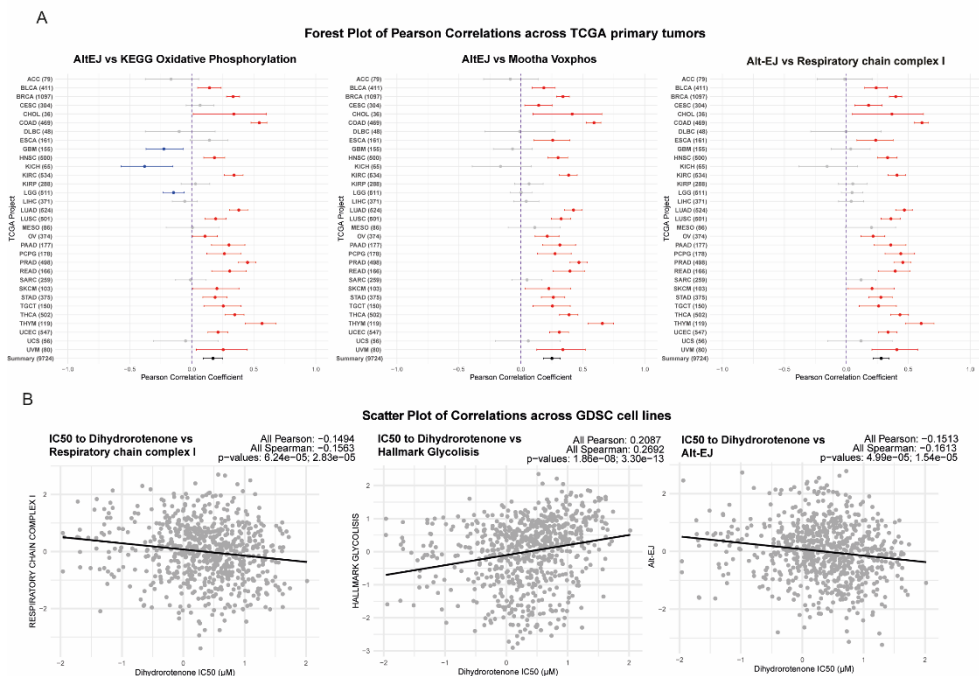


Figura 11: El dany a l'ADN correlaciona amb un metabolisme oxidatiu incrementat. A) Forest plot on es mostren les correlacions entre l'A-EJ i “KEGG OXPPOS” (esquerra), la signatura “Mootha Voxphos” (centre) i la signatura “respiratory chain complex I” (dreta) en els diferents tipus tumorals recollits en el TCGA. Es mostren els acrònims del TCGA per cada tipus tumoral i la quantitat de mostra en parèntesis. Les línies vermelles i blaves indiquen correlacions positives o negatives significatives ($p < 0,05$), respectivament. Les línies grises mostren correlacions no significatives. Els punts indiquen la correlació estimada i les barres l'interval de confiança (95%). B) Correlació entre la sensibilitat de cada línia cel·lular a dihidrorotenona (expressat com el logaritme natural de la IC50) i l'expressió de les signatures “respiratory chain complex I” (esquerra), “Hallmark glycolysis” (centre) i “A-EJ” (dreta). Es mostren els coeficients de correlació de Pearson (r) i de Spearman (r_s) amb el corresponent p -valor.

IC50, suggerint que a més expressió dels gens de A-EJ més sensibilitat a inhibidors del metabolisme oxidatiu ($r = -0,15$, $p = 4,99e-05$) (Fig 11B).

Fig. 12

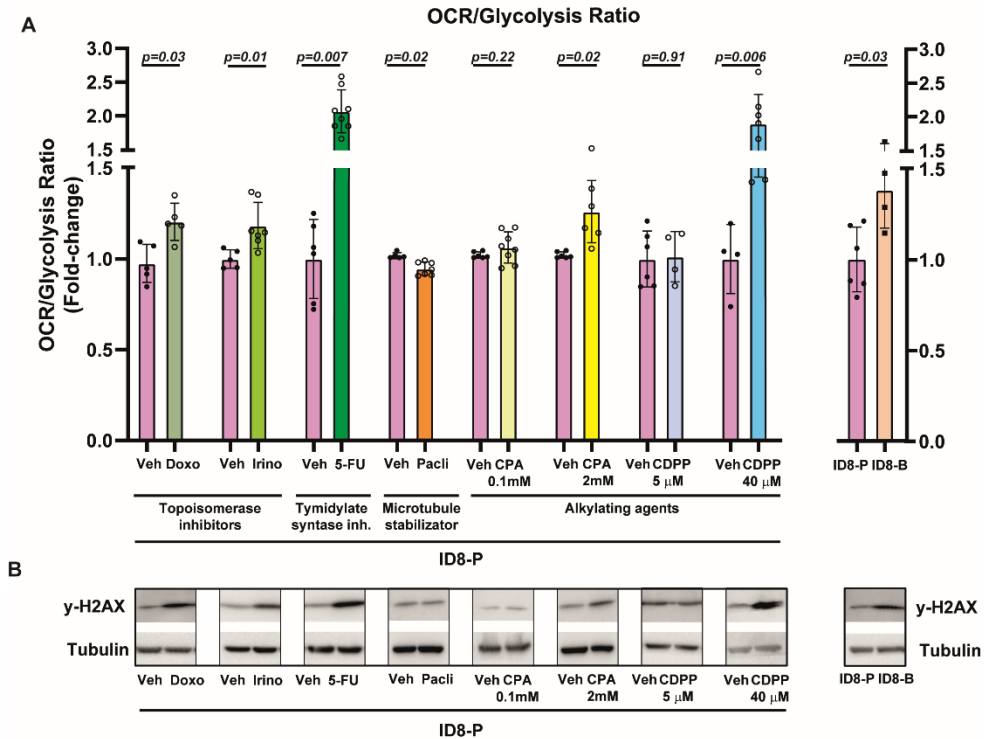


Figura 12: El dany agut a l'ADN produeix un increment del metabolisme oxidatiu.

A) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades amb doxorubicina 0,4µM (Doxo) (n=5), irinotecan 50µM (Irino) (n=7), 5-fluorouracil 5µM (5-FU) (n=8), paclitaxel 20nM (Pacli) (n=7), ciclofosfamida 0,5mM (n=8) or 2mM (CPA) (n=6), cisplatí 5µM (n=4) or 40µM (CDPP) (n=7) (panell esquerre), i cèl·lules ID8-P i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) (n=4) (panell dret). B) Western blot per valorar la presència de γ -H2AX en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades amb doxorubicina 0,4µM (Doxo) (n=5), irinotecan 50µM (Irino) (n=7), 5-fluorouracil 5µM (5-FU) (n=8), paclitaxel 20nM (Pacli) (n=7), ciclofosfamida 0,5mM (n=8) or 2mM (CPA) (n=6), cisplatí 5µM (n=4) or 40µM (CDPP) (n=7) (panell esquerre), i cèl·lules ID8-P i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) (n=4) (panell dret). La tubulina és emprada com control de càrrega. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

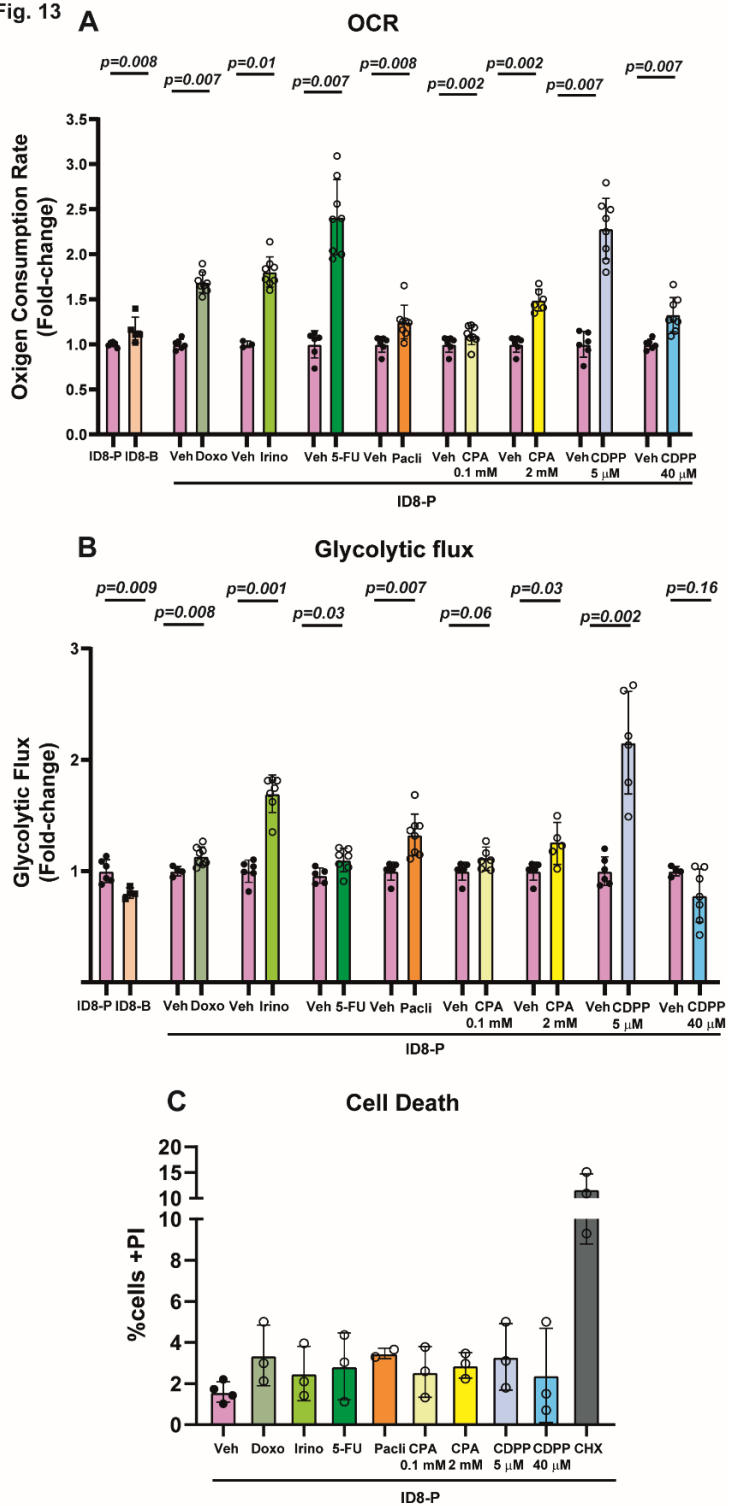
1.2. La inducció de DSB promou un increment del OXPPOS

Seguidament es va hipotetitzar que també el dany agut a l'ADN podia incrementar el metabolisme oxidatiu. Per això es va mesurar la ràtio de consum d'oxigen (OCR) i la ràtio de glicòlisi, fent servir la tecnologia Seahorse, en un model amb HR competent: les cèl·lules de càncer d'ovari ID8 *Trp53* KO, d'origen murí (a partir d'ara anomenades ID8-P). Aquestes cèl·lules van ser tractades amb diferents tipus de quimioteràpia actualment en ús a la clínica (Fig 12A). Aquests tractaments incloïen doxorubicina i irinotecan (inhibidors de topoisomereses), 5-fluorouracil (inhibidor de la timidilat sintasa, necessària per la síntesi de nucleòtids), paclitaxel (agent estabilitzador de microtúbuls) i ciclofosfamida i cisplatí (agents alquilants de l'ADN).

Es va observar que només quan es produïen DSB, mesurats a través la presència de γ -H2AX (Fig 12B), el nostre model ID8-P presentava un canvi en el flux de carboni cap al metabolisme oxidatiu, mesurat com l'increment en la ràtio OCR/glicòlisi (Fig 12A). Es va decidir emprar aquesta ràtio per analitzar els fluxos de carboni, ja que es va observar que al tractar les cèl·lules amb quimioteràpia s'observava de manera general un augment en l'activitat

Figura 13: La quimioteràpia incrementa el flux glicolític sense afectar a la mort cel·lular. Es mostra la OCR (A) o el flux glicolític (B) en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) (n=5) així com en cèl·lules ID8-P pretractades 24h amb vehicle (DMSO), doxorubicina 0,4 μ M (Doxo) (n=7), irinotecan 50 μ M (Iri) (n=8), 5-fluorouracil 5 μ M (5-FU) (n=8), paclitaxel 20nM (Pacli) (n=8), ciclofosfamida 0,5mM (n=9) or 2mM (CPA) (n=6), cisplatí 5 μ M (n=8) or 40 μ M (CDPP) (n=8). C) Percentatge de mort cel·lular mesurada com el percentatge de cèl·lules positives per iodur de propidi en cèl·lules ID8-P tractades amb els tractaments del panell A i B i com a control positiu cèl·lules tractades amb 40 μ g/mL de cicloheximida (CHX) (n=3). Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 13



metabòlica de les cèl·lules (augment tant del flux glicolític com de la OCR), quelcom que ja ha estat descrit en altres treballs³²² (Fig 13).

L'augment del flux de carboni cap al metabolisme oxidatiu en el model ID8-P quan s'indueixen DSB és semblant al observat en les cèl·lules ID8 deficientes en HR (presenten un doble KO pels gens *Trp53* i *Brca2*, a partir d'ara anomenades ID8-B) que presenten un dany a l'ADN crònic degut a que no poden reparar l'ADN de manera tant eficient (Fig 12A). Per altra banda, el tractament amb quimioteràpia que no indueix DSB (per exemple Paclitaxel, CPA 0,1mM i CDPP 5µM) no causava un canvi cap al metabolisme oxidatiu, sinó que augmentava per igual el flux glicolític com la OCR. Tot i això, dosis molt elevades d'agents alquilants, que finalment acaben provocant la acumulació de DSB (per exemple CPA 2mM, CDPP 40µM), eventualment provocaven aquest canvi metabòlic cap a OXPHOS (Fig 12A-B). Cal destacar que cap d'aquests tractaments provocava un augment de la mort cel·lular (Fig 13) en el període avaluat.

De manera complementària es va estudiar la cinètica d'aquest fenomen en el model ID8-P emprant doxorubicina (Fig 14A). Es va observar que en primera instància, a la hora d'exposar les cèl·lules a doxorubicina, les cèl·lules presentaven un metabolisme més glicolític (Fig 14B), però que aquest donava pas a un metabolisme oxidatiu quan començaven a acumular-se els DSB a les poques hores. Aquest experiment reforçava la correlació entre la presència de DSB i la inducció del metabolisme oxidatiu.

Per demostrar que aquest no és un fet aïllat del model, es va analitzar la ràtio OCR/Glicòlisi en diferents línies cel·lulars humanes de càncer d'ovari (SKOV3N i OVCAR4), pròstata (DU145) i mama (T-47D) (Fig 15A-B) quan s'indueixen DSB amb doxorubicina i irinotecan. Es va observar que en totes les línies testades es produïa el mateix fenomen que en els resultats anteriors,

és a dir, un augment de la ràtio OCR/glicòlisi quan s'indueixen els DSB. Per tant, amb aquestes observacions es va confirmar que el canvi metabòlic cap a OXPHOS és un mecanisme de resposta compartit entre diferents tipus tumorals davant l'aparició de DSB.

Fig. 14

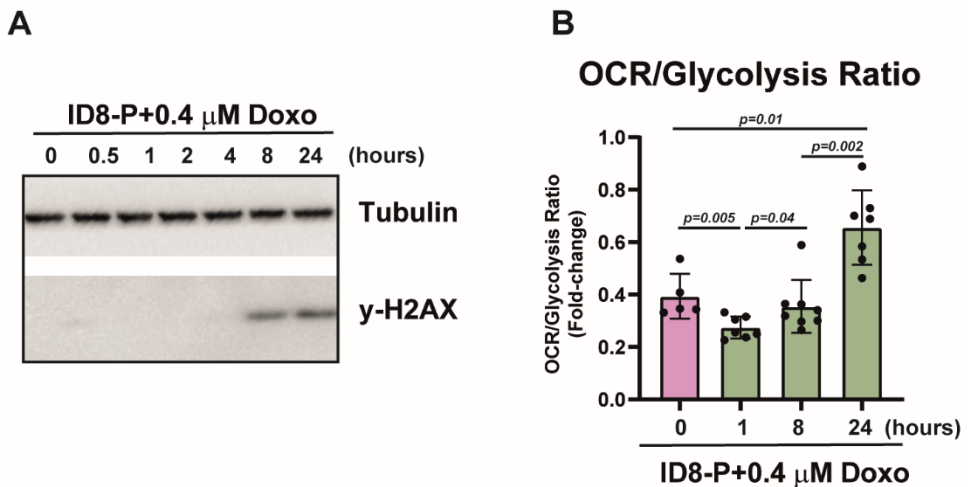


Figura 14: El metabolisme oxidatiu apareix quan s'acumulen els DSB. A) Western blot per valorar la presència de γ -H2AX en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades amb doxorubicina 0,4 μ M (Doxo) pel temps indicat. La tubulina s'ha emprat com a control de càrrega. B) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades amb doxorubicina 0,4 μ M (Doxo) pel temps indicat. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 15

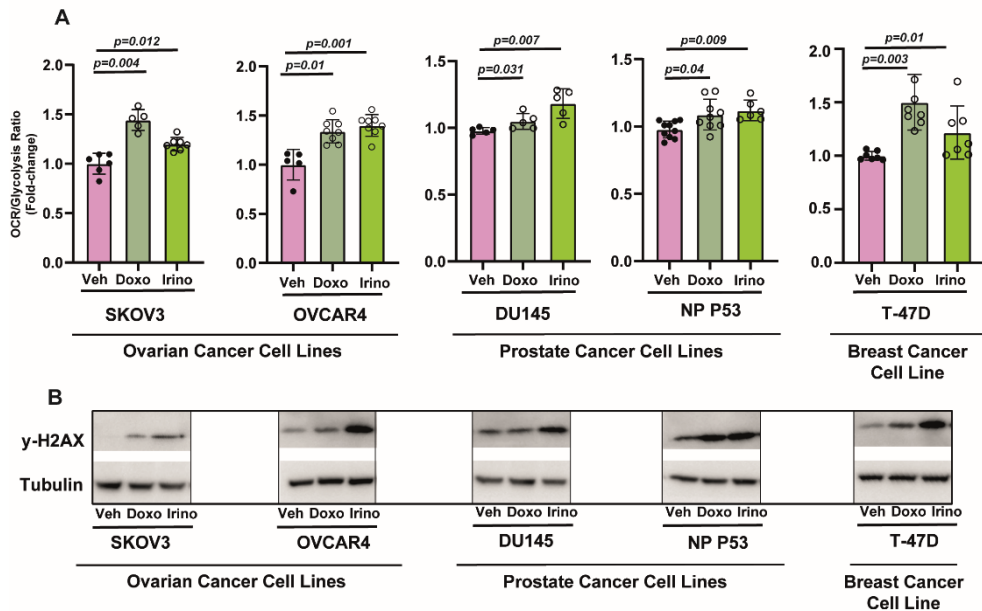


Figura 15: El dany agut a l'ADN produeix un increment del metabolisme oxidatiu en diverses línies cel·lulars de diferents tipus tumorals. A) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules SKOV3 (n=5 i 7 respectivament), OVCAR4 (n=8), DU145 (n=5), NP P53 (n=9 i 6 respectivament) i T-47D cells (n=7) pretractades 24h amb vehicle (Veh, DMSO), 0,4µM doxorubicina (doxo) o irinotecan (irino) 50µM en el cas de les OVCAR4, T-47D i DU145 i 20µM per les SKOV3 i NP P53. B) Western blot per valorar la presència de γ-H2AX en cèl·lules SKOV3, OVCAR4, DU145, NP P53 i T-47D amb els tractaments indicats en el panell A). La tubulina s'ha emprat com a control de càrrega. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan P<0,05. El P-valor es troba indicat a cada figura.

1.3. L'eix PDHK1/PDH és el responsable d'activar el metabolisme oxidatiu després de la inducció de DSB.

En estudis previs del grup³⁰⁴ es va descriure que la regulació de l'activitat de la PDH tenia un rol crucial en controlar el metabolisme energètic en tumors HRD. La fosforilació de la PDH ha estat descrita com un dels punts de regulació més importants per modular la seva activitat¹⁴⁸ i correlaciona amb l'activitat de l'enzim^{151,152}. De fet, en el nostre model ID8-B (que és HRD), s'observen uns menors nivells de fosforilació de la PDH (Fig 16A-C) respecte les ID8-P, així com en el model SKOV3 BRCA2 KO, que prèviament ha estat caracteritzat³⁰⁴ (Fig 16D-F). Per confirmar si aquesta disminució de la fosforilació correlaciona amb un increment de l'activitat de la PDH es va dur a terme un assaig funcional de l'activitat de l'enzim mesurant la incorporació de carboni marcat en citrat (Fig 16G). Es va observar que en les ID8-B el enriquiment de citrat (m+2) estava incrementat respecte les ID8-P, confirmant que el model HRD presenta una activitat PDH més elevada i que correlaciona amb els nivells de fosforilació de l'enzim (Fig 16H).

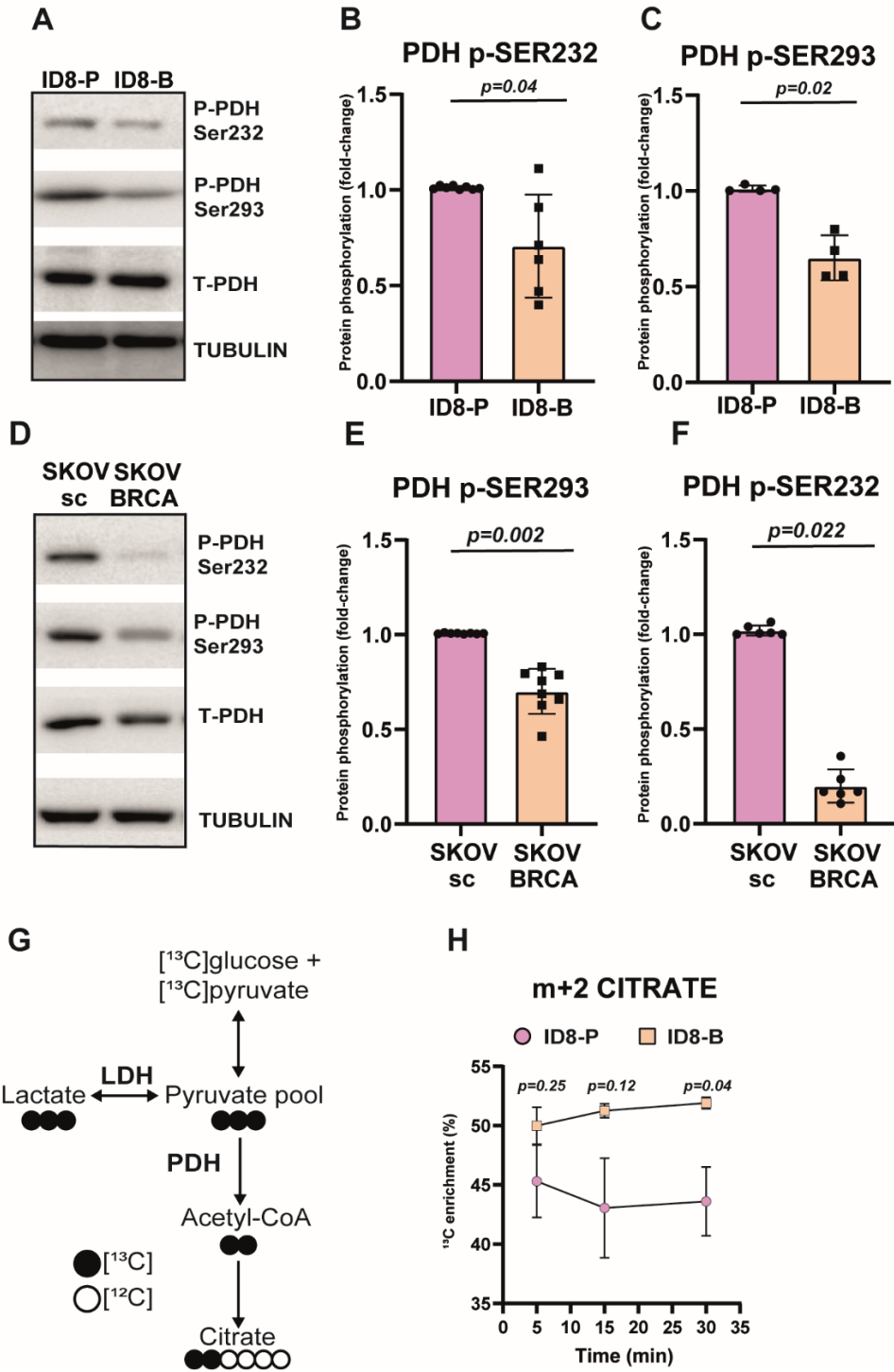
Seguidament es va avaluar si la inducció aguda de DSB produïda per la quimioteràpia, podia impactar en la fosforilació de la PDH. Per avaluar-ho es van tractar diferents línies cel·lulars amb doxorubicina o irinotecan (Fig 17A-O). Es va observar que les cèl·lules tractades acumulaven DSB i presentaven una reducció de la fosforilació de la PDH. Aquest fenomen es va observar en totes les diferents línies testades independentment del tipus tumoral o del fàrmac emprat per induir els DSB (Fig 17).

Finalment, per verificar que aquest efecte era específicament causat per la generació de DSB, vam incubar les cèl·lules amb piridostatina, un compost que estabilitza els G-quàdruplex, un tipus d'estructura secundària que es forma en regions riques de guanina, i que acaba comportant la

formació de DSB de manera específica³²³. Notablement, aquest compost també va reduir la fosforilació de la PDH (Fig 17P-R), així com també es va observar després de tractar les cèl·lules amb radioteràpia (6 Gy) (Fig 17S-T). Tots aquests resultats indiquen que els DSB, generats tant en un escenari de dany crònic a l'ADN o en una situació de dany agut, incrementa el metabolisme oxidatiu i correlaciona amb un increment de l'activitat de la PDH. La fosforilació de la PDH va emergir com un factor essencial per regular el metabolisme energètic quan s'indueix DSB. Per això es va procedir a identificar les molècules específiques que contribuïen a la regulació d'aquest eix. Primerament es va estudiar l'escenari de dany crònic en càncer d'ovari, comparant els models ID8-P i ID8-B, i es va analitzar la expressió de les diferents PDH quinases. De les 4 isoformes diferents es va observar una reducció de l'expressió d'ARN missatger en els gens *Pdk1* i *Pdk4* en el model HRD (Fig 18A),

Figura 16: L'activitat de la PDH correlaciona amb la seva fosforilació. Western blot analitzant la fosforilació de la PDH a la serina 232 i 293, així com els nivells totals de la PDH i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) (A) o en cèl·lules SKOV3N (SKOV-sc) i SKOV3N *BRCA2* KO (SKOV-BRCA) (D) amb les respectives quantificacions de les fosforilacions utilitzant tubulina com a control de càrrega (B i C per ID8, E i F per SKOV3). Es mostra una imatge representativa en cada cas. G) Esquema mostrant el flux de carboni marcat provinent del piruvat. H) Mesurament de l'enriquiment del citrat+2 marcat en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B), cultivades en [13C]-glucosa i [13C]-piruvat durant 5, 15 i 30 minuts. Cada punt és la mitja de dos replicats experimentals. Per calcular la significança estadística es va dur a terme un T-test no parellat paramètric. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 16



De les 4 isoformes diferents es va observar una reducció de l'expressió d'ARN missatger en els gens *Pdk1* i *Pdk4* en el model HRD (Fig 18A), i la PDHK1, codificada pel gen *Pdk1*, va ser l'única que va poder ser confirmada a nivell de proteïna fent servir Western Blot (Fig 18B-D). La mateixa reducció de la PDHK1 es va observar en el model SKOV3N *BRCA2* KO (Fig 18E-G). Per confirmar la importància dels nivells de fosforilació de la PDH, i per tant de la implicació de les PDHKs, es va analitzar la ràtio OCR/glicòlisi després de tractar les ID8-P amb un inhibidor de PDHKs (Pan PDHKi) per augmentar l'activitat PDH, cosa que va comportar un augment en la ràtio OCR/glicòlisi (Fig 18H). De manera inversa, al tractar les ID8-B amb un inhibidor del transportador mitocondrial de piruvat (MPCi), a falta d'inhibidors específics de la PDH, impedit l'entrada del substrat de la PDH al mitocondri, va resultar en una menor ràtio (Fig 18I). Aquestes evidències reforçaven el paper clau de l'activitat de la PDH en la regulació del metabolisme energètic en aquest model.

Figura 17: La inducció de DSB provoca una disminució en la fosforilació de la PDH. Western blot analitzant la fosforilació de la PDH a la serina 232 i 293, així com els nivells totals de la PDH i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) (A), SKOV3N (D), DU145 (G) o T-47D (J) tractades amb vehicle (DMSO, veh) o doxorubicina 0,4µM (Doxo) durant 24 hores amb les respectives quantificacions de les fosforilacions utilitzant tubulina com a control de càrrega (B i C per ID8, E i F per SKOV3, H i I per DU145, K i L per T-47D). Western blot analitzant la fosforilació de la PDH a la serina 232 i 293, així com els nivells totals de la PDH i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades amb vehicle (DMSO, veh), irinotecan 50µM (irino) (M) o piridostatina 10µM (Pyri) (P) amb les respectives quantificacions de les fosforilacions utilitzant tubulina com a control de càrrega (N i O per Irinotecan, Q i R per Piridostatina). S) Western blot analitzant la fosforilació de la PDH a la serina 293 i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades amb una única dosi de 6 Gy de radioteràpia i deixant-les recuperar el temps indicat, amb la respectiva quantificació de la fosforilació (T) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 17

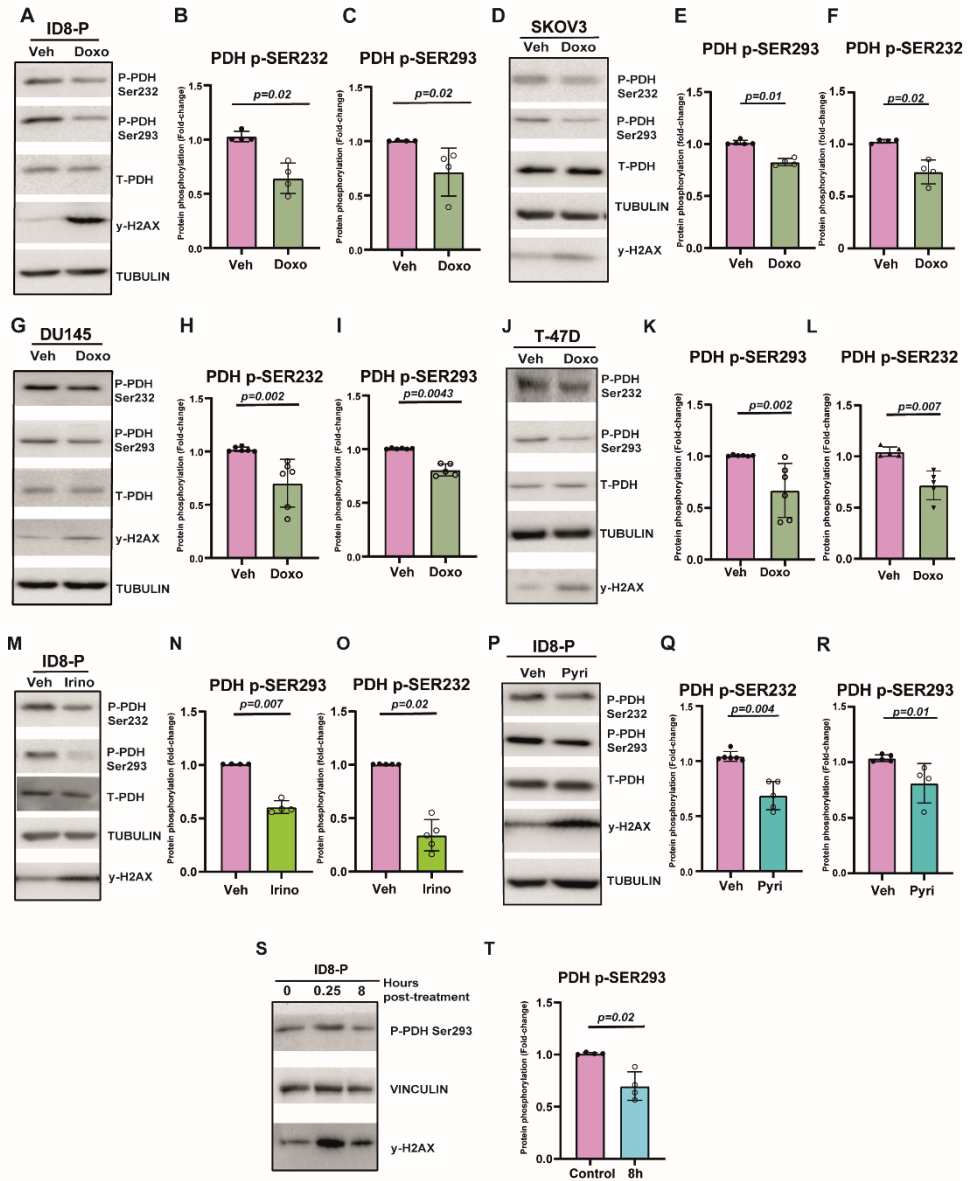


Fig. 18

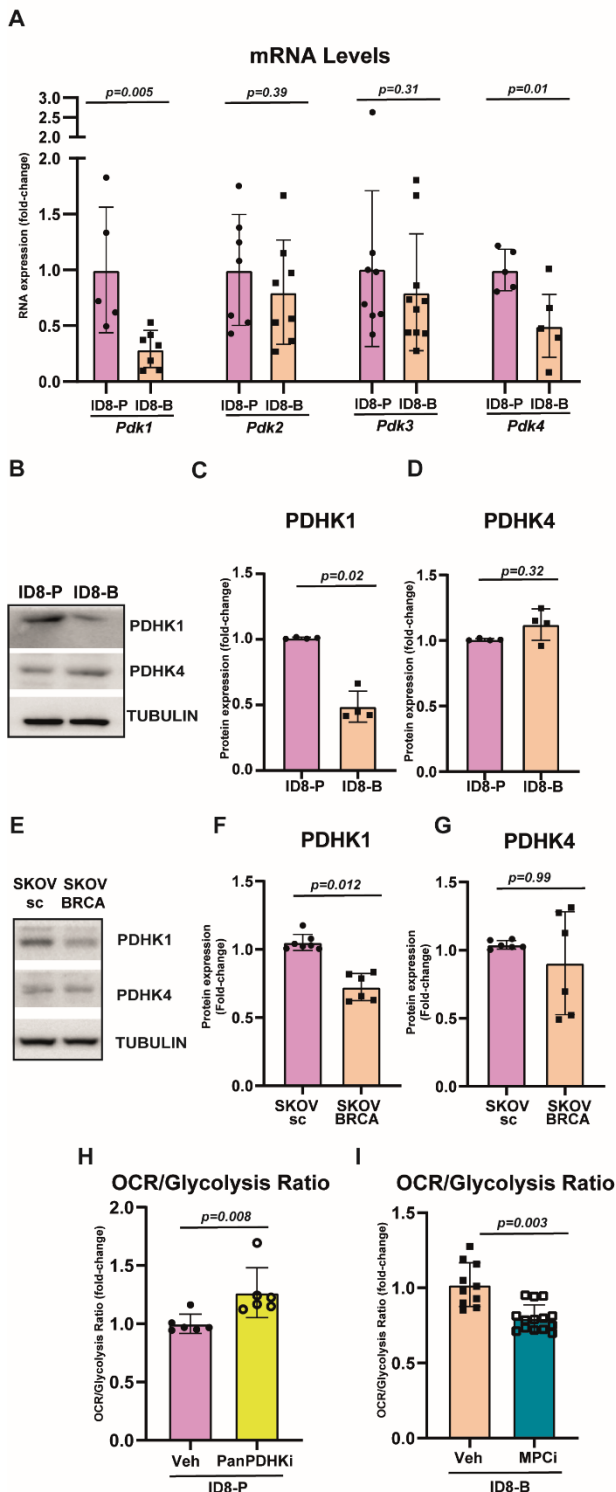


Figura 18: La PDHK1 és l'encarregada de regular l'activitat de la PDH. A) Nivells de mRNA dels gens *Pdk* en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B). Els nivells de mRNA del gen de l'actina van ser utilitzats com a control de càrrega. Western blot analitzant la expressió de PDHK1 i PDHK4 així com els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) (B), o en cèl·lules SKOV3N (SKOV-sc) i SKOV3N *BRCA2* KO (SKOV-BRCA) (E) amb les respectives quantificacions utilitzant tubulina com a control de càrrega (C i D per ID8, F i G per SKOV3N). Es mostra una imatge representativa en cada panell. H) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades amb VER-246608 500nM (PanPDHKi) durant 24 hores. I) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) pretractades amb GW604714 250nM (MPCi) durant 24 hores. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Complementàriament, es va analitzar l'expressió de totes les *PDK* per qPCR, així com els nivells de proteïna de la PDHK1, i els nivells de fosforilació de la PDH per western blot en diferents mostres de PDX de HGSOC. Aquestes mostres derivades de pacients tenien mutacions en el gen *P53* (WT Tumours) o mutacions tant en *P53* com en *BRCA1/2* (BRCA Mut Tumors). Es

Fig. 19

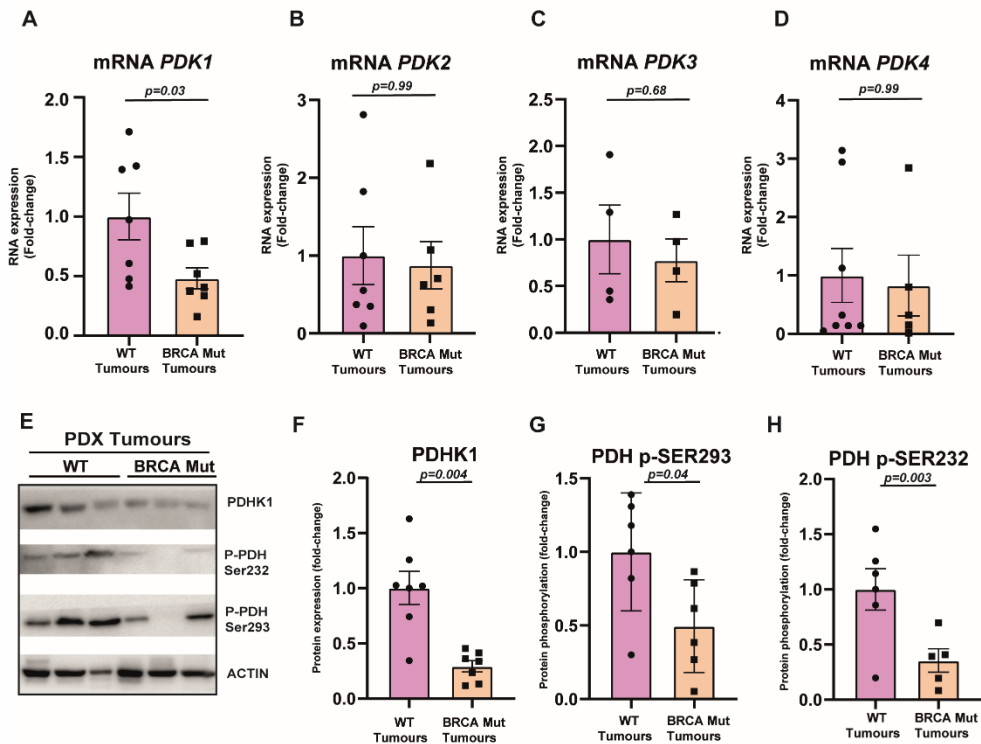


Figura 19: L'eix PDHK1/PDH també es troba reprimat en tumors humans amb mutacions en *BRCA1/2*. A-D) Nivells de mRNA dels gens *Pdk* en tumors de HGSOC sense mutacions a *BRCA1/2* (WT) o mutats en *BRCA1/2* (BRCA mut) crescuts com a PDX en ratolins. Els nivells de mRNA del gen de l'actina van ser utilitzats com a control de càrrega. Les dades es representen com la mitjana \pm SEM. E) Western blot analitzant la expressió de PDHK1 i la fosforilació de la PDH a la serina 232 i 293 així com els nivells de l'actina com a control de càrrega en tumors de HGSOC sense mutacions a *BRCA1/2* (WT) o mutats en *BRCA1/2* (BRCA mut) crescuts com a PDX en ratolins. F-H) Quantificació de les diferents proteïnes i fosforilacions mostrades en el panell E). L'actina s'ha emprat com a control de càrrega. Les dades es representen com la mitjana \pm SEM. Cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

va observar que els tumors amb mutacions a *BRCA1/2* tenien menys expressió del gen *PDK1* (Fig 19A-D) així com menys nivells de la proteïna PDHK1 (Fig 19E-F), i nivells de fosforilació de la PDH més baixos (Fig 19G-H). Totes aquestes dades reforçaven la importància del eix PDHK1/PDH com a regulador principal del flux de carboni i del metabolisme energètic per mantenir el fenotip Warburg o canviar a un metabolisme OXPHOS.

2. La inducció de dany comporta a una activació de NRF2 que inhibeix l'expressió de HIF-1 inhibint PDHK1

2.1. La inhibició de HIF-1 α degut a la inducció de DSB es responsable del canvi metabòlic cap a OXPHOS

L'expressió del gen que codifica per la PDHK1, *PDK1*, s'ha demostrat que està sota control transcripcional en diferents escenaris¹⁴⁹. Es va raonar que la regulació de *PDK1* podria estar relacionada amb el canvi metabòlic induït pel dany a l'ADN. Per evaluar aquesta idea, es va analitzar el promotor de *PDK1*, buscant diferents factors de transcripció amb un paper en la regulació de la glicòlisi i amb llocs d'unió validats al promotor, fent servir dades del ChIP-Atlas³²⁴ (Fig 20A). Seguidament, es van correlacionar els nivells d'expressió dels diferents factors de transcripció identificats amb l'expressió de *PDK1* en els diferents tipus de càncer presents en el TGCA (Fig 20B). Aquest anàlisi va concloure amb dos possibles candidats: *BACH1* (BTB and CNC homology 1) (23 de 32 dels tipus tumorals presentaven una correlació positiva entre *BACH1* i *PDK1*; Coeficient de Pearson $r=0,22$ p-val = $9,3e-16$) i *HIF-1* (24 de 32 dels tipus tumorals presentaven una correlació positiva entre *HIF1A* i *PDK1*; Coeficient de Pearson $r=0,25$ p-val = $5,49e-16$). A més analitzant la signatura dels gens transcripcionalment regulats per HIF 1, 29 de 32 dels tipus tumorals presentaven una correlació positiva entre la signatura i *PDK1* (Coeficient de Pearson $r=0,42$, p-val= $1,23e-29$) (Fig 20B).

Per confirmar les aproximacions bioinformàtiques, es va analitzar l'expressió dels dos gens per qPCR així com a nivell de proteïna. L'expressió dels dos factors de transcripció estava disminuïda, tant a nivell de RNA com de proteïna en els models amb KO a *BRCA2* tant en el model ID8 com en el model SKOV3N (Fig 21). A continuació, es va validar l'expressió dels dos

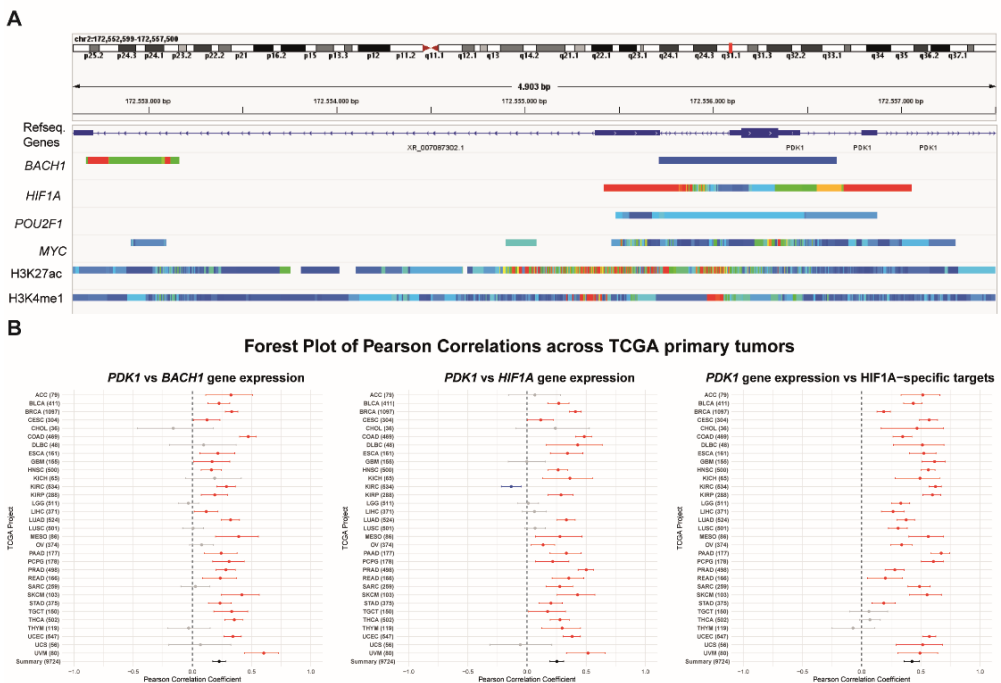
candidats mitjançant qPCR en la cohort de PDX emprada anteriorment, observant una menor expressió en els PDX amb mutacions en els gens *BRCA1/2*. A més a més, es va avaluar els nivells de proteïna en una sèrie retrospectiva de tumors de HGSOc, que eren WT o tenien mutacions en els gens *BRCA1* o *BRCA2*, (Fig 22) fent servir IHQ. Els resultats van ser consistents amb els obtinguts en els models de línies cel·lulars i les dades provinents de PDXs, reforçant la idea de que aquests factors de transcripció estan reprimits en els tumors HRD i podrien estar involucrats en al regulació de les adaptacions metabòliques observades.

Per determinar el rol de cada factor de transcripció es va procedir a realitzar diferents assajos modificant l'expressió d'aquests en el model ID8-P. Per una banda, es va realitzar un KO contra el gen *Bach1* del model ID8-P fent servir la tecnologia de Cripsr/Cas9. Aquesta aproximació va eliminar completament els nivells de proteïna de BACH1 (Fig 23A) tot i que no va resultar en la modulació aparent dels nivells de PDHK1 (Fig 23B), de la fosforilació de la PDH (Fig 23C-D) o de la ràtio OCR/Glicòlisi (Fig 23E), suggerint que BACH1 no tenia un rol cabdal en el nostre model.

Figura 20: Identificació de BACH-1 i HIF-1 α com a possibles candidats a regular l'expressió de PDK1. A) Esquema mostrant la regió del promotor de *PDK1*. Es mostren les regions d'unió la promotor validades per CHIP-seq disponibles a ChipAtlas així com les regions amb les histones amb les modificacions H3K27ac i H3K4me1 com a marcadors de zones promotores. Els colors indiquen la significació estadística calculada com $-10 \cdot \log_{10}(\text{MACS2 } q\text{-value})$, essent blau valors superiors a 50, cian superiors a 250, verd superiors a 500, grocs superiors a 750 i vermell superiors a 1000. B) Forest plot mostrant la correlació entre l'expressió del gen *PDK1* i l'expressió del gen *BACH1* (esquerra), *HIF1A* (centre) i la correlació amb la signatura "HIF1A-specific targets". Es mostren els acrònims del TCGA per cada tipus tumoral i la quantitat de mostra en parèntesis. Les línies vermelles i blaves indiquen correlacions positives o negatives significatives ($p < 0,05$), respectivament. Les línies grises mostren correlacions no significatives. Els punts indiquen la correlació estimada i les barres l'interval de confiança (95%).

Seguidament, es va procedir a silenciar *HIF1A* fent servir un shRNA en el model ID8-P. L'efectivitat del silenciament va ser validada mesurant l'expressió a nivell proteic de HIF-1 α , (Fig 24A-D) així com els nivells de RNA missatger de diferents gens regulats transcripcionalment per HIF-1 (Fig 24E) com *Hk2*, *Ldha* o *Bnip3*. Addicionalment, es va observar una reducció de la expressió del gen *Pdk1* a nivell de mRNA i a nivell de proteïna. Conseqüentment, es va observar també una reducció de la fosforilació de la PDH (Fig 24C-D). A més a més, es va analitzar la ràtio OCR/glicòlisi, que es trobava disminuïda en les cèl·lules amb *Hif1a* silenciada (Fig 24F). Altrament, es va procedir a utilitzar un inhibidor farmacològic de HIF-1 (PX-478), que ha estat àmpliament descrit³²⁵, per confirmar la implicació de HIF-1 α com a controlador de l'activitat PDH. L'ús d'aquest inhibidor va causar una reducció dels nivells de PDHK1 així com de la fosforilació de la PDH (Fig 24G-I) a més d'un increment en la ràtio OCR/glicòlisi (Fig 24J). Aquestes dades van

Fig. 20



permetre confirmar que HIF-1 és el principal regulador de l'activitat PDH, en

aquest context, modulant la seva fosforilació a través de modificar l'expressió de la PDHK1.

Seguidament, es va analitzar si la regulació observada en els models HRD es podia traslladar als models d'acumulació DSB de manera aguda. Per això es va tornar tractar el model ID8-P amb els diferents inhibidors de topoisomerases (doxorubicina i irinotecan) (Fig 25A-F), així com amb el estabilitzador dels quàdruplex-G (piridostatina) (Fig 25G-I). En tots els casos es va observar una reducció dels nivells de HIF-1 α així com de la PDHK1. Consistentment, es va observar la mateixa reducció en els altres models emprats amb anterioritat, tant en els d'ovari (Fig 25J-L), com els de pròstata (Fig 25M-O), com els de mama (Fig 25P-R), quan van ser tractats amb doxorubicina. Per tant, els resultats indicaven que HIF-1 és un regulador clau en la plasticitat metabòlica dels nostres models, reduint els seus nivells quan hi ha dany agut a l'ADN per promoure un metabolisme oxidatiu com a resposta a l'increment de DSB.

Figura 21: BACH-1 i HIF-1 α estan infraexpressats en els models amb dany crònic a l'ADN. A) Nivells de mRNA del gen *Bach1* en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B). Els nivells de mRNA del gen de l'actina van ser utilitzats com a control de càrrega. B) Western blot analitzant la expressió de BACH1 i actina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) amb la respectiva quantificació utilitzant actina com a control de càrrega (C). Es mostra una imatge representativa en cada panell. D) Nivells de mRNA del gen *Hif1a* en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B). Els nivells de mRNA del gen de l'actina van ser utilitzats com a control de càrrega. E) Western blot analitzant la expressió de HIF-1 α i actina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) amb la respectiva quantificació utilitzant actina com a control de càrrega (F). Es mostra una imatge representativa en cada panell. G) Western blot analitzant la expressió de BACH1, HIF-1 α i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules SKOV3N (SKOV-sc) i SKOV3N *BRCA2* KO (SKOV-BRCA) amb la respectiva quantificació (H, I) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 21

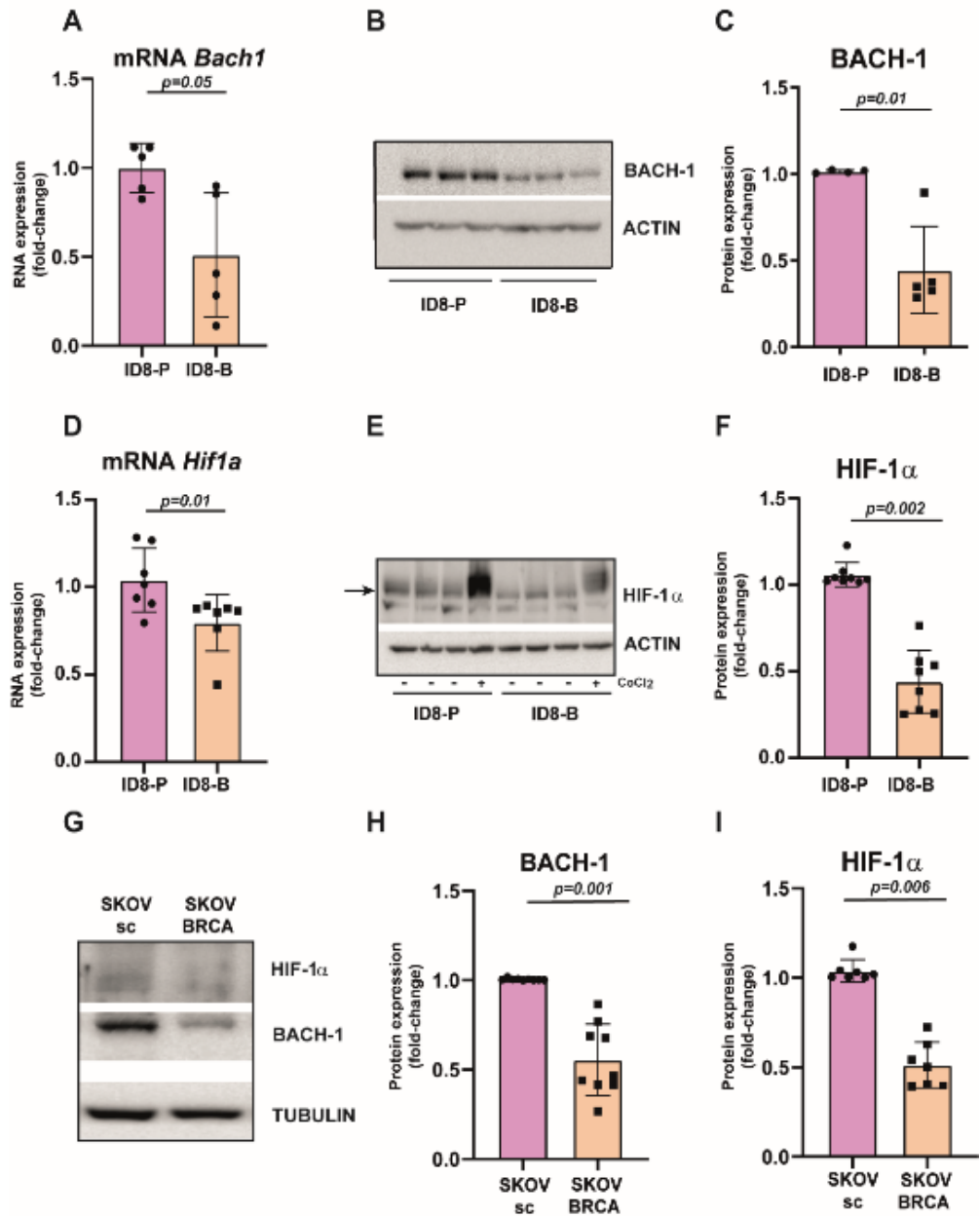


Fig. 22

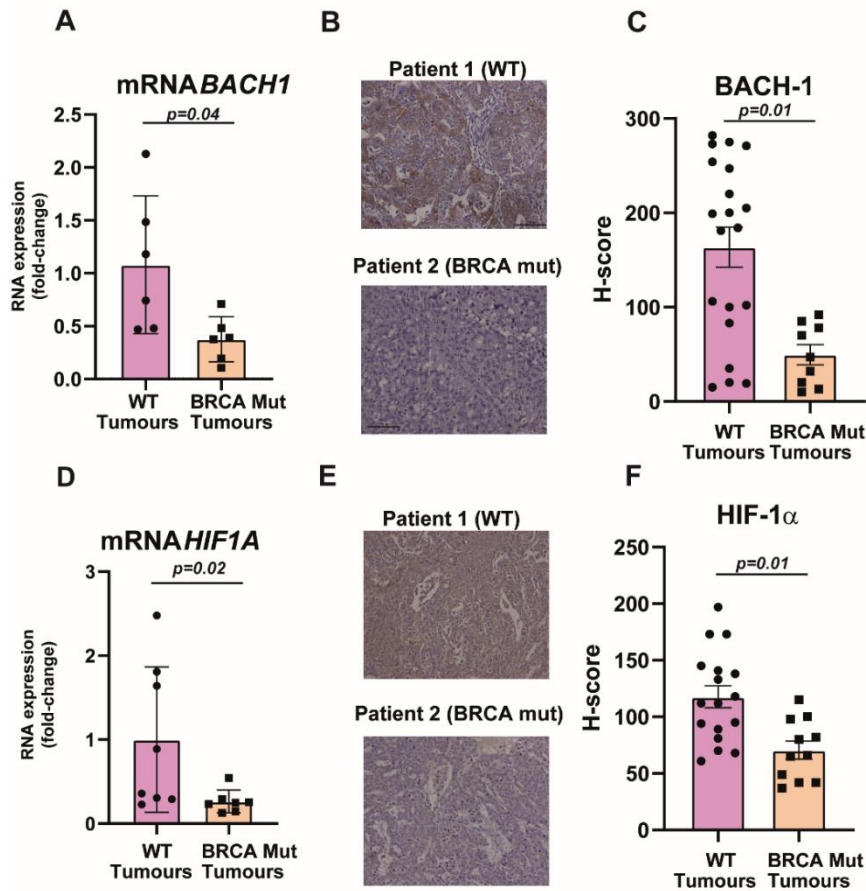


Figura 22: BACH-1 i HIF1- α es troben infraexpressats en tumors amb mutacions a BRCA1/2. A) Nivells de mRNA del gen *BACH1* en tumors de HGSOV sense mutacions a *BRCA1/2* (WT) o mutats en *BRCA1/2* (BRCA mut) crescuts com a PDX en ratolins. Els nivells de mRNA del gen de l'actina van ser utilitzats com a control de càrrega. Les dades es representen com la mitjana \pm SEM. B) IHQ en FFPE contra BACH-1 en mostres de HGSOV de pacients. Es mostren dues imatges, una BRCA WT i l'altra BRCA1/2 mutat. C) Quantificació (H-score) de la IHQ mostrada a B) representada amb la mitjana \pm SEM. D) Nivells de mRNA del gen *HIF1A* en tumors de HGSOV sense mutacions a *BRCA1/2* (WT) o mutats en *BRCA1/2* (BRCA mut) crescuts com a PDX en ratolins. Els nivells de mRNA del gen de l'actina van ser utilitzats com a control de càrrega. Les dades es representen com la mitjana \pm SEM. E) IHQ en FFPE contra HIF-1 α en mostres de HGSOV de pacients. Es mostren dues imatges, una BRCA WT i l'altra BRCA1/2 mutat. F) Quantificació (H-score) de la IHQ mostrada a E) representada amb la mitjana \pm SEM. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 23

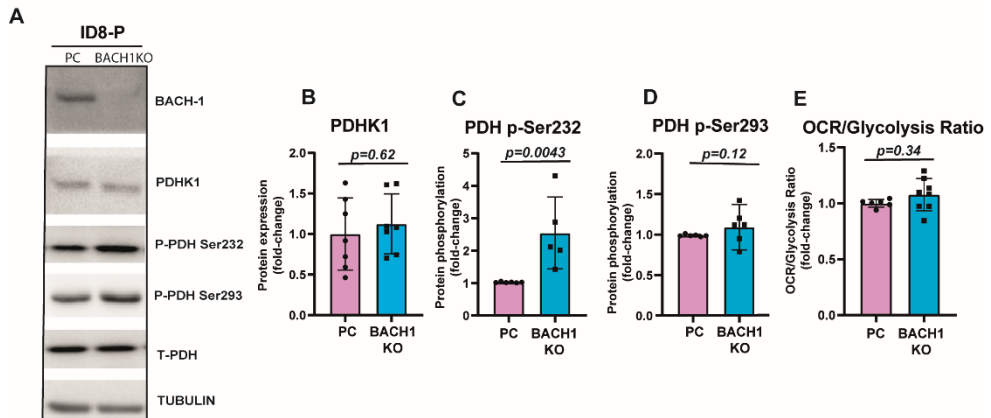
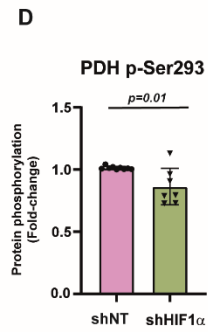
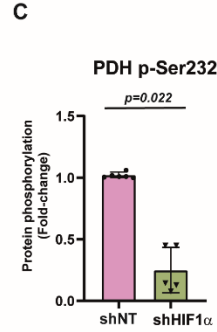
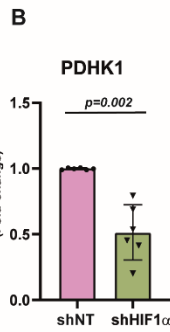
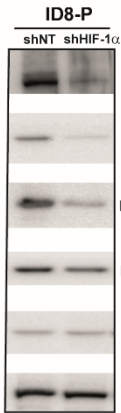


Figura 23: BACH-1 no és el principal responsable de la regulació del eix PDHK1/PDH. A) Western blot analitzant l'expressió de BACH-1, PDHK1, PDH total i la fosforilació de la PDH a la serina 232 i 293 així com els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-P control (PC) o ID8-P *Bach1* KO (BACH1 KO), amb les respectives quantificacions (B-D) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. E) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-P control (PC) o ID8-P *Bach1* KO (BACH1 KO) en condicions basals. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

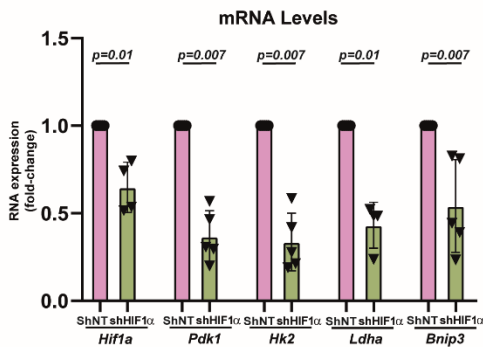
Figura 24: HIF-1 regula l'expressió de la PDHK1 així com l'activitat de la PDH. A) Western blot analitzant la expressió de HIF-1 α , PDHK1, PDH total i la fosforilació de la PDH a la serina 232 i 293 així com els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-P control (shNT) o ID8-P amb un knockdown de *Hif1a* (shHIF-1 α) amb les respectives quantificacions (B-D) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. E) Nivells de mRNA del gens *Hif1a*, *Pdk1*, *Hk2*, *Ldha*, *Bnip3* en cèl·lules ID8-P control (shNT) o ID8-P amb un knockdown de *Hif1a* (shHIF-1 α). F) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-P control (shNT) o ID8-P amb un knockdown de *Hif1a* (shHIF-1 α) en condicions basals. G) Western blot analitzant la expressió de HIF-1 α , PDHK1, PDH total i la fosforilació de la PDH així com els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades 24 hores amb vehicle, clorur de cobalt (CoCl₂) 200 μ M com a control positiu i PX-478 5 μ M (HIFi). Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 24

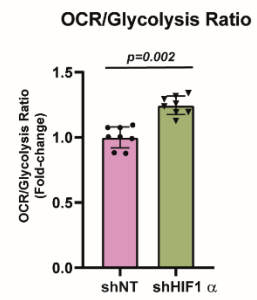
A



E



F



G

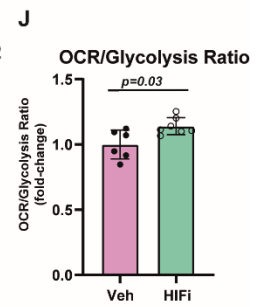
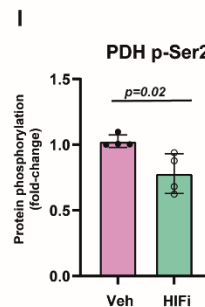
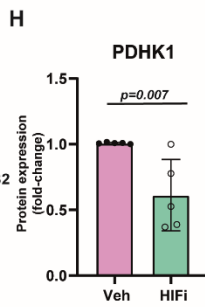
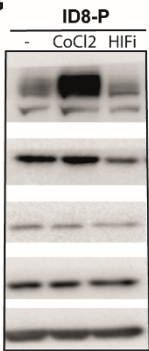


Fig. 25

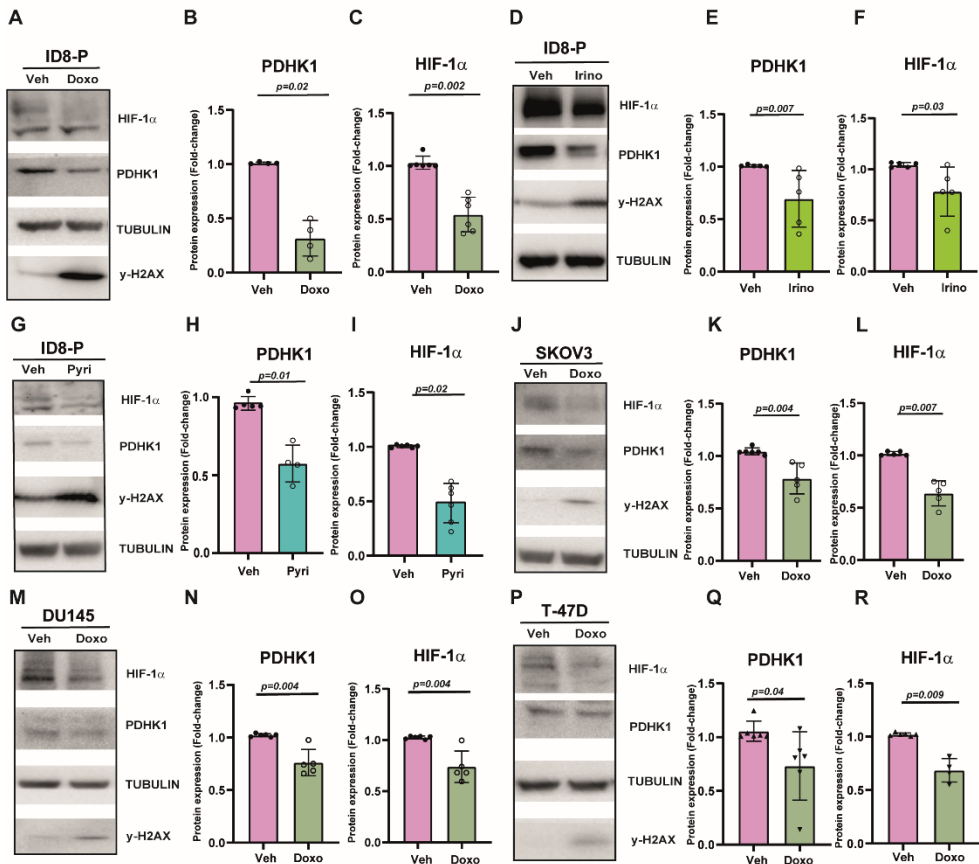


Figura 25: La inducció de DSB reprimeix l'expressió de HIF-1 α i de PDHK1. Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , PDHK1, així com la presència de γ -H2AX i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades amb vehicle (DMSO, veh), doxorubicina 0,4 μ M (Doxo) (A) irinotecan 50 μ M (Irino) (D) o piridostatina 10 μ M (Pyri) (G) amb les respectives quantificacions utilitzant tubulina com a control de càrrega (B i C per doxorubicina, E i F per Irinotecan, H i I per Piridostatina). Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , PDHK1, així com la presència de γ -H2AX i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules SKOV3N (J), DU145 (M) o T-47D (P) tractades amb vehicle (DMSO, veh) o doxorubicina 0,4 μ M (Doxo) durant 24 hores amb les respectives quantificacions utilitzant tubulina com a control de càrrega (K i L per SKOV3, N i O per DU145, Q i R per T-47D). Es mostra una imatge representativa en cada panell. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

2.2. ROS induïts pels DSB activen NRF2 i promouen la repressió de l'eix HIF-1/PDHK1

A continuació, es va procedir a estudiar quina era la relació entre l'increment de DSB i la regulació de HIF-1. Primerament, es va hipotetitzar que les vies de resposta a dany a l'ADN estarien implicades en la regulació de HIF-1. No obstant, la inhibició de les vies canòniques de resposta a DSB, com les dependents d'ATM (Fig 26A) o d'ATR (Fig 26B) no van limitar la degradació de HIF-1 o de PDHK1 observada quan s'indueïen DSB amb doxorubicina. Donat que les vies de resposta a dany no semblaven implicades en la modulació de HIF-1 es va optar per una hipòtesi alternativa. Alguns treballs han descrit, que de manera indirecta, els DSB poden estimular la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) dins la cèl·lula^{3,326,327}, per això es va procedir a analitzar el rol dels ROS com a possible mecanisme de senyalització de dany a l'ADN. Primerament, es van mesurar els nivells de ROS citosòlics, i es va observar que el model ID8-B, amb més dany crònic a l'ADN, tenien més ROS que les ID8-P, suggerint que les cèl·lules ID8-B presenten més estres oxidatiu (Fig 26C). Seguidament, es va analitzar si l'acumulació de DSB augmentava els nivells de ROS. Per això es van tractar les cèl·lules ID8-P amb inductors de DSB com la doxorubicina o la piridostatina (Fig 26D). Tal i com es va hipotetitzar, la inducció de DSB comportava un augment dels nivells de ROS. D'altra banda, l'ús de CDPP 5 μ M, que no induïx DSB, no produïa aquest augment (Fig 26D), reforçant la idea de que aquesta senyal és específica per l'increment de DSB, siguin provocats de manera aguda o en una situació crònica. Seguidament, es va valorar tant en el model ID8 com en el model SKOV3N l'expressió de NRF2, un factor de transcripció que actua com a sensor de ROS i que promou la resposta al estres oxidatiu (Fig 26E-H)²²⁸. En tots dos casos es va observar un augment de NRF2 en els models HRD. Finalment, per valorar si la

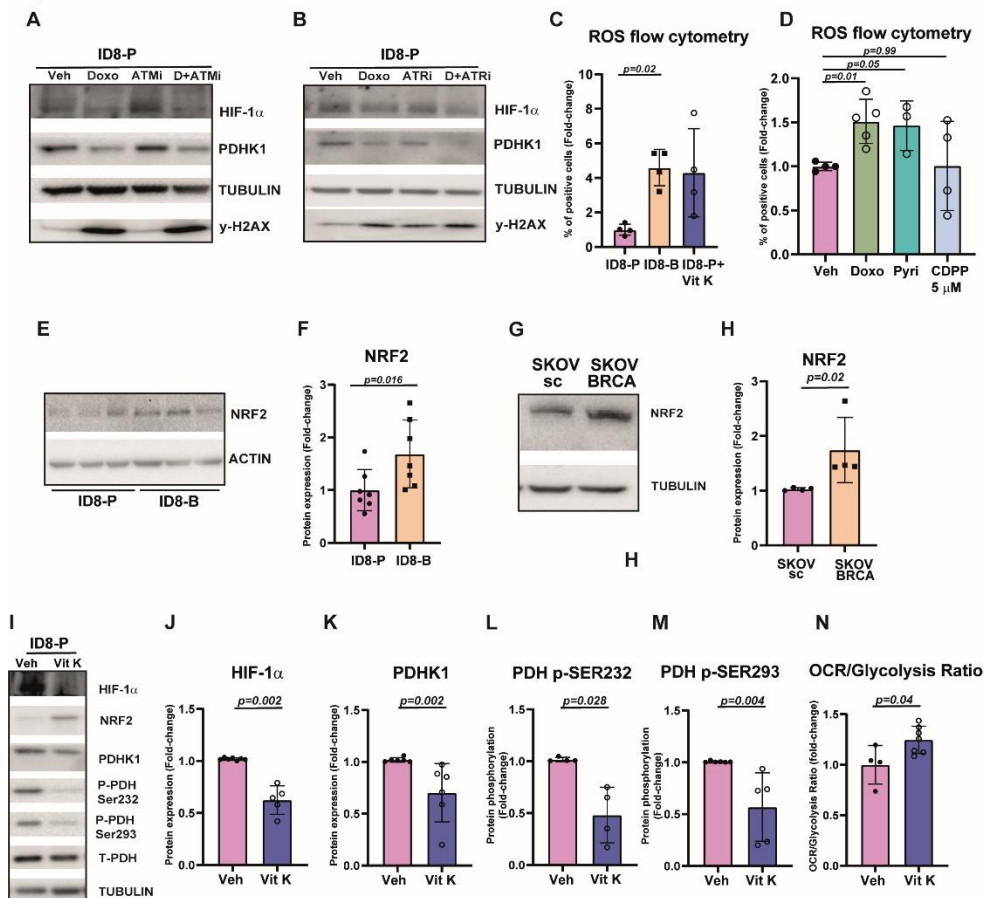
producció de ROS podia induir directament el canvi metabòlic cap a un metabolisme més oxidatiu, es va tractar les cèl·lules ID8-P amb Vitamina K3, un inductor de ROS (Fig 26I). L'acumulació de ROS degut a la Vitamina K3 va resultar suficient per produir els canvis moleculars i metabòlics que havíem observat amb el tractament d'inductors de DSB, és a dir, es va reprimir l'expressió de l'eix HIF-1/PDHK1 i en conseqüència es va observar l'augment del metabolisme oxidatiu (Fig 26I-N).

Degut a que l'acumulació de ROS era suficient per incrementar el metabolisme oxidatiu i, tenint en compte que NRF2 estava clarament

Figura 26: Els DSB promouen un increment de ROS que provoca un canvi cap al metabolisme oxidatiu. A) Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , PDHK1, així com la presència de γ -H2AX i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades amb vehicle (DMSO, veh), doxorubicina 0,4 μ M (Doxo) AZD1390 20nM (ATMi) i la combinació dels dos (D+ATMi). Es mostra una imatge representativa en cada panell. B) Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , PDHK1, així com la presència de γ -H2AX i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades amb vehicle (DMSO, veh), doxorubicina 0,4 μ M (Doxo) BAY-1895344 100nM (ATRI) i la combinació dels dos (D+ATRI). Es mostra una imatge representativa en cada panell. C) Quantificació dels ROS citosòlics en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) així com ID8-P pretractades amb Vitamina K3 10 μ M (VitK) 24 hores com a control positiu. D) Quantificació dels ROS citosòlics en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades 24h amb doxorubicina 0.4 μ M (Doxo), piridostatina 10 μ M (Pyri), o cisplatí 5 μ M (CDPP). E) Western blot analitzant la expressió de NRF2 i actina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B) amb la respectiva quantificació utilitzant actina com a control de càrrega (F). Es mostra una imatge representativa en cada panell. G) Western blot analitzant la expressió de NRF2 i actina com a control de càrrega en cèl·lules SKOV3N (SKOV-sc) i SKOV3N *BRCA2* KO (SKOV-BRCA) amb la respectiva quantificació utilitzant actina com a control de càrrega (H). Es mostra una imatge representativa en cada panell. I) Western blot analitzant la expressió de NRF2, HIF-1 α , PDHK1, PDH total i la fosforilació de la PDH a la serina 232 i 293 així com els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades amb Vitamina K3 10 μ M (VitK) 24 hores amb les respectives quantificacions (J-M) utilitzant tubulina com a control de càrrega. N) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades amb Vitamina K3 10 μ M (VitK) 24 hores. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

estimulat en els models HRD, es va hipotetitzar que aquest factor de transcripció podia ser un dels mediadors que promoguessin els canvis moleculars associats a la adaptació metabòlica al increment de DSB. Per validar aquesta hipòtesi es van mesurar els nivells de NRF2 induït DSB, tant amb irinotecan (Fig 27A-B) com amb piridostatina (Fig 27C-D) En tots els casos s'observava un augment de NRF2. Notablement, la doxorubicina també induïa l'expressió de NRF2, i quan s'utilitzava un antioxidant com el NAC en combinació amb la doxorubicina aquesta inducció es revertia (Fig 27E). Notoriament, l'ús de NAC prevenia la repressió de l'eix HIF-1/PDHK1 produït per la doxorubicina (Fig 27E-H) així com també reduïa els seus efectes metabòlics (Fig 27I) impedit el canvi cap al metabolisme oxidatiu.

Fig. 26



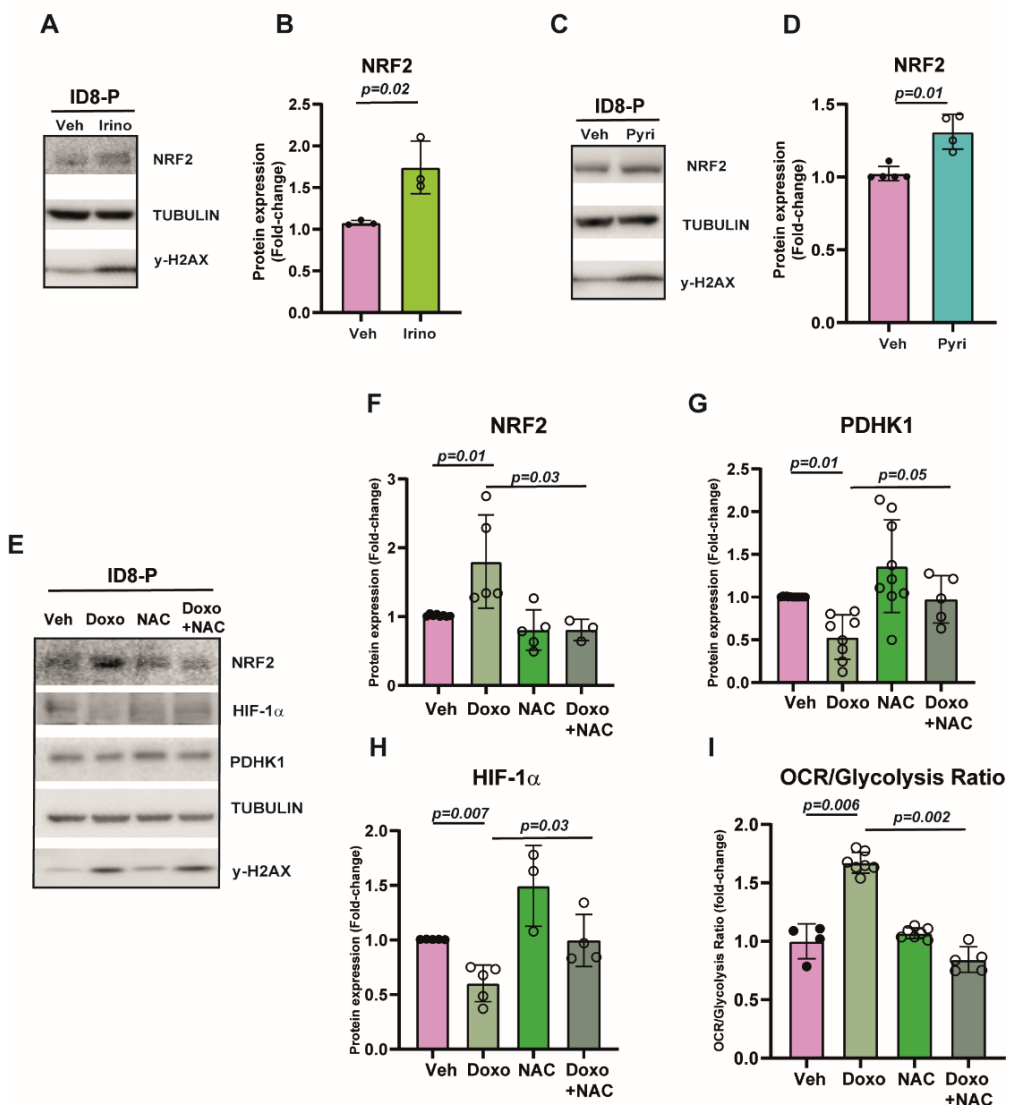
A continuació es va voler valorar si l'activació de NRF2 era necessària per la promoció d'aquest canvi metabòlic o era una conseqüència secundària de l'acumulació de ROS. Per això es va emprar un estabilitzador de NRF2, el dimetilfumarat (DMF)³²⁸(Fig 28). L'ús d'aquest compost en les cèl·lules ID8-P va provocar l'esperat augment de NRF2 seguit d'una baixada dels nivells de HIF-1 α així com de la PDHK1 i de les fosforilacions de la PDH (Fig 28A-E). Addicionalment, es va mesurar la ràtio OCR/glicòlisi i es va observar que les cèl·lules tractades amb DMF presentaven un augment en el metabolisme oxidatiu (Fig 28F). Finalment, es va comprovar que l'estabilització de NRF2 degut al DMF no produïa un augment dels nivells de ROS (Fig 28G). Tot això suggeria que l'estabilització de NRF2 era necessària per produir el canvi metabòlic.

Per confirmar la implicació de NRF2, es va procedir a silenciar la seva expressió en les cèl·lules ID8-P i en les cèl·lules ID8-B. Es va observar que amb el tractament de doxorubicina, les ID8-P amb el shRNA contra *Nfe2l2* no podien promoure l'expressió dels gens sota control transcripcional de

Figura 27: La inhibició dels ROS promoguda pels DSB impedeix el canvi metabòlic cap el metabolisme oxidatiu. A) Western blot analitzant l'expressió de NRF2, així com la presència de γ -H2AX i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades amb vehicle (DMSO, veh), irinotecan 50 μ M (Irinot) (A) o piridostatina 10 μ M (Pyri) (C) amb les respectives quantificacions utilitzant tubulina com a control de càrrega (B per Irinotecan, D per Piridostatina). Es mostra una imatge representativa en cada panell. E) Western blot analitzant l'expressió de NRF2, PDHK1, així com la presència de γ -H2AX i tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades 24h amb vehicle (DMSO, veh), doxorubicina 0,4 μ M (Doxo) N-acetil cisteïna 1mM (NAC) i la combinació dels dos (Doxo+NAC) amb les respectives quantificacions (F-H) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. I) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades 24h amb vehicle (DMSO, veh), doxorubicina 0.4 μ M (Doxo) N-acetil cisteïna 1mM (NAC) i la combinació dels dos (Doxo+NAC). Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

NRF2 (Fig 29A). Adicionalment, es va observar que tant l'activitat transcripcional de HIF-1 no es veia reprimida, així com també es mantenia l'expressió de *Pdk1* (Fig 29A). A més, a nivell de proteïna, les cèl·lules amb el shRNA contra *Nfe2l2* no podien inhibir l'expressió de HIF-1 α així com de PDHK1 quan es tractaven amb doxorubicina (Fig 29B-D). Per altra banda, les cèl·lules ID8-B que expressaven el shRNA contra NRF2, tenien un augment

Fig. 27



de la expressió de HIF-1 α i PDHK1 (Fig29 E-G), suggerint que els efectes del dany crònic a l'ADN en aquesta via podien ser parcialment revertits i demostrant que NRF2 és un mitjancer clau en aquest canvi metabòlic.

Figura 28: La inducció de NRF2 independent de ROS també indueix el metabolisme oxidatiu. A) Western blot analitzant l'expressió de NRF2, HIF-1 α , PDHK1, PDH total així com la presència de γ -H2AX i la fosforilació de la PDH a la serina 232 i 293 així com els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades amb vehicle (DMSO, veh) o dimetilfumarat 10 μ M (DMF) amb les respectives quantificacions (B-E) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. F) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades amb dimetil fumarat 10 μ M (DMF) 24 hores. G) Quantificació dels ROS citosòlics en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) pretractades 24h amb dimetil fumarat 10 μ M (DMF), Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 28

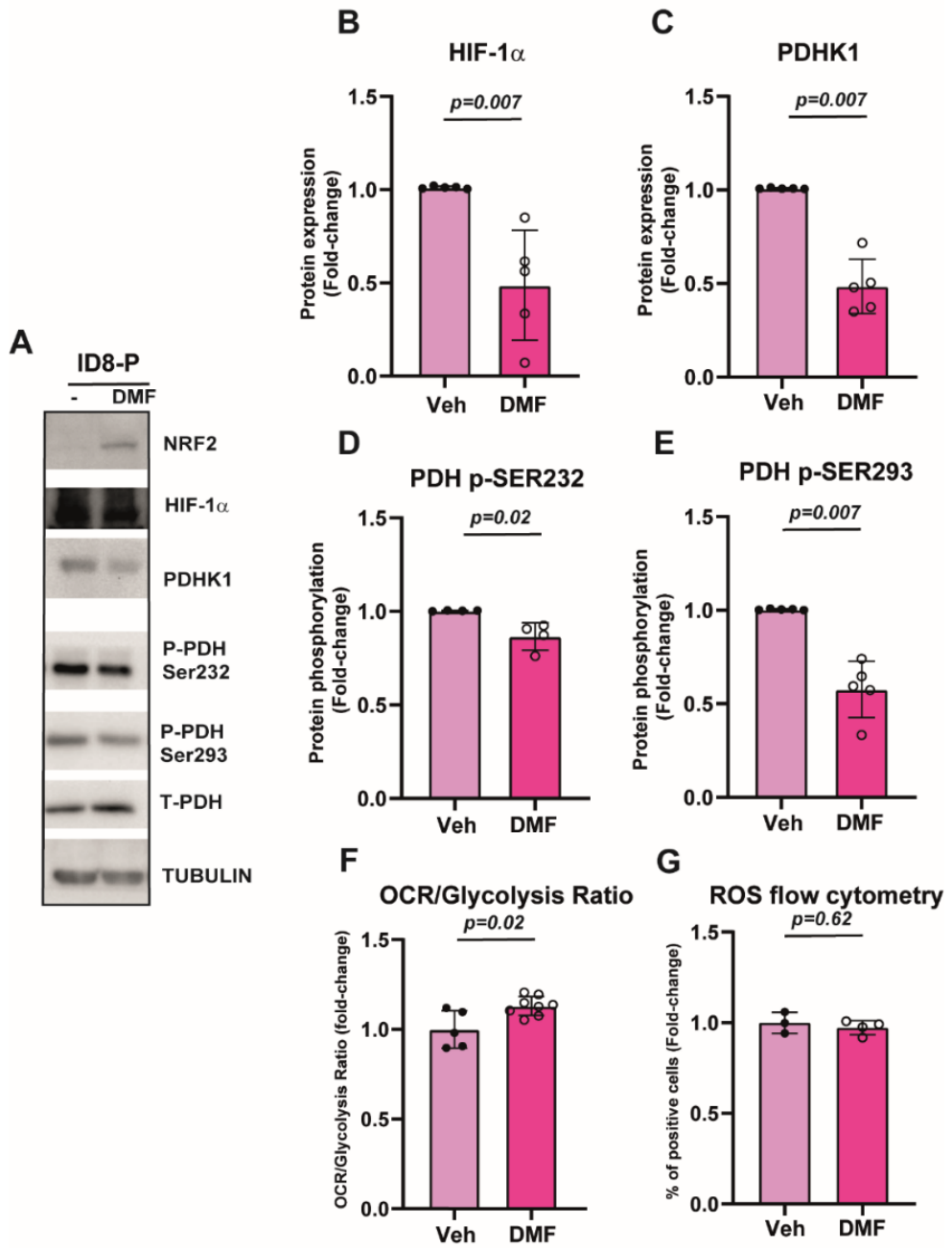
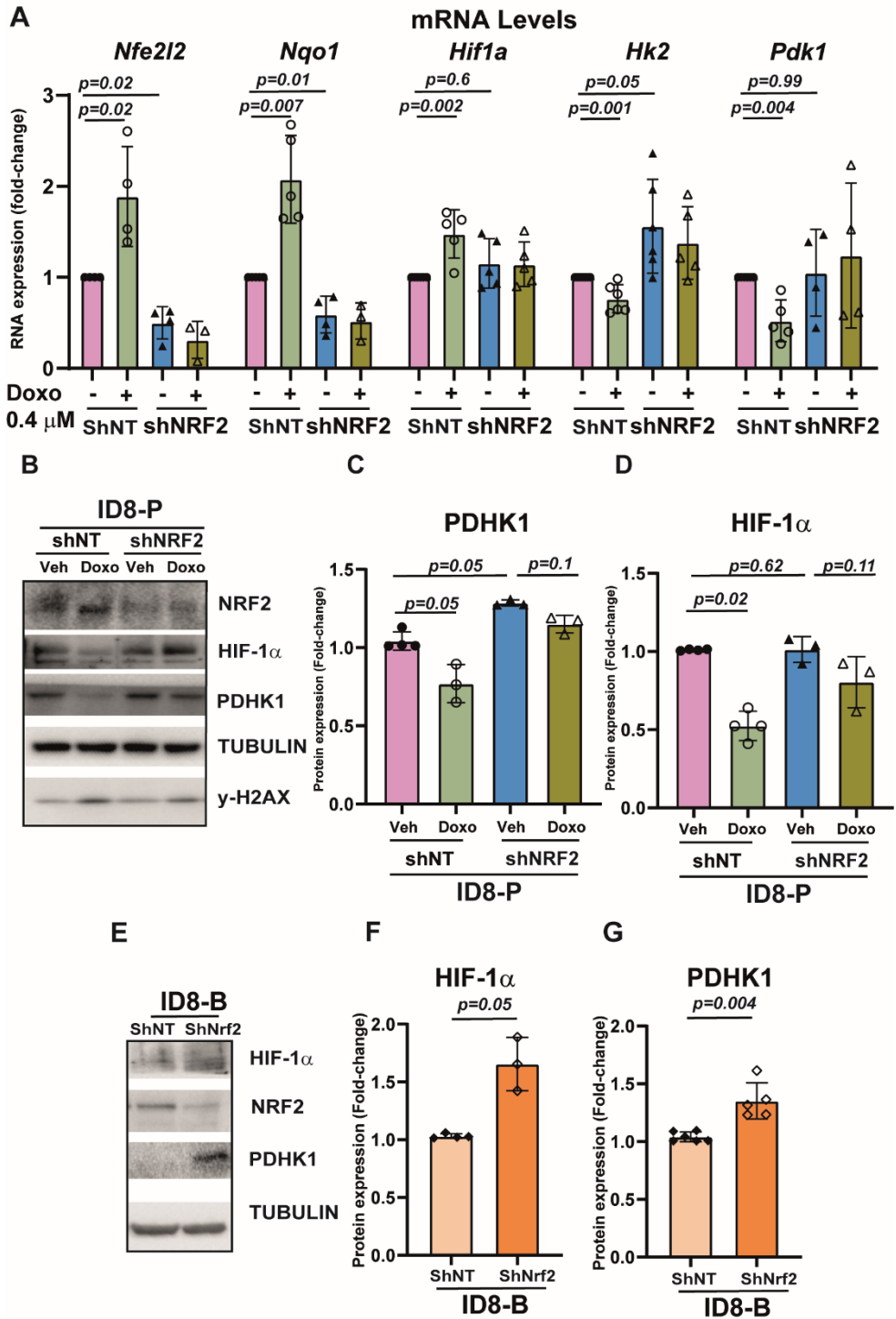


Figura 29: NRF2 és necessari per reprimir l'eix HIF-1/PDHK1. A) Nivells de mRNA dels gens *Nfe2l2*, *Nqo1*, *Hk2*, *Pdk1* en cèl·lules ID8-P control (shNT) o ID8-P amb un knockdown de *Nfe2l2* (shNRF2) pretractades 24h amb vehicle (DMSO) o 0,4µM doxorubicina (Doxo). B) Western blot analitzant l'expressió de NRF2, HIF-1α, PDHK1, així com la presència de γ-H2AX i els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-P control (shNT) o ID8-P amb un knockdown de *Nfe2l2* (shNRF2) pretractades 24h amb vehicle (DMSO) o 0,4µM doxorubicina (Doxo) amb les respectives quantificacions (C-D) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. E) Western blot analitzant l'expressió de NRF2, HIF-1α, PDHK1, així com els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-B control (shNT) o ID8-B amb un knockdown de *Nfe2l2* (shNRF2) amb les respectives quantificacions (F-G) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 29



3. La combinació d'inhibidors de l'OXPPOS amb inductors de DSB té un efecte sinèrgic en el creixement tumoral *in-vitro* i *in-vivo*

3.1. La inducció de DSB combinada amb la inhibició de HIF-1 o l'activació de NRF2 no incrementa la mort sinèrgicament

En vista d'aquests resultats es va voler analitzar si el mecanisme descrit podia ser aprofitat com una diana terapèutica per millorar la resposta a la quimioteràpia. De manera resumida, el model descrit fins ara (Fig 30) parteix de la base que l'acumulació de DSB, sigui quin sigui l'origen, provoca un augment dels nivells de ROS que promouen l'estabilització de NRF2. Aquest factor de transcripció és capaç de reprimir l'activitat de HIF-1, reduint els nivells de PDHK1 i augmentant l'activitat de la PDH, cosa que comporta un augment del flux de carboni cap al metabolisme oxidatiu. L'increment d'OXPPOS augmenta la disponibilitat d'ATP així com de NAD⁺, que promouen l'activitat de PARP1 per facilitar la reparació de l'ADN danyat³²⁹. Per tant, la regulació de NRF2/HIF-1 és un reòstat clau en el control de la plasticitat metabòlica. Per això es va decidir examinar si modificant l'activitat d'aquesta via produïa canvis en la sensibilitat a inductors de DSB en les cèl·lules tumorals.

Per comprovar aquesta hipòtesi, es van dur a terme assajos de sinèrgia per avaluar l'efectivitat d'aquestes combinacions. En l'assaig de sinèrgia es va valorar la combinació de dos fàrmacs. Per això es va generar una matriu de la viabilitat cel·lular on en cada punt les cèl·lules eren tractades amb diferents dosis de cada fàrmac, generant 49 combinacions diferents. Cada una d'aquestes combinacions era relativitzada a la condició control, que

només havia estat tractada amb els respectius vehicles de cada fàrmac. Un cop s'ha generat la matriu de viabilitat aquesta era analitzada amb el software CombeneFit³³⁰, que permetia calcular l'efecte sinèrgic de cada combinació (Fig 31A). Quant més elevat és el valor obtingut més sinèrgica és la combinació, en canvi, quant més negatiu fos el valor, més antagonística és la combinació (és a dir, que augmenta la resistència al tractament). Valors propers a 0 indiquen que no hi ha sinèrgia, només un efecte sumatiu dels dos fàrmacs.

Fig 30

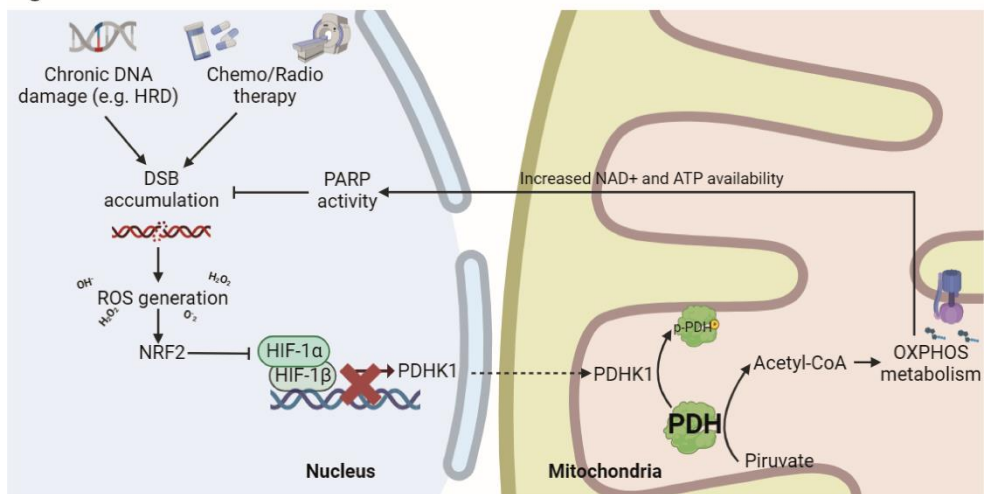


Figura 30: Esquema del mecanisme de resposta a DSB que comporta l'activació del metabolisme oxidatiu.

Per aquests anàlisis es va utilitzar doxorubicina com agent inductor de DSB ja que és emprada en tumors d'ovari resistent a platí així com en càncer de mama metastàtic entre d'altres tipus tumorals⁸⁶. Primerament es va analitzar l'efecte combinant la doxorubicina amb l'inhibidor de HIF-1 (PX-478) o amb l'activador de NRF2 (DMF). En cap dels dos casos la combinació va comportar cap efecte sinèrgic (Fig 31B-C), no obstant es va observar un lleuger efecte sumatiu. Es va confirmar el resultat d'aquests assaigs duent a terme les IC50 a doxorubicina (Fig 31D-E) en presència de l'inhibidor de HIF

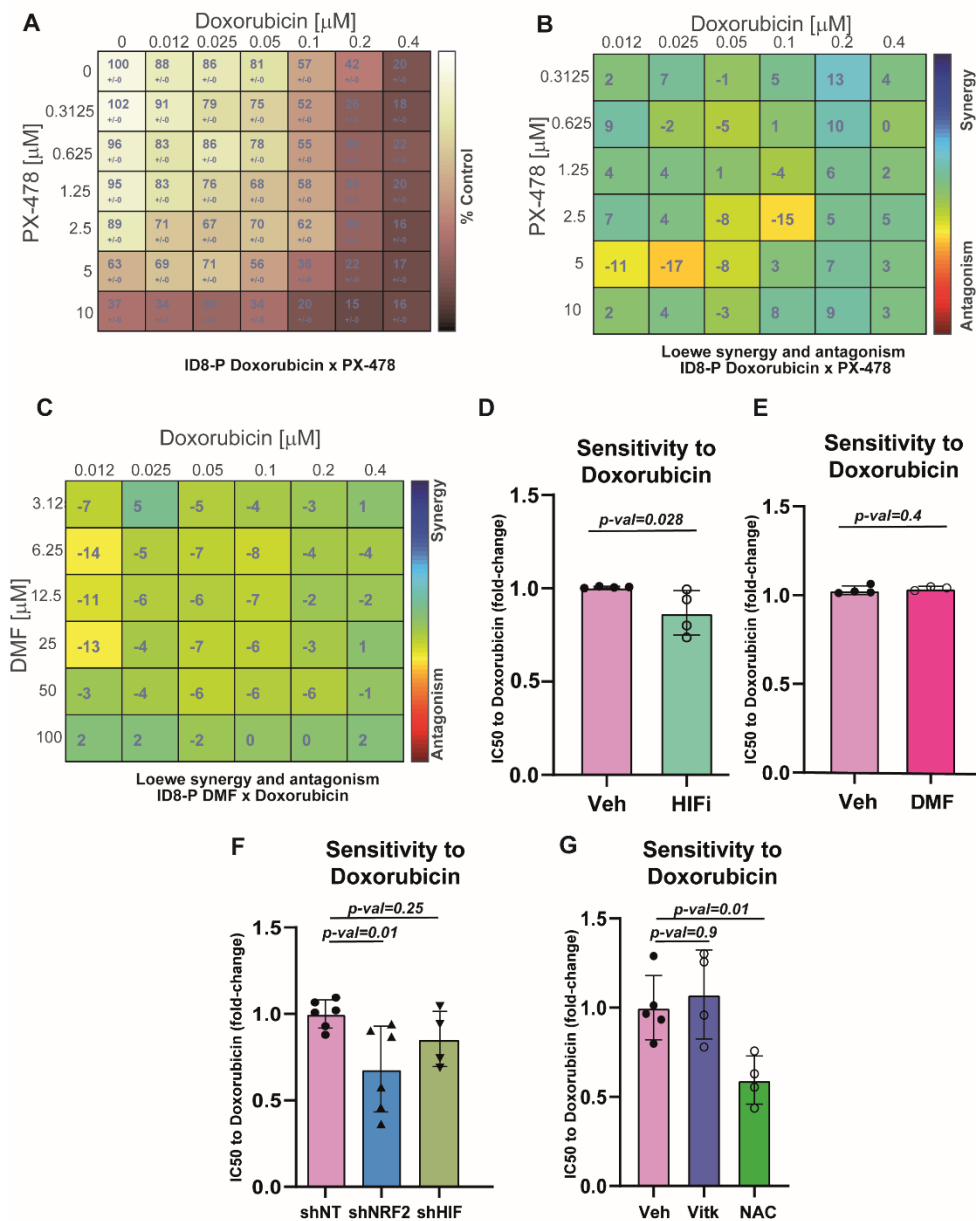
o en presència de DMF on no es va observar canvis importants en la sensibilitat a doxorubicina. Tot i que no es va contemplar en el moment inicial, es va raonar que en ambdues combinacions els dos fàrmacs acabaven promovent un efecte similar: la reducció de l'activitat de HIF-1. Per això, es va assumir la possibilitat de que aquestes combinacions no tinguessin un efecte sinèrgic.

Finalment, per acabar de confirmar aquesta hipòtesi es van utilitzar els models genèticament modificats generats amb anterioritat per mesurar la seva sensibilitat a doxorubicina (Fig 31F). Coherentment amb els efectes observats amb el PX-478, les cèl·lules expressant el shRNA contra *Hif1a* no van presentar cap canvi en la sensibilitat a doxorubicina (Fig 31F). En canvi, el shRNA contra *Nfe2l2*, presentava un increment en la sensibilitat al fàrmac, suggerint que l'activació de NRF2 és necessària per una correcta resposta a l'acumulació de DSB. Això va ser confirmat duent a terme el mateix assaig tractant les cèl·lules ID8-P amb un inductor de ROS (Vitamina K3), que no va produir cap efecte, i un antioxidant (NAC). La presència de NAC, que impedia

Figura 31: La inhibició de HIF-1 o l'activació de NRF2 no sensibilitzen sinèrgicament a inductors de DSB. A) Matriu de viabilitat de cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) incubades amb diferents dosis de doxorubicina i PX-478. Les cèl·lules es van sembrar i tractar amb els fàrmacs indicats en les diferents dosis mostrades durant 72 hores. B-C) Matriu de sinèrgia de cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) incubades amb diferents dosis de doxorubicina i PX-478 (B) o dimetilfumarat (DMF) (C). Les cèl·lules es van sembrar i tractar amb els fàrmacs indicats en les diferents dosis mostrades durant 72 hores. D-E) Gràfic mostrant la IC50 a doxorubicina en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades amb vehicle (DMSO), PX-478 5µM (HIFi) (D) o dimetil fumarat 10µM (DMF) (E) i amb dosis creixents de doxorubicina durant 72 hores. F) Gràfic mostrant la IC50 a doxorubicina en cèl·lules ID8-P control (shNT), ID8-P amb un knockdown de *Nfe2l2* (shNRF2) o ID8-P amb un knockdown de *Hif1a* (shHIF). G) Gràfic mostrant la IC50 a doxorubicina en cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) tractades amb vehicle (DMSO), Vitamina K3 10µM (Vitk) (D) o N-acetil cisteïna 0,5mM (NAC) (E) i amb dosis creixents de doxorubicina durant 72 hores. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

l'activació de NRF2, va augmentar la sensibilitat a doxorubicina, confirmant els resultats obtinguts amb el shRNA i demostrant el rol indispensable de NRF2 en la resposta a l'acumulació de DSB (Fig 31G).

Fig. 31



3.2. La inhibició del metabolisme oxidatiu amb la inducció de DSB redueix el creixement tumoral

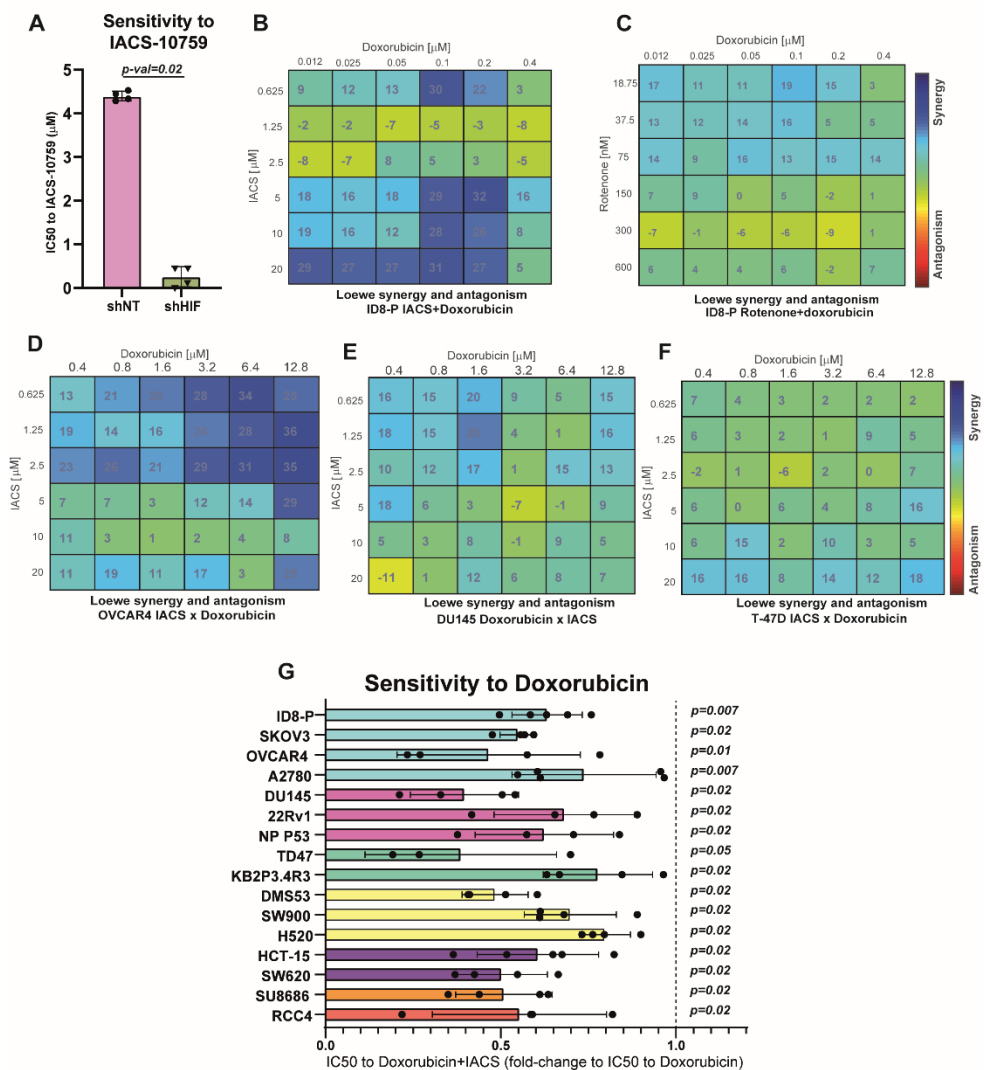
En paral·lel, es va testar si les cèl·lules que expressaven el shRNA contra *Hif1a* eren més sensibles a inhibidors del metabolisme oxidatiu, com IACS-10759, un inhibidor del complex I de la cadena respiratòria²⁷⁸ (Fig 32A). Es va observar que les cèl·lules amb el shRNA eren 10 vegades més sensibles a IACS. Per això es va hipotetitzar que la combinació d'inductors de DSB amb inhibidors de OXPHOS podria ser sinèrgica, ja que els DSB promouen una dependència cap al metabolisme oxidatiu. Duent a terme l'assaig de sinèrgia en les cèl·lules ID8-P, es va observar que la combinació era altament sinèrgica (Fig 32B). Resultats similars es van observar amb l'ús d'un altre inhibidor del complex I, la rotenona (Fig 32C). Per reforçar aquesta observació, es va dur a terme el mateix assaig en línies de càncer d'ovari (OVCAR4), així com de pròstata (DU145) o de mama (T-47D) (Fig 32D-F), on es va observar la mateixa tendència en tots els casos. Addicionalment, es van validar aquestes observacions, duent a terme la IC50 de doxorubicina en un panell de diferent

línies cel·lulars de diferents tipus tumorals (Fig 32G), incloent línies de càncer

Figura 32: La inhibició del metabolisme oxidatiu augmenta sinèrgicament la sensibilitat a inductors de DSB *in-vitro*. A) Gràfic mostrant la IC50 a IACS-10759 en cèl·lules ID8-P control (shNT) i ID8-P amb un knockdown de *Hif1a* (shHIF). B-C) Matriu de sinèrgia de cèl·lules ID8-*Trp53* KO (ID8-P) incubades amb diferents dosis de doxorubicina i IACS-10759 (B) o rotenona (C). Les cèl·lules es van sembrar i tractar amb els fàrmacs indicats en les diferents dosis mostrades durant 72 hores. D-F) Matriu de sinèrgia de cèl·lules OVCAR4 (D), DU145 (E), T-47D (F) incubades amb diferents dosis de doxorubicina i IACS-10759. Les cèl·lules es van sembrar i tractar amb els fàrmacs indicats en les diferents dosis mostrades durant 72 hores. G) Gràfic mostrant el *fold-change* de la IC50 a doxorubicina+IACS relativitzada a la IC50 a doxorubicina sola en un panell de diferents línies tumorals. Les cèl·lules es van tractar amb vehicle o amb IACS-10759 (5µM per ID8-P, SKOV3N, OVCAR4, DU145, T-47D, DMS53, SW900, H520, HCT-15, SU8686, RCC4; 1µM per A2780 i KB2P3.4R3; 0,5µM per 22Rv1; i 10nM per NP P53) i després amb concentracions creixents de doxorubicina. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan P<0,05. El P-valor es troba indicat a cada figura.

d'ovari (ID8-P, SKOV3N, OVCAR4, A2780), de pròstata (DU145, 22Rv1, NP P53), de mama (T-47D, KB2P3.4R3) així com de pulmó (DMS53, SW900, H520), de colon (HCT-15, SW620), de pàncrees (SU8686) i de càncer renal (RCC4). Per a totes les línies testades, es va observar sempre un augment de la sensibilitat a doxorubicina en presència de IACS, independentment del estatut de HR de la línia cel·lular³³¹.

Fig. 32



Per valorar l'eficàcia de la combinació, i la seva possible translació a la clínica, es va procedir a dur a terme experiments *in-vivo*, tractant ratolins amb quimioteràpia (doxorubicina) i inhibidors del metabolisme oxidatiu (IACS). Es va procedir a la implantació de 2 milions de cèl·lules ID8-P en el ovari dret de ratolins C57BL6J, i després de 4 setmanes de creixement es va iniciar el tractament. Donat els potencials efectes secundaris de l'IACS i la seva limitada eficàcia com a monoteràpia, es va optar per una dosi molt baixa d'aquest (0,3mg/kg), que és entre 8 i 30 vegades menor a la emprada en altres estudis similars. Es va hipotetitzar que l'ús de dosis baixes del fàrmac encara impediria el creixement tumoral, evitant efectes secundaris quan es combinés amb doxorubicina. Per la quimioteràpia es va utilitzar doxorubicina pegilada liposomal (Caelyx, 2mg/kg), que és la formulació emprada rutinàriament per tractar el càncer d'ovari. Durant el transcurs de tot l'experiment es va monitoritzar el pes i els nivells de lactat i glucosa en sang per identificar qualsevol efecte advers relacionat amb la inhibició hepàtica de la gluconeogènesi i la funció muscular, efectes secundaris de la inhibició de OXPHOS, però no es va observar cap canvi significatiu atribuïble al tractament (Fig 33A-C). Com es va hipotetitzar, les dosis baixes de IACS com a monoteràpia no va produir cap efecte significatiu en el creixement tumoral. Al contrari, la doxorubicina sola va reduir el volum tumoral un 80%. No obstant la combinació de doxorubicina+IACS va reduir el volum tumoral fins al 95%, una millora notable comparant amb el grup de la doxorubicina com a monoteràpia (Fig 33D). Donat aquests resultats, es va decidir explorar el potencial sinèrgic d'aquesta combinació, reduint encara més la dosi dels dos fàrmacs: d'IACS de 0,3mg/kg a 0,1mg/kg i de Caelyx de 2mg/kg a 0,25 mg/kg. A aquestes concentracions cap tractament individual va produir un efecte significatiu en el creixement del tumor, en canvi, la combinació dels dos fàrmacs va reduir el creixement tumoral un 66% (Fig 33E), reforçant la

idea de la capacitat sinèrgica de la combinació així com la seguretat d'aquesta.

Fig. 33

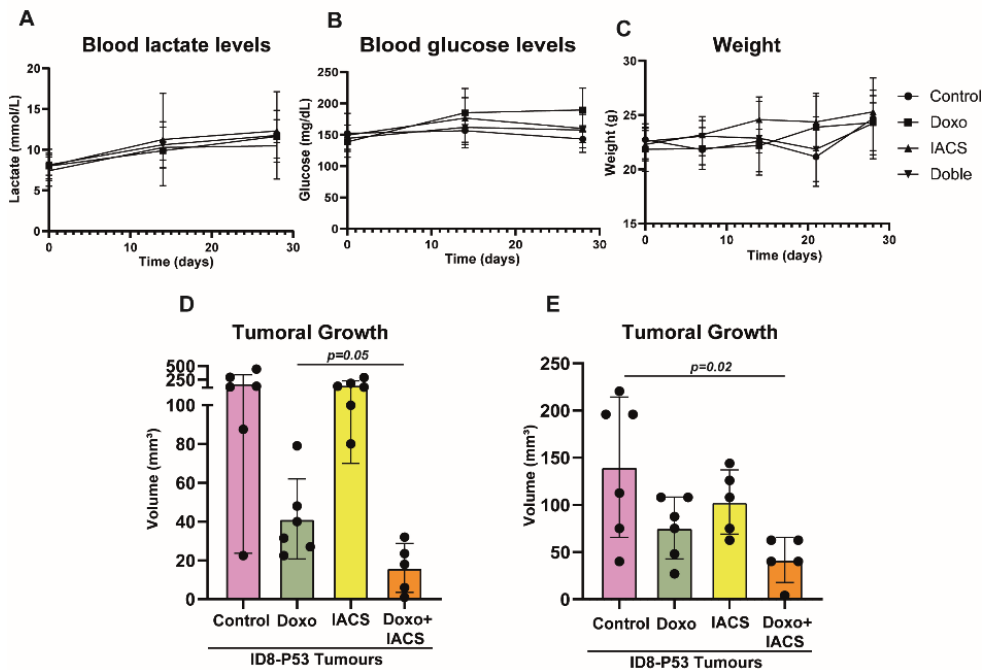


Figura 33: La inducció de DSB i l'ús de inhibidors del metabolisme oxidatiu té un efecte sinèrgic en la reducció del volum tumoral. A-C) Gràfics mostrant l'evolució del lactat (A) i la glucosa en sang (B) o el pes dels ratolins (C) al llarg del període de tractament. El dia 0 és el dia d'inici del tractament. D) Gràfic mostrant el volum del tumor primari. Els ratolins es van tractar amb vehicle (Control; 100 µL de salí 5% glucosa via intraperitoneal un cop per setmana, 200 µL de carboximetil cel·lulosa via oral en un règim de 5 dies de tractament, dos de descans) amb doxorubicina (Doxo, 2mg/kg via intraperitoneal un cop per setmana, 200 µL de carboximetil cel·lulosa via oral en un règim de 5 dies de tractament, dos de descans) i la combinació (Doxo+IACS, Doxo, 2mg/kg via intraperitoneal un cop per setmana 0,3 mg/kg IACS-10759 dissolt en carboximetil cel·lulosa via oral en un règim de 5 dies de tractament, dos de descans). E) Gràfic mostrant el volum del tumor primari. Els ratolins es van tractar amb vehicle, doxorubicina (Doxo, 0,25mg/kg), IACS-10759 (IACS, 0,1 mg/kg) i la combinació (Doxo+IACS, Doxo, 0,25 mg/kg, 0,1 mg/kg IACS-10759) seguint la mateixa posologia que en D). Les dades es presenten com la mitjana ± SD i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

4. L'adquisició d'un metabolisme més glicolític promou la resistència a PARPi

4.1. El preconditionament metabòlic modifica la resposta a PARPi en cèl·lules naïve

El meu grup havia demostrat prèviament que la modulació del metabolisme també afectava a la sensibilitat a PARPi³⁰⁴, en els models ID8. En el model ID8-P, competent per HR, la promoció d'un metabolisme oxidatiu sensibilitzava a PARPi, mentre que bloquejant aquest metabolisme en el model ID8-B (deficient per HR), aquestes cèl·lules es tornaven més resistents. Aquest últim fet, era completament contra intuïtiu, ja que per separat les cèl·lules ID8-B al ser més oxidatives eren més sensibles a inhibidors de OXPHOS, i al ser KO pel gen *Brca2*, eren més sensibles a PARPi. Per això, aquestes observacions posaven en valor el rol del metabolisme en regular la sensibilitat a aquests inhibidors. Primerament, es va decidir validar aquestes observacions amb altres fàrmacs i en altres models. Vista la importància de l'activitat de la PDH en la regulació de la plasticitat metabòlica, es va emprar un inhibidor altament específic contra totes les isoformes de la PDHK (VER-246608), en els models competents per HR, per així augmentar l'activitat de la PDH i els OXPHOS. En contraposició, per disminuir l'activitat de la PDH, degut a que no existeixen inhibidors específics de la PDH, en els models HRD es va optar per restringir l'accés al seu substrat, impedit l'entrada del piruvat al mitocondri, fent servir un inhibidor del transportador mitocondrial de piruvat (MPCi; GW604714X). Addicionalment, es va fer servir el inhibidor de HIF-1 (PX-478) en els models HRP, com a inhibidor del metabolisme glicolític, així com rotenona (inhibidor del complex I) en els models HRD com un inhibidor del metabolisme oxidatiu. Es van seleccionar diferents línies cel·lulars HRP tant d'ovari (ID8-P, OVCAR4) així com de pròstata (DU145), així com línies amb defectes en HR

(ID8-B, A2780 d'ovari mutada en el gen *ATM*; 22Rv1 de pròstata amb mutacions al gen *BRCA2*). Per valorar com es modificava la sensibilitat de les diferents línies als PARPi es va decidir utilitzar la IC50 com a paràmetre de sensibilitat al fàrmac. Primerament es va observar que en tots els casos en

Fig. 34

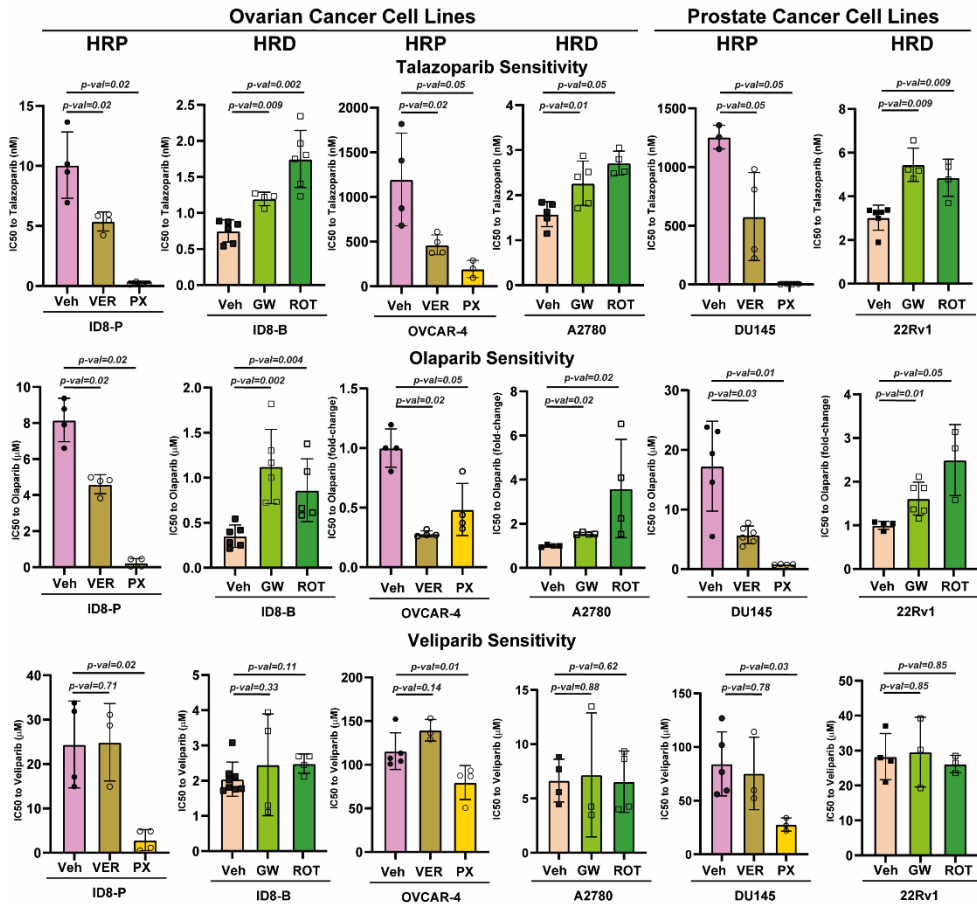


Figura 34: El estatus metabòlic de les cèl·lules tumorals modula la sensibilitat a PARPi. Gràfic mostrant la IC50 a Talazoparib (primera fila), a Olaparib (segona fila) i Veliparib (tercera fila) de diferents línies tumorals. Les cèl·lules es van tractar amb vehicle, amb VER-246608 500nM (VER), amb PX-478 5μM (PX), amb GW-604714 250nM (GW) o amb rotenona 5nM (ROT) i després amb concentracions creixents del corresponent PARPi. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

els models HRP presentaven una sensibilitat augmentada a Olaparib quan s'indueïa un metabolisme oxidatiu tant amb l'inhibidor de les PDHK, però de manera més acusada, quan s'emprava el inhibidor de HIF-1 (Fig 34). En els models HRD quan es bloquejava el metabolisme oxidatiu amb rotenona o el MPCi, es feien més resistent a Olaparib. Consistentment, el mateix patró es va observar utilitzant talazoparib, un altre PARPi (Fig 34), però van ser diferents per un tercer PARPi, el Veliparib. L'ús de Veliparib, va fer desaparèixer aquestes diferències en la majoria de casos (Fig 34), i només s'observava una reducció de la IC50 quan es combinava amb el inhibidor de HIF-1. El Veliparib és un PARPi que presenta un mecanisme d'acció diferent a la resta de PARPi. Mentre que la majoria de PARPi tenen un efecte dual, competint amb el NAD^+ per unir-se al centre actiu i impedit la desvinculació

Fig. 35

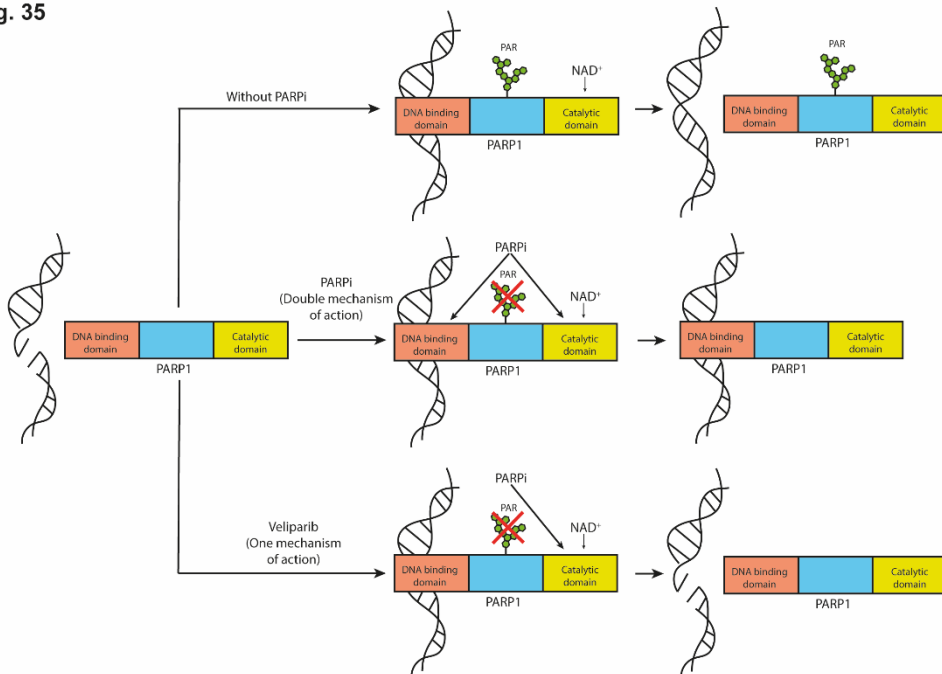


Figura 35: Mecanismes d'acció dels PARPi segons el model de Murai et al.⁹⁹
PARPi=Inhibidor de PARP PAR=Poli-ADP-ribosilació

de PARP1 de la cromatina (mecanisme conegut com *trapping*), el veliparib només presenta el primer d'aquests (inhibició del centre actiu) (Fig 35).

Per comprovar si la modulació metabòlica té un rol preferent sobre la modificació de la unió a la cromatina de PARP1, es va procedir a estudiar l'efecte d'aquests inhibidors amb Novobiocina, un inhibidor de Pol θ , l'ADN polimerasa dependent de l'activitat de PARP1, i que finalitza la via de reparació de l'A-EJ. Es va observar que la IC50 a Novobiocina en cèl·lules ID8-P i ID8-B era similar (Fig 36A), ni es veien modificacions en la sensibilitat a Novobiocina amb l'ús dels diferents inhibidors emprats anteriorment (Fig 36B). L'única combinació efectiva que es mantenia era amb l'inhibidor de HIF-1, tal i com s'havia observat amb l'ús de veliparib.

Recentment, un treball conjunt del meu grup en col·laboració amb els grups dels Dr. Miquel Angel Pujana i Dr. Alvaro Aytés, ha descrit que HIF-1 té un paper reprimint l'expressió dels gens de la via d'A-EJ i promovent mecanismes de reparació alternatius (Espin et al, en revisió). La inhibició de HIF-1 promou la expressió de gens de A-EJ, com *POLQ* i *PARP1*, i augmenta l'ús de l'A-EJ com a mecanisme de reparació per sobre de la recombinació homòloga. Aquest fet contribuiria a explicar l'efectivitat del inhibidor de HIF-1 com a fàrmac sensibilitzador a PARPi més enllà dels seus possibles efectes metabòlics, i en conseqüència la seva relació en les dinàmiques del *trapping* de PARP1 a la cromatina. Així, en condicions d'hipòxia, els models HRD promouen un metabolisme glicolític (Fig 37), probablement de manera dependent de HIF-1, i es fan més resistents a la inhibició de PARP1 independentment de quin PARPi s'utilitzi (Fig 38).

Fig. 36

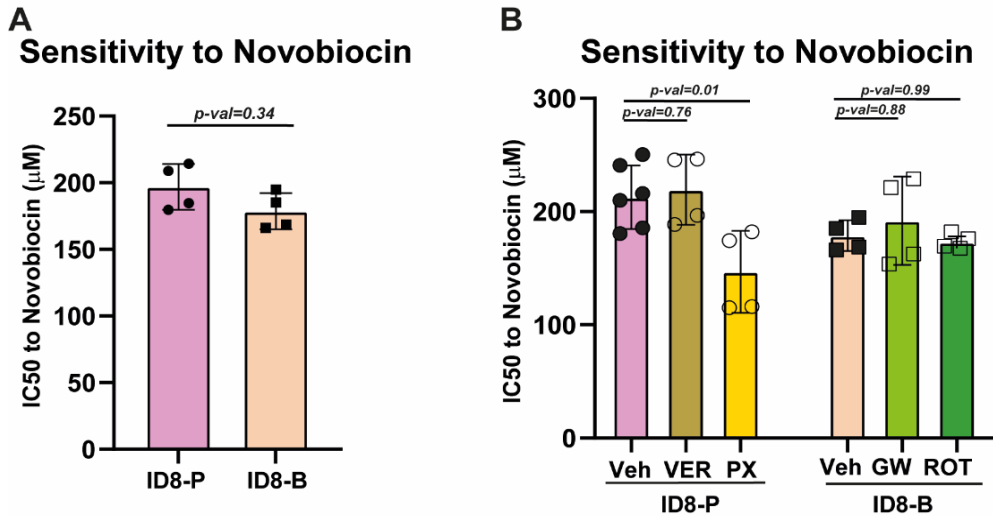


Figura 36: El estatus metabòlic no modifica la sensibilitat a inhibidors d'altres efectors de la via d'A-EJ. A) Gràfic mostrant la IC50 a Novobiocina de ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B). Les cèl·lules es van tractar amb concentracions creixents de Novobiocina. B) Gràfic mostrant la IC50 a Novobiocina de ID8-*Trp53* KO (ID8-P) i ID8-*Trp53 Brca2* KO (ID8-B). Les cèl·lules es van tractar amb vehicle, amb VER-246608 500nM (VER), amb PX-478 5μM (PX), amb GW-604714 250nM (GW) o amb rotenona 5nM (ROT) i després amb concentracions creixents de Novobiocina. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 37

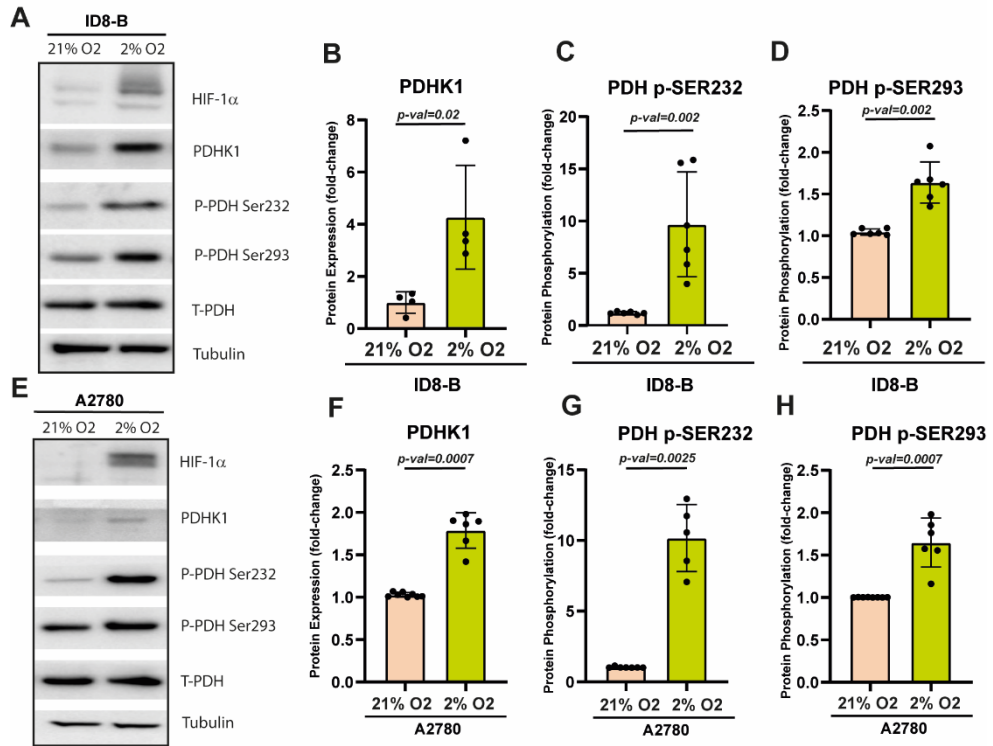


Figura 37: Cèl·lules amb HRD crescudes en hipòxia són capaces d'activar HIF-1 i augmentar el metabolisme glicolític A) Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , PDHK1, PDH-T així com les fosforilacions de la PDH i els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-B control o crescudes en hipòxia (2% O₂) durant 24h amb les respectives quantificacions (B-D) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. E) Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , PDHK1, PDH-T així com les fosforilacions de la PDH i els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules A2780 control o crescudes en hipòxia (2% O₂) durant 24h amb les respectives quantificacions (F-H) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 38

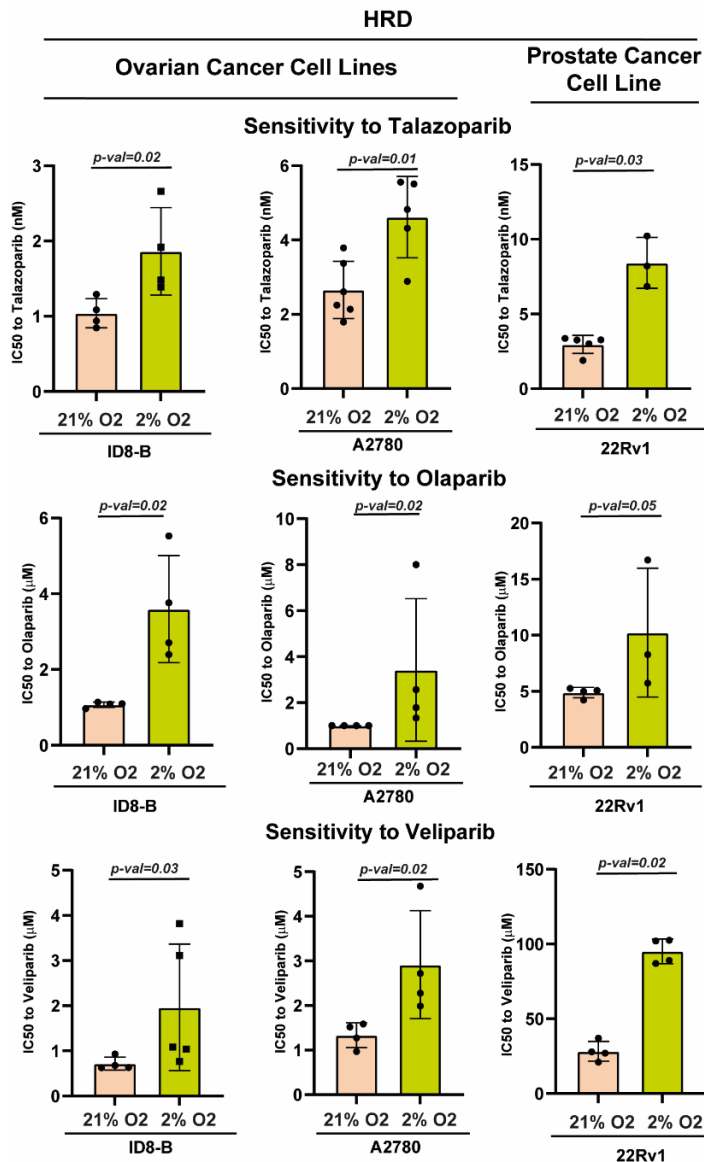


Figura 38: La hipòxia augmenta la resistència a PARPi en cèl·lules HRD. Gràfic mostrant la IC50 a Talazoparib (primera fila), a Olaparib (segona fila) i Veliparib (tercera fila) de diferents línies tumorals amb HRD. Les cèl·lules es van cultivar en normòxia o en hipòxia (2%) O2 i en concentracions creixents del corresponent PARPi durant 72 hores. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

4.2. Generació de cèl·lules resistents a PARPi

En paral·lel a aquests estudis es van generar línies HRD d'ovari resistents a PARPi per poder estudiar en profunditat els mecanismes moleculars que relacionen el metabolisme i la resistència a PARPi. Per aquest fi es va emprar el model ID8-B així com la línia A2780. Aquestes línies van ser exposades a dosis creixents d'Olaparib fins obtenir línies resistents a Olaparib (ID8-B-RO i A2780-RO).

Es va procedir a valorar la sensibilitat d'aquestes línies comparades amb la corresponent línia parental sensible, per confirmar la seva resistència

Fig. 39

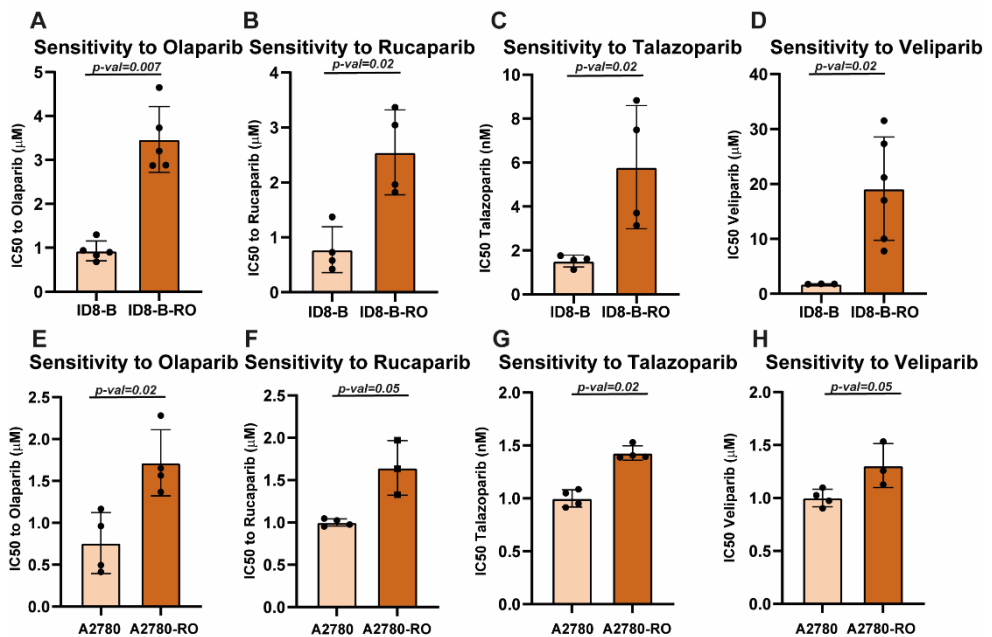


Figura 39: Validació dels models cel·lulars resistents a PARPi. A-H) Gràfic mostrant la IC50 a diferents PARPi de cèl·lules tumorals HRD sensibles i el seu parellat resistent a PARPi. Les cèl·lules es van tractar amb concentracions creixents del corresponent PARPi durant 72 hores. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

a Olaparib (5 vegades per ID8-B-RO, 3,5 vegades per A2780-RO). A més a més, es va observar que aquestes cèl·lules presentaven resistència a altres PARPi encara que mai haguessin estat exposades a aquests fàrmacs (Fig 39), suggerint que els mecanismes de resistència adquirits degut a la exposició a Olaparib són comuns als altres PARPi.

4.3. Caracterització molecular de les cèl·lules resistents a PARPi

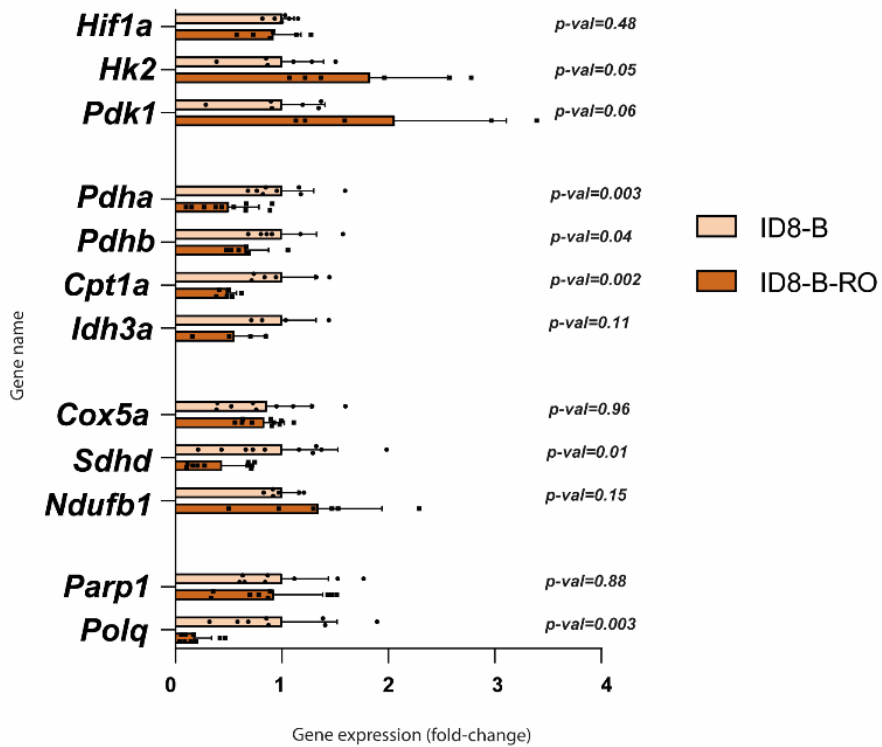
Seguidament es va procedir a caracteritzar aquestes línies. Per això es va analitzar l'expressió de gens involucrats en diferents processos metabòlics vinculats a la glicòlisi o al metabolisme oxidatiu. Es van seleccionar *Hif1a*, *Hk2* i *Pdk1* com a marcadors glicolítics. Com a marcadors del metabolisme oxidatiu es van analitzar diferents subunitats de la PDH (*Pdha*, *Pdhb*) i de la isocitrat deshidrogenasa (*Idh3a*), així com del transportar d'àcids grassos dins la mitocòndria (*Cpt1a*). També es va estudiar l'expressió de tres subunitats de diferents complexos de la cadena respiratòria (*Ndufb1*, *Sdhb*, *Cox5a*) i per altra banda també es va avaluar l'expressió de *Parp1* i *Polq* com a readout de l'activació de la via d'A-EJ.

Es va observar que les ID8-B-RO (Fig 40A) presentaven una expressió augmentada de diferents marcadors glicolítics a nivell de RNA com *Hk2*, *Pdk1* així com una reducció de marcadors del metabolisme oxidatiu (*Pdha*, *Pdhb*, *Cpt1a*, *Idh3a*). Alhora d'analitzar les subunitats de diferents

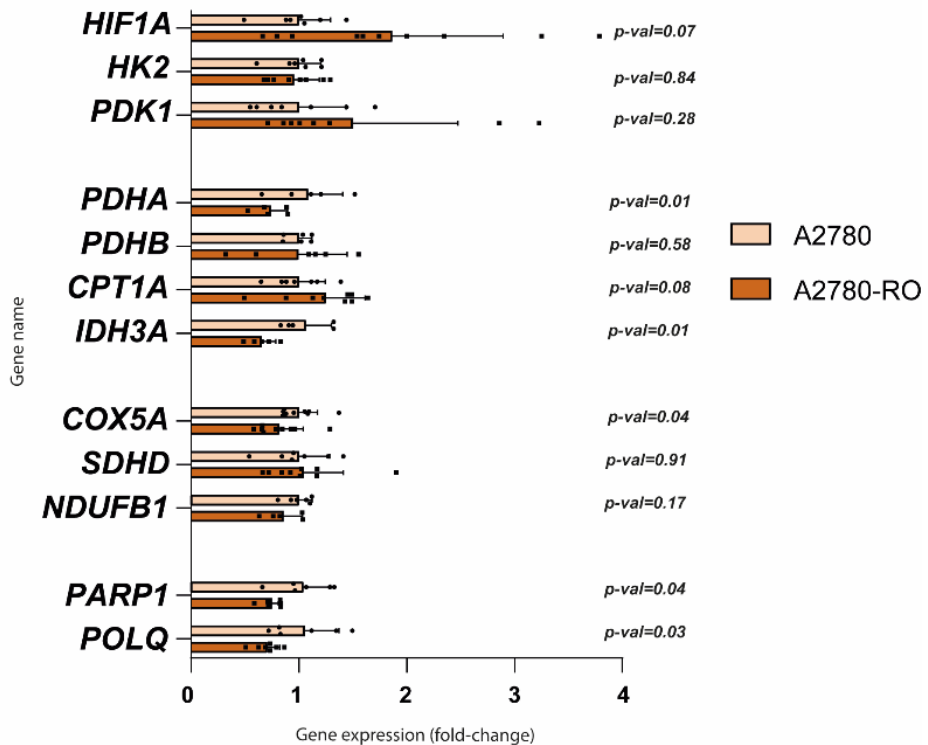
Figura 40: Les cèl·lules resistents reprimeixen l'expressió de gens involucrats en el metabolisme oxidatiu. A) Nivells de mRNA dels gens *Hif1a*, *Hk2*, *Pdk1*, *Pdha*, *Pdhb*, *Cpt1a*, *Idh3a*, *Cox5a*, *Sdhb*, *Ndufb1*, *Parp1* i *Polq* en cèl·lules ID8-B control o ID8-B-RO. B) Nivells de mRNA dels gens *HIF1A*, *HK2*, *PDK1*, *PDHA*, *PDHB*, *CPT1A*, *IDH3A*, *COX5A*, *SDHD*, *NDUFB1*, *PARP1* i *POLQ* en cèl·lules A2780 control o A2780-RO. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 40

A



B

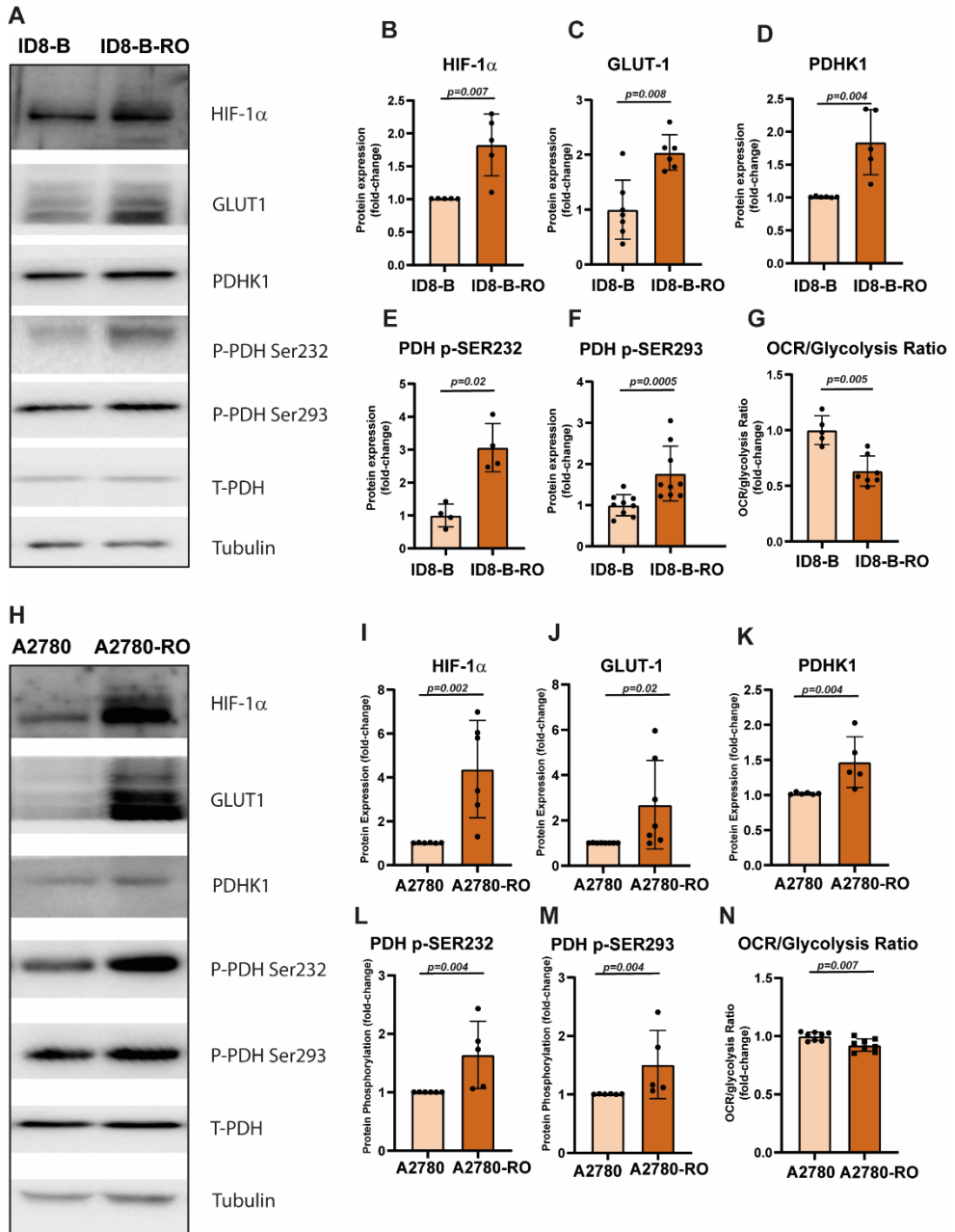


complexos de la cadena respiratòria només l'expressió de *Sdh* disminuïa. Per altra banda també es va observar que tenien una reducció en l'expressió de *Polq*, suggerint una possible regulació de l'A-EJ. En el model A2780-RO (Fig 40B) es van observar les mateixes tendències, tot i que atenuades. Sobretot era destacable l'increment de l'expressió de *PDK1* i la regulació tant de *PARP1* i *POLQ*.

En paral·lel es va analitzar diferents marcadors a nivell proteic. En el model BRCA-RO es va observar un augment dels marcadors de metabolisme glicolític, com HIF-1 α , GLUT1 o PDHK1 es trobaven augmentats així com els nivells de fosforilació de la PDH (Fig 41-AF). També es va analitzar de manera funcional el metabolisme de la línia resistent a Olaparib en comparació a la parental (Fig 41G). Es va observar una reducció en la ràtio OCR/glicòlisi, confirmant que les cèl·lules resistents presenten un metabolisme més glicolític. Les mateixes tendències es van observar en el model A2780-RO (Fig 41H-N).

Figura 41: Les cèl·lules resistents a Olaparib presenten un metabolisme més glicolític. A) Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , GLUT-1, PDHK1, PDH-T així com les fosforilacions de la PDH i els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-B control o ID8-B-RO amb les respectives quantificacions (B-F) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. G) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-B control o ID8-B-RO. H) Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , GLUT-1, PDHK1, PDH-T així com les fosforilacions de la PDH i els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules A2780 control o A2780-RO amb les respectives quantificacions (I-M) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. N) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules A2780 control o A2780-RO. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0.05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 41



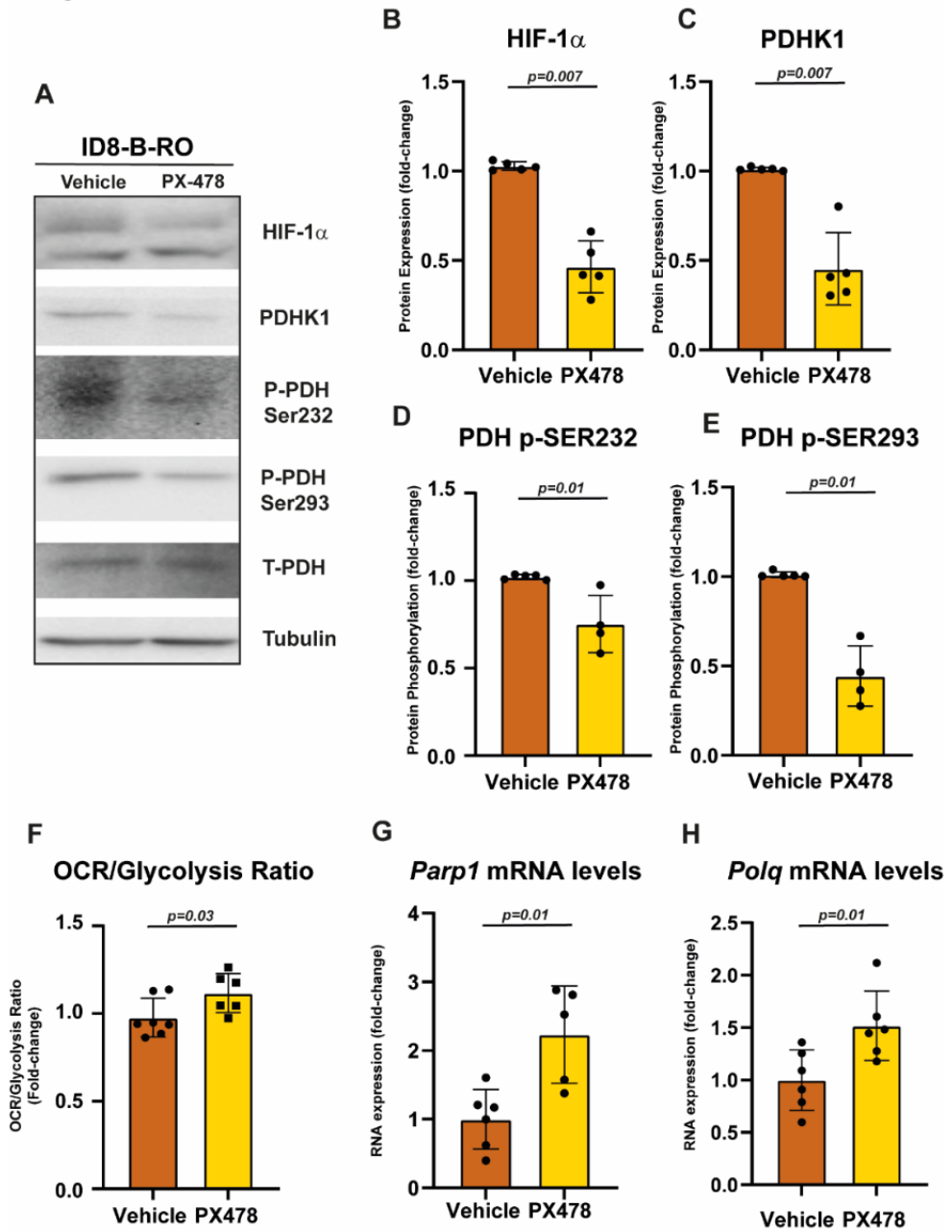
5. La modulació de HIF-1 regula la resistència a PARPi

5.1. HIF-1 actua com a inductor de resistència a PARPi promovent el metabolisme glicolític i inhibint la via d'A-EJ

Com s'ha descrit prèviament, HIF-1 és un regulador clau en la plasticitat metabòlica del tumor així com en la regulació de la maquinària de resposta a DSB. Alhora els models resistents a Olaparib presentaven nivells més elevats de HIF-1 α . Per això es va decidir examinar si aquest paper regulador de HIF-1 era també rellevant en un context de resistència. Es va observar que en el model ID8-B-RO, l'ús del inhibidor de HIF-1 produïa una disminució de l'expressió de PDHK1 així com dels nivells de fosforilació de la PDH que es traslladava a un increment de la ràtio OCR/glicòlisi (Fig 42A-F). Igualment, es va observar que amb la inhibició de HIF-1, els nivells d'expressió de *PARP1* i *POLQ* incrementaven (Fig 42G-H), suggerint que el rol dual de HIF-1 es veia mantingut en el context de resistència, modulant per una banda el estatus metabòlic de la cèl·lula així com regulant quin és el mecanisme de reparació de DSB.

Figura 42: La inhibició de HIF-1 fomenta el metabolisme oxidatiu en les cèl·lules ID8-B-RO. A) Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , PDHK1, PDH-T així com les fosforilacions de la PDH i els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-B-RO tractades amb vehicle o PX-478 25 μ M durant 24 hores amb les respectives quantificacions (B-E) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. F) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules ID8-B-RO tractades amb vehicle o PX-478 25 μ M durant 24 hores G-H) Nivells de mRNA dels gens *Parp1* i *Polq* en cèl·lules ID8-B-RO tractades amb vehicle o PX-478 25 μ M durant 24 hores. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 42



Quan es va tractar el model A2780-RO amb l'inhibidor de HIF-1 es van observar les mateixes tendències (Fig 43 A-C), tot i que els nivells de fosforilació de la PDH eren extremadament variables i no permetien arribar a cap conclusió (dades no mostrades). Tot i això es va observar una tendència a augmentar la ràtio OCR/glicòlisi (Fig 43D) així com un increment en l'expressió tant de *PARP1* com *POLQ* (Fig 43E-F). Per tant aquestes dades reforçaven la implicació de HIF-1 com a inductor de la resistència en els dos models cel·lulars.

Per confirmar definitivament el paper de HIF-1, es va procedir a dur a terme un silenciament amb un shRNA contra *Hif1a* en la línia ID8-B-RO. Es va observar que la línia amb el shRNA contra *Hif1a* tenia menors nivells d'expressió de *Hif1a* així com de les seves dianes canòniques (*Hk2*, *Ldha*, *Pdk1*) (Fig 44A). Això permetia confirmar l'efectivitat del silenciament de *Hif1a*. A nivell de proteïna s'observava una disminució en els nivells de PDHK1, així com a nivell de la fosforilació de la PDH (Fig 44B-E). També es va analitzar l'expressió de *Polq* i *Parp1*, on es va observar que l'expressió de *Polq* es trobava incrementada en les cèl·lules expressant el shRNA, i que l'expressió de *Parp1* tenia una tendència similar (Fig 44F-G). Finalment es va observar que les cèl·lules que expressaven el shRNA contra *Hif1a* eren més sensibles a PARPi (Fig 44H). En conjunt, totes aquestes evidències recolzaven la implicació de HIF-1 en el procés d'adquisició de la resistència a PARPi.

Fig. 43

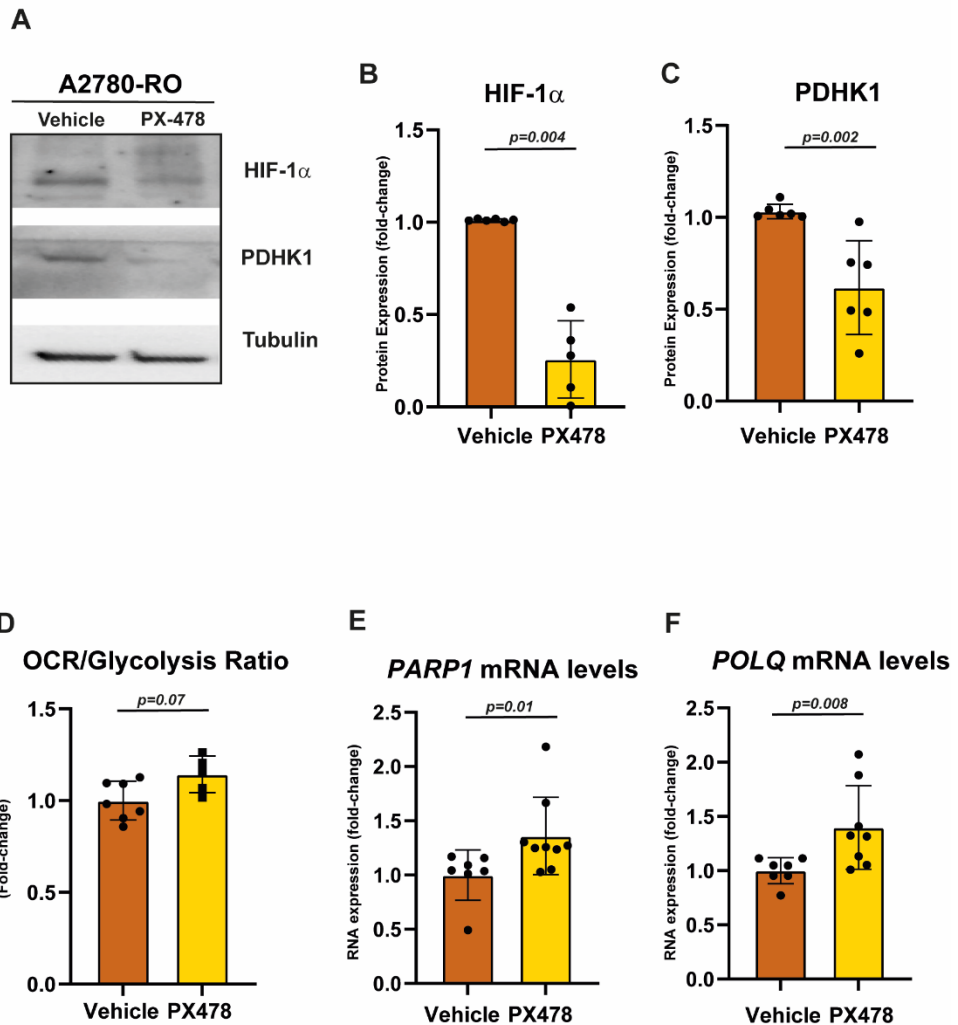
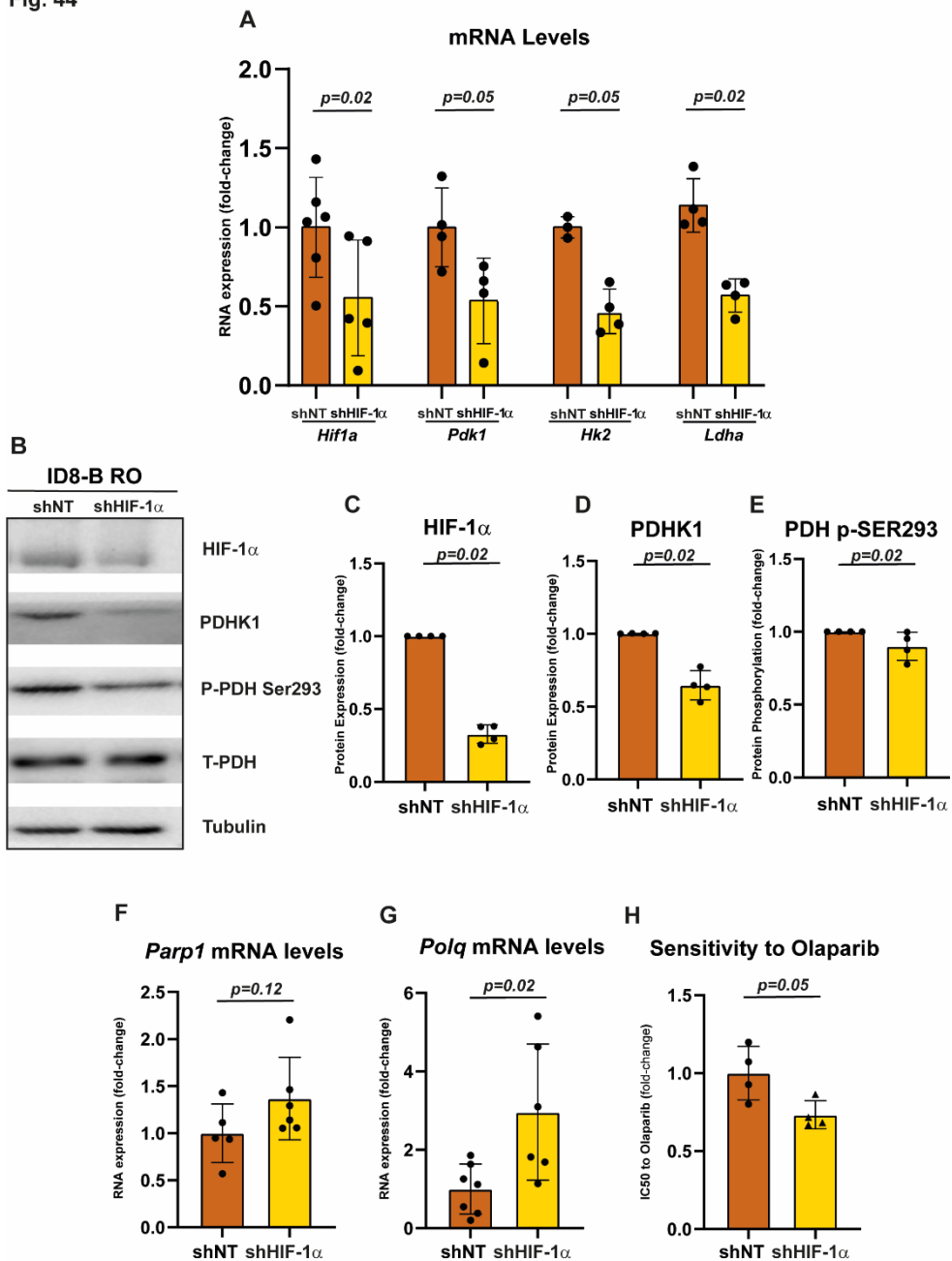


Figura 43: La inhibició de HIF-1 fomenta el metabolisme oxidatiu en les cèl·lules A2780-RO. A) Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , PDHK1 i els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules A2780 -RO tractades amb vehicle o PX-478 25 μ M durant 24 hores amb les respectives quantificacions (B-E) utilitzant tubulina com a control de càrrega. Es mostra una imatge representativa en cada panell. F) Es mostra la ràtio de OCR/Glicòlisi en cèl·lules A2780-RO tractades amb vehicle o PX-478 25 μ M durant 24 hores G-H) Nivells de mRNA dels gens *PARP1* i *POLQ* en cèl·lules A2780-RO tractades amb vehicle o PX-478 25 μ M durant 24 hores. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura

Figura 44: La inhibició mitjançant shRNA de *Hif1a* també comporta una disminució dels marcadors del metabolisme glicolític. A) Nivells de mRNA dels gens *Hif1a* i *Pdk1*, *Hk2*, *Ldha* en cèl·lules ID8-B-RO control (shNT) o un knockdown de *Hif1a* (shHIF-1 α). B) Western blot analitzant l'expressió de HIF-1 α , PDHK1, PDH-T així com les fosforilació de la PDH i els nivells de tubulina com a control de càrrega en cèl·lules ID8-B-RO control (shNT) o un knockdown de *Hif1a* (shHIF) amb les respectives quantificacions (C-E) utilitzant tubulina com a control de càrrega. F-G) Nivells de mRNA dels gens *Polq* i *Parp1* en cèl·lules ID8-B-RO control (shNT) o un knockdown de *Hif1a* (shHIF). H) Gràfic mostrant la IC50 a Olaparib en cèl·lules ID8-B-RO control (shNT) o un knockdown de *Hif1a* (shHIF). Les cèl·lules es van tractar amb concentracions creixents d'Olaparib durant 72 hores. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 44



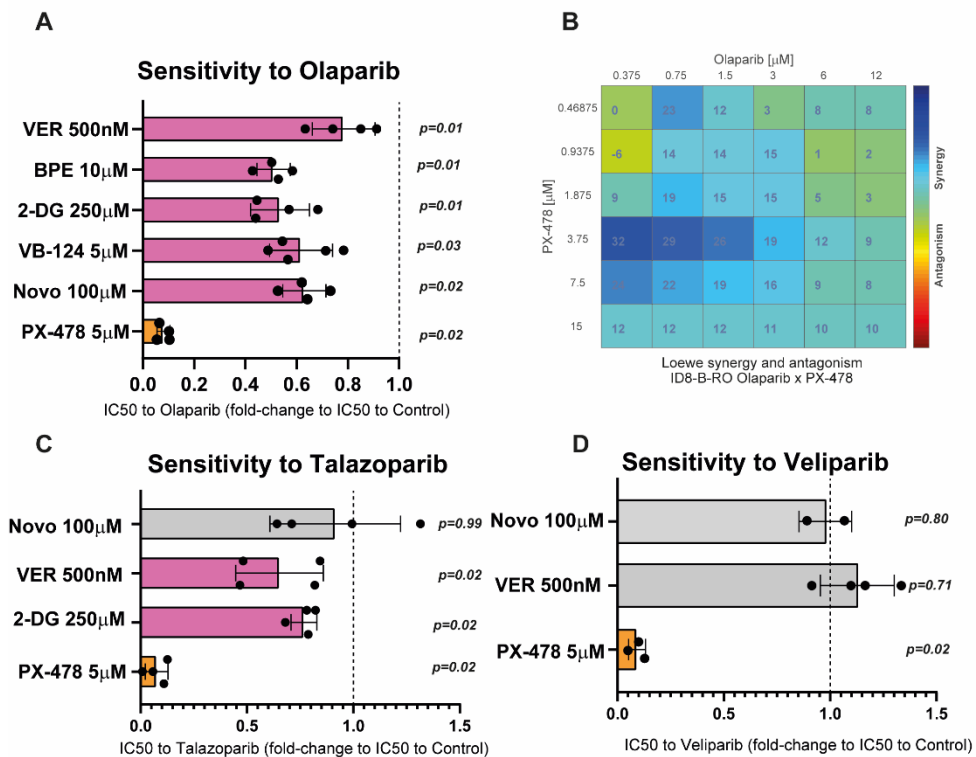
5.2. . La inhibició de HIF-1 augmenta la sensibilitat a PARPi en models resistents *in-vitro*

A continuació, es va voler examinar si la regulació del metabolisme glicolític així com de la via d'A-EJ podia resensibilitzar les línies resistents de a PARPi. Per això es va analitzar la IC50 a Olaparib de la línia ID8-B-RO utilitzant diferents inhibidors del metabolisme glicolític, com el 3-bromopiruvat, un inhibidor del transport de lactat (VB-124), un inhibidor de la hexoquinasa (2-DG), el inhibidor de les PDHK, per induir el metabolisme oxidatiu, així com la Novobiocina per inhibir la Polθ, i finalment l'inhibidor de HIF-1 (PX-478).

Remarcablement, tots els inhibidors van produir una reducció significativa a la IC50 d'Olaparib en relació al respectiu control, essent el inhibidor de HIF-1 el més eficient (Fig 45A). L'assaig de sinèrgia entre l'Olaparib i el inhibidor de HIF-1 va permetre confirmar l'efecte sinèrgic de la

Figura 45: La inhibició del metabolisme glicolític resensibilitza les cèl·lules ID8-B-RO a PARPi. Gràfic mostrant el *fold-change* de la IC50 a Olaparib + fàrmac indicat a la respectiva IC50 a Olaparib control, en un panell de diferents inhibidors metabòlics. Les cèl·lules ID8-B-RO es van tractar amb vehicle, VER-246608 500nM (VER), 3-bromopiruvat 10µM (BPE), 2-deoxiglucosa 250 µM (2-DG), VB-124 5µM, Novobiocina 100µM (Novo) o PX-478 5µM i després amb concentracions creixents d'Olaparib. B) Matriu de sinèrgia de cèl·lules ID8-B-RO incubades amb diferents dosis d'Olaparib i PX-478. Les cèl·lules es van sembrar i tractar amb els fàrmacs indicats en les diferents dosis mostrades durant 72 hores. C) Gràfic mostrant el *fold-change* de la IC50 a Talazoparib + fàrmac indicat a la respectiva IC50 a Talazoparib control en un panell de diferents inhibidors metabòlics. Les cèl·lules ID8-B-RO es van tractar amb vehicle, VER-246608 500nM (VER), 2-deoxiglucosa 250 µM (2-DG), Novobiocina 100µM (Novo) o PX-478 5µM i després amb concentracions creixents de Talazoparib. D) Gràfic mostrant el *fold-change* de la IC50 a Veliparib + fàrmac indicat a la respectiva IC50 a Veliparib control en un panell de diferents inhibidors metabòlics. Les cèl·lules ID8-B-RO es van tractar amb vehicle, VER-246608 500nM (VER), Novobiocina 100µM (Novo) o PX-478 5µM i després amb concentracions creixents de Veliparib. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

combinació, especialment en les dosis més baixes d'Olaparib (Fig 45B). Aquests resultats es van voler validar fent servir altres PARPi. Els inhibidors del metabolisme glicolític, van promoure una sensibilització al Talazoparib, no obstant la combinació amb Novobiocina no va suposar cap diferència comparant amb el respectiu control (Fig 45C). Finalment, amb Veliparib es va observar que ni l'ús de Novobiocina així com l'ús de l'inhibidor de les PDHK era suficient per produir un canvi en la sensibilitat en la línia resistent, com ja s'havia observat prèviament en les línies parentals (Fig 45D). Aquest fet reforça la noció de que el metabolisme té un rol en la modulació de l'activitat de PARP1 i la seva unió a la cromatina, modificant l'eficàcia dels PARPi que tenen aquest mecanisme d'acció. Per altra banda, l'únic fàrmac que va comportar canvis en la IC50 en tots els PARPi, va ser l'inhibidor de HIF-1, confirmant la importància d'aquesta proteïna en la sensibilitat a PARPi de Fig. 45



manera independent a la capacitat de *trapping* de l'inhibidor. Finalment, es va procedir a validar aquestes observacions en el model A2780-RO (Fig 46A-B). De manera similar, es va observar que l'ús dels diferents inhibidors metabòlics comportaven una sensibilització a Olaparib en el model A2780-RO, essent de nou el inhibidor de HIF-1 el més efectiu. A més també es va validar que l'efecte sinèrgic, tot i que més atenuat que en l'altre model, es mantenia.

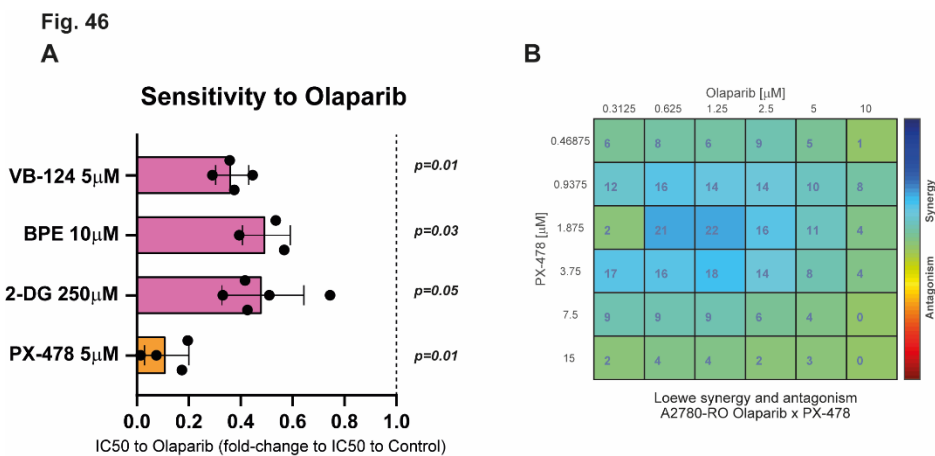


Figura 46: La inhibició del metabolisme glicolític resensibilitza les A2780-RO a PARPi. A) Gràfic mostrant el fold-change de la IC50 a Olaparib + fàrmac indicat a la respectiva IC50 a Olaparib control en un panell de diferents inhibidors metabòlics. Les cèl·lules A2780-RO es van tractar amb vehicle, 3-bromopiruvat 10µM (BPE), 2-deoxiglucosa 250 µM (2-DG), VB-124 5µM o PX-478 5µM i després amb concentracions creixents d'Olaparib. B) Matriu de sinèrgia de cèl·lules A2780-RO incubades amb diferents dosis d'Olaparib i PX-478. Les cèl·lules es van sembrar i tractar amb els fàrmacs indicats en les diferents dosis mostrades durant 72 hores. Les dades es presenten com la mitjana ± SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan P<0,05. El P-valor es troba indicat a cada figura.



6. Tumors refractaris a PARPi presenten un metabolisme més glicolític

6.1. La PFS dels pacients tractats amb PARPi correlaciona amb el metabolisme del tumor primari

Un cop analitzat els models *in-vitro*, es va procedir a valorar si aquestes observacions es reproduïen en pacients. Per això es va seleccionar mostres congelades de tumor primari de pacients amb HGSOC que el tumor fos positiu per HRD i que haguessin estat rebent PARPi després de la quimioteràpia amb platí, que és el tractament estàndard actualment. Es van excloure pacients que abans de rebre PARPi van rebre més de tres línies de quimioteràpia (Fig 47A). Amb aquestes mostres es va dur a terme un anàlisi de RNAseq comparant aquelles pacients que no havien respost al tractament (supervivència lliure de progressió (PFS) inferior a un any) amb aquelles que sí que havien respost (PFS superior a dos anys). Es va dur a terme un anàlisi de *gene set-enrichment* comparant l'expressió gènica normalitzada per transcripts per milió de kilobases (TKM), utilitzant la col·lecció anotada de gene sets (C2) disponible al Molecular Signatures Database (MSigDB). En el top 10 de signatures enriquides en els tumors que van respondre a PARPi es van trobar dos signatures significativament incrementades (Reactome Citric Acid Cycle TCA Cycle NES=1,95 FDR=0,05 nombre de gens=31; KEGG Citrate cycle TCA cycle NES=2,08 FDR=0,01 nombre de gens=22) relacionades amb el cicle de Krebs, i una tendència no significativa en unes altres dues (Fig 47B). Això era consistent amb les observacions fetes en els models *in-vitro*; on es veia que un increment del metabolisme oxidatiu augmentava la sensibilitat a PARPi. Per complementar els resultats del

RNAseq es va analitzar l'expressió per qPCR d'altres gens, fent servir el mateix panell emprat per caracteritzar les línies resistents a PARPi (Fig 47C).

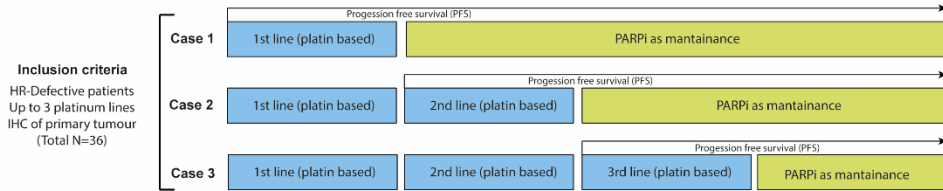
Es va observar tendències similars a les que es podien observar en les línies resistents i que alhora concordaven amb els resultats observats en el RNAseq. S'observava que les pacients que responien a la teràpia presentaven nivells més alts de gens relacionats amb el metabolisme oxidatiu, així com amb la cadena respiratòria. A més s'observava que aquestes pacients tenien més expressió de *PARP1* i *POLQ* suggerint que la via de reparació prioritzada era l'A-EJ en contraposició amb les pacients que no van respondre al tractament, que tenien nivells d'expressió més baixos.

Per confirmar aquestes observacions es va ampliar la cohort d'estudi amb els mateixos criteris i es va procedir a analitzar per IHQ l'expressió de HIF-1 α i de MCT4 (transportador de lactat) (Fig 48A). No es va poder avaluar l'expressió de marcadors OXPHOS ja que no es van aconseguir bones tincions. Quan es va correlacionar l'expressió dels marcadors amb la PFS de cada pacient es va observar una forta anticorrelació entre l'expressió dels marcadors glicolítics i la PFS (MCT4: $r_s = -0,55$ p-val= $7 \cdot 10^{-4}$; HIF-1 α : $r_s = -0,59$ p-val= $6 \cdot 10^{-4}$) (Fig 48 B-C). Aquestes dades ens permetien confirmar per una banda les observacions fetes amb l'anàlisi de RNAseq, així com les dades *in-*

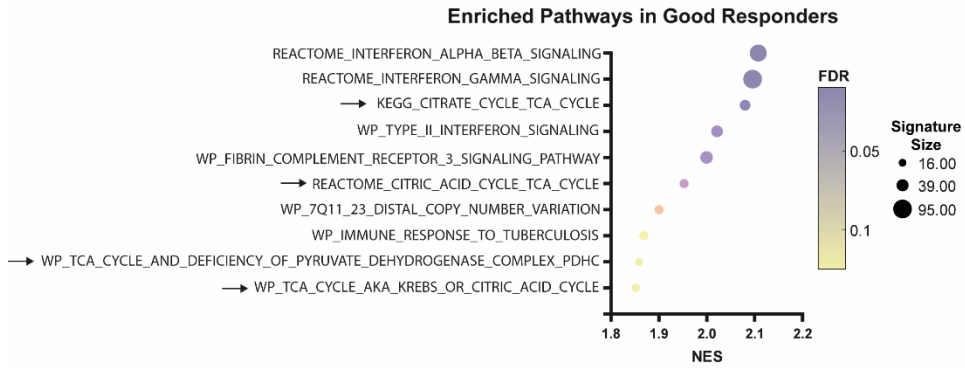
Figura 47: Les pacients que responen a PARPi tenen enriquides vies del metabolisme oxidatiu. A) Esquema sobre la cohort de pacients seleccionada així com la determinació de la PFS B) Gràfic mostrant les 10 vies més enriquides en pacients respondedores a PARPi. En l'eix de les X es mostra l'enriquiment normalitzat (NES), la mida de cada punt simbolitza el nombre de gens de cada signatura i el color la taxa de falsos descobriments (FDR). Les fletxes indiquen aquelles vies relacionades amb el metabolisme oxidatiu. C) Nivells de mRNA dels gens *HIF1A*, *HK2*, *PDK1*, *PDHA*, *PDHB*, *CPT1A*, *IDH3A*, *COX5A*, *SDHD*, *NDUFB1*, *PARP1* i *POLQ* en mostres del tumor primari pacients bones o males respondedores a PARPi. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

Fig. 47

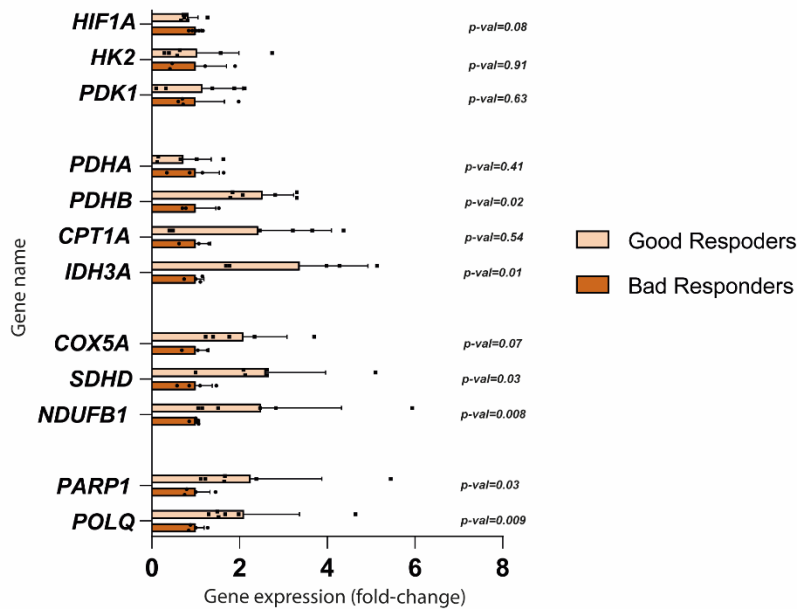
A



B



C



in vitro prèvies on es conclouïa que el estatus metabòlic del tumor primari influeix a la resposta a PARPi. A més a més, aquestes correlacions obren la porta a estudiar l'ús d'aquests marcadors com a predictors de resposta a PARPi.

Fig. 48

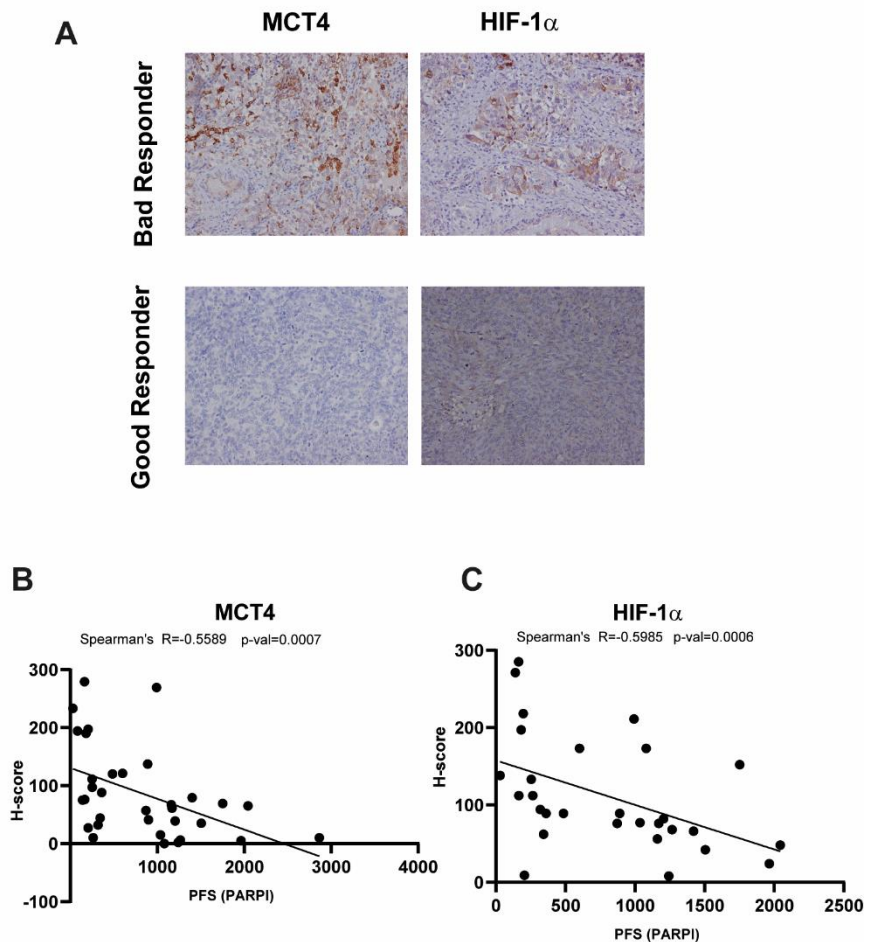


Figura 48: Les pacients que responen millor a PARPi presenten un metabolisme més oxidatiu. A) IHQ en FFPE contra MCT-4 i HIF-1 α en mostres de HGSOc de pacients. Es mostren dues imatges, una de pacient que ha respost a PARPi i una altra que no. B-C) Correlació entre el PFS de cada pacient i la quantificació (H-score) per a cada marcador mostrat a A). Es mostra el coeficient de correlació de Spearman (r_s) amb el corresponent p-valor.

6.2. Les recidives de pacients amb bona resposta a PARPi presenten un metabolisme més glicolític

Seguint amb les validacions dels estudis *in-vitro* amb l'estudi de mostres de pacients, es va voler comprovar si les recidives dels pacients que en un primer moment havien respost al tractament amb PARPi presentaven un metabolisme més glicolític. Per això es van seleccionar de la nostra cohort, aquelles pacients que havien respost en primera instància al tractament amb PARPi però que en algun punt el tumor havia reaparegut i havien recaigut i es va analitzar per IHQ els marcadors metabòlics emprats anteriorment. Es va observar que les recidives presentaven nivells més alts de HIF-1 α així com de MCT4 (Fig 49A-C). Alhora es va poder analitzar els nivells d'expressió del gen NDUFB1, que es trobaven disminuïts en les recidives (Fig 49D). Aquestes evidències suggerien que les cèl·lules tumorals que havien resistit al tractament amb PARPi havien adquirit un metabolisme més glicolític.

Fig. 49

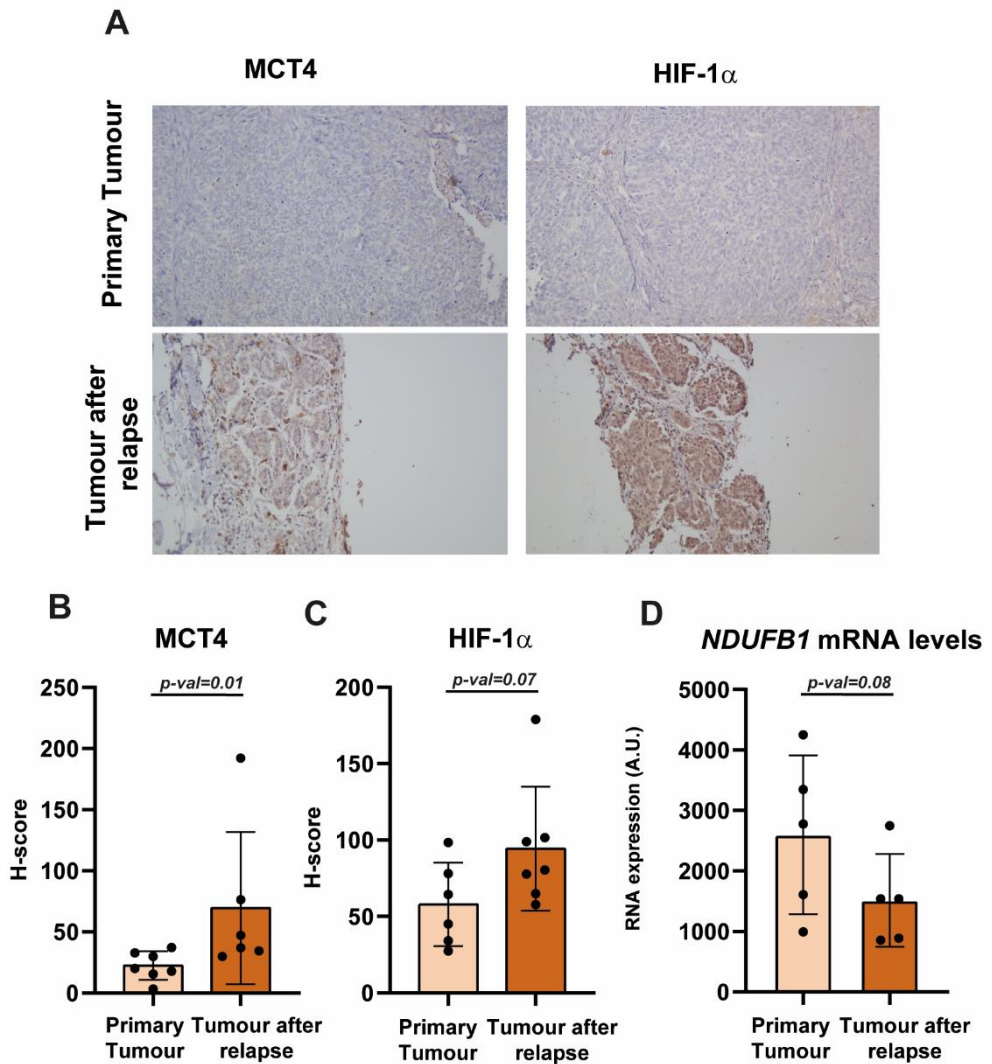


Figura 49: Les recidives de les pacients bones respondedores adopten un metabolisme més glicolític. A) IHQ contra MCT-4 i HIF-1 α , en mostres FFPE de HGSOC de pacients. Es mostren dues imatges, una del tumor primari i una de la recidiva. B-C) Quantificació (H-score) per a cada marcador mostrat a A). D) Nivells de mRNA del gen *NDUFB1*, en mostres del tumor primari i de la posterior recidiva. Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

7. Anàlisi del rol dels nínxols hipòxics en la resistència a PARPi

7.1. Generació i validació d'un model ID8-BRCA amb un sistema reporter d'hipòxia

Per respondre si els nínxols hipòxics eren l'origen de la resistència a PARPi es va optar per generar unes cèl·lules ID8-B amb un sistema reporter per analitzar si les cèl·lules que havien resistit al tractament havien estat en nínxols hipòxics (a partir d'ara anomenades ID8-B-HRE). Per això es va optar per infectar les cèl·lules ID8-B amb un sistema de dos plasmidis generat per Iriondo, O. et al³¹⁶. Breument, aquest sistema consta d'un primer plasmidi que conté una Cre recombinasa sota el control de seqüències HRE. A més, per evitar que la Cre recombinasa s'expressi en situacions de normòxia on HIF-1 està sobre activat conté una seqüència ODD que promou la seva degradació en presència d'oxigen. Per altra banda, el segon plasmidi promou l'expressió constitutiva de RFP. Al trobar-se flanquejat de dos seqüències LOXP, quan la Cre Recombinasa s'activa aquesta talla el gen de la RFP, permetent que s'expressi el gen de la GFP que es troba a 3' de les seqüències LOXP (Fig 50A).

Primerament es va validar si aquest sistema era funcional *in-vitro*. Per això es van cultivar les cèl·lules ID8-B-HRE en hipòxia per 24, 48 i 72 hores. En paral·lel es van tractar aquestes cèl·lules amb CoCl₂ durant 24 hores en normòxia (Fig 50B). Es va observar que amb 24 hores d'hipòxia el percentatge de cèl·lules verdes augmentava d'un 10% a un 57%, tot i que la gran majoria eren cèl·lules doble positives (52%). Notòriament, amb el transcurs del temps en hipòxia es va observar que el percentatge de cèl·lules que es mantenien verdes era igual, però cada vegada augmentava

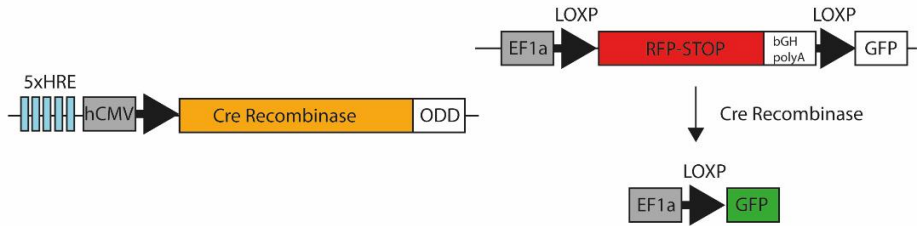
més en les cèl·lules només marcades amb verd (18,8% a les 48 hores i 23% a les 72 hores) cosa que suggeriria que el sistema funcionava correctament, i que el doble marcatge era una qüestió de la estabilitat de la RFP. Per altra banda el tractament amb CoCl_2 va augmentar lleugerament els nivells de cèl·lules verdes (de 5% a 10%), tot i que en cap cas va assolir les taxes obtingudes amb la hipòxia (57%). Això va permetre validar el funcionament de la seqüència ODD de la Cre recombinasa.

Un cop caracteritzat i validat el sistema *in-vitro* es va procedir a analitzar com es comportava el model *in-vivo*. Per això es van injectar les cèl·lules en el ovari de ratolins femella i es van deixar créixer durant diferents temps. En paral·lel també es van injectar les cèl·lules ID8-B parentals per poder corregir l'autofluorescència del tumor (Fig 50C). Es va observar que a les quatre setmanes de la injecció de les cèl·lules tumorals, aproximadament un 5% de tota la massa tumoral eren cèl·lules tumorals, i un percentatge molt minoritari (0,5%) eren verdes. Al cap de 8 setmanes el % de cèl·lules tumorals havia augmentat fins el 40% i es podien detectar un 3,5% de cèl·lules verdes (de les quals 0,65% eren només verdes). Finalment al cap de 11 setmanes, quan els van complir els criteris de punt final, es va procedir a l'extracció de l'últim tumor. El percentatge de cèl·lules tumorals era del 33% i es van

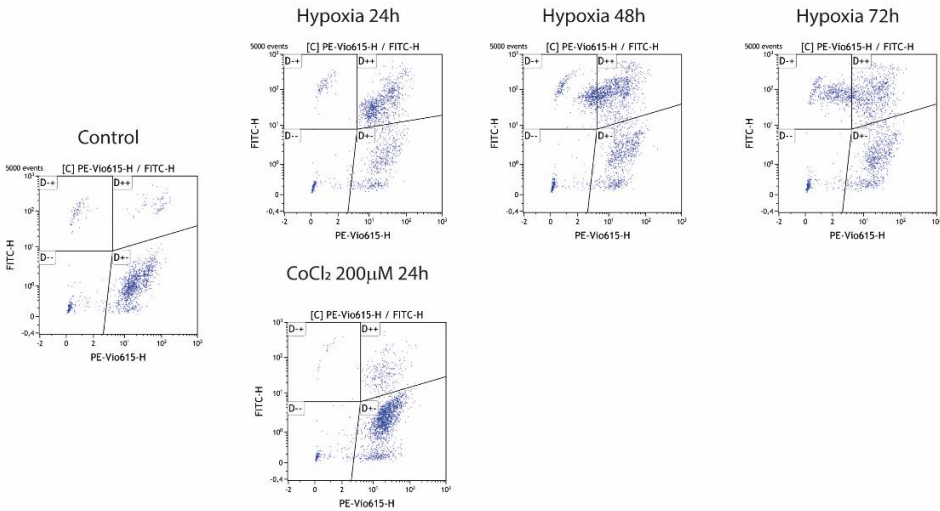
Figura 50: Posada a punt del model reporter d'hipòxia. A) Esquema del funcionament del model. HRE=element de resposta a hipòxia, ODD=domini de degradació depenent d'oxigen B) Mapes de punts de cèl·lules ID8-B-HRE. En l'eix de les X es representa la fluorescència per RFP i en l'eix de les Y la fluorescència per GFP. Les cèl·lules van ser cultivades en normòxia, en hipòxia (2%) en el temps indicat o en normòxia amb $200 \mu\text{M}$ de CoCl_2 durant 24 hores. C) Mapes de punt dels tumors originats a partir de cèl·lules ID8-B amb el sistema reporter integrat injectades ortotòpicament en el ovari dret de ratolins femella durant el nombre indicat de dies. El tumor control és un tumor generat amb la mateixa línia ID8-B parental per poder establir els llindars de fluorescència. En l'eix de les X es representa la fluorescència per RFP i en l'eix de les Y la fluorescència per GFP. D) Quantificació dels gràfics mostrats en C).

Fig. 50

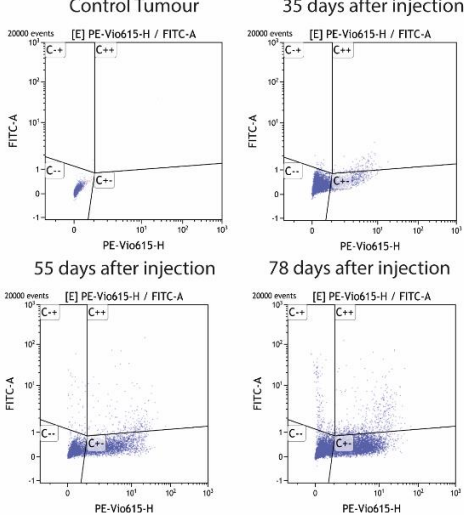
A



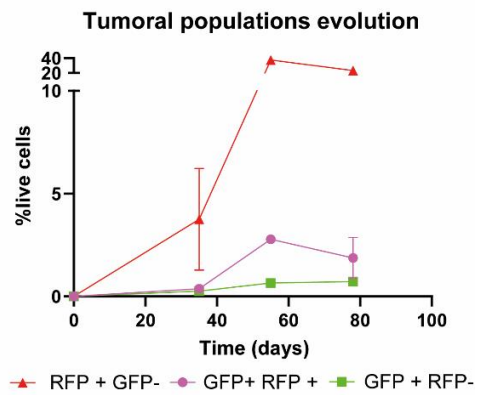
B



C



D



detectar 3,7% de cèl·lules verdes de les quals 0,8% eren exclusivament verdes. Curiosament, tot i que si havia augmentat la mida del tumor les dades suggerien una estabilització del percentatge de cèl·lules verdes totals (Fig 50D). Aquest experiment ens va permetre validar que podíem detectar les diferents poblacions de cèl·lules tumorals de manera efectiva i que les poblacions que havien estat en hipòxia augmentaven amb el temps i després s'estabilitzaven independentment del creixement tumoral.

7.2. Descripció de les diferents poblacions generades al tractar *in-vivo* amb PARPi

El següent experiment va consistir en analitzar si d'acord al que suggerien els resultats previs, les cèl·lules que es trobessin en un ambient hipòxic podrien sobreviure al tractament amb PARPi i ser les causants de les recidives posteriors. Per això, es van injectar de nou les cèl·lules i es va deixar créixer el tumor durant un mes. Posteriorment, es va procedir a tractar els animals amb Olaparib o vehicle durant 4 setmanes i seguidament es van deixar créixer els tumors de nou fins arribar als 78 dies, el límit de l'experiment anterior (Fig 51A). En aquest punt es van extreure els tumors i es van processar per analitzar les diferents poblacions. Els tumors tractats presentaven un volum inferior als controls (dades no mostrades), cosa que demostrava l'eficàcia del tractament. Tot i això cap animal va arribar als criteris de punt final, a diferència del experiment anterior. Alhora d'analitzar les diferents poblacions, no es van observar canvis aparents (Fig 51B-C), ni en el percentatge de dobles positives ni en les positives simples per GFP.

Fig. 51

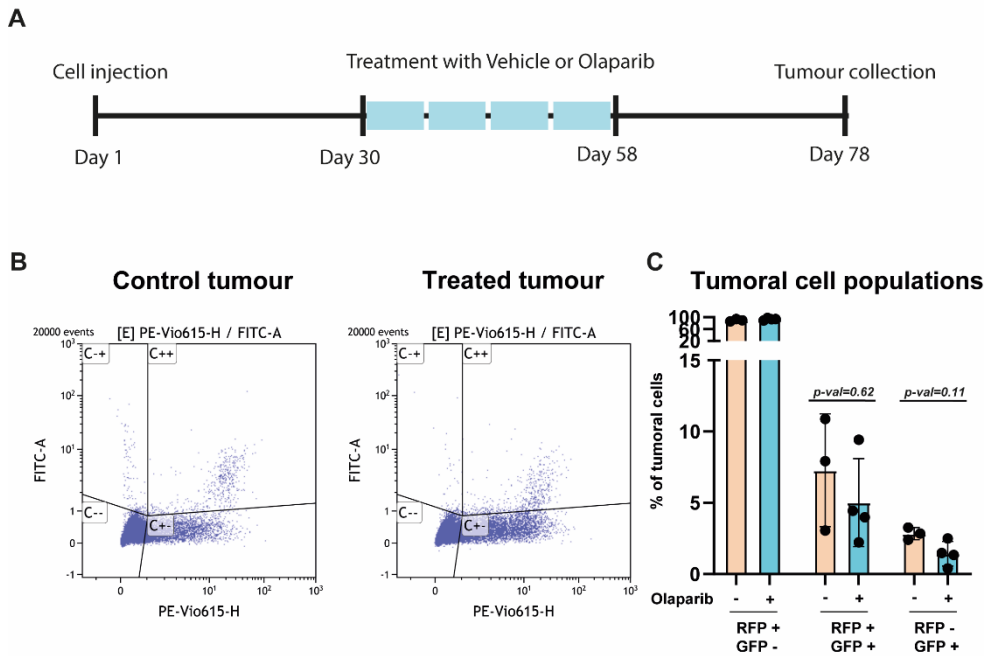


Figura 51: Anàlisi de les diferents poblacions tumorals en tumors tractats amb PARPi. A) Esquema del disseny experimental. B) Mapes de punt de tumors originats a partir de cèl·lules ID8-B-HRE injectades ortotòpicament en el ovari dret de ratolins femella i tractades amb vehicle (control tumour) o amb Olaparib 50mg/kg via oral 5 cops per setmana durant 4 setmanes. En l'eix de les X es representa la fluorescència per RFP i en l'eix de les Y la fluorescència per GFP. C) Quantificació dels gràfics de punts mostrats en B). Les dades es presenten com la mitjana \pm SD a no ser que s'indiqui el contrari i cada punt del gràfic és un replicat biològic independent. Les diferències significatives es van calcular utilitzant el Mann-Whitney U-test comparant entre dos grups i es van considerar quan $P < 0,05$. El P-valor es troba indicat a cada figura.

DISCUSSIÓ

1. La resposta metabòlica i els mecanismes de reparació de l'ADN

La plasticitat metabòlica és l'habilitat de la cèl·lula d'utilitzar el mateix substrat de diferents maneres en funció de les seves necessitats específiques i té un paper clau en la supervivència de les cèl·lules tumorals. En la primera part d'aquesta tesi es demostra com degut a aquesta habilitat les cèl·lules tumorals poden respondre a un augment en els DSB, independentment del seu origen (per exemple mutacions en BRCA 1/2 o quimioteràpia), promovent un metabolisme oxidatiu. Específicament, aquestes cèl·lules transiten d'un ús molt ràpid però ineficient de la glucosa (efecte Warburg) cap a un ús més eficient, promovent la seva completa oxidació dins el mitocondri. Aquest canvi permet un augment dels nivells d'ATP així com la restauració dels nivells de NAD⁺, ambdós essencials per mantenir els mecanismes de reparació de l'A-EJ.

1.1. Sobre l'increment del metabolisme oxidatiu a l'induir dany de doble cadena

Aquest increment en el consum de la glucosa ha estat descrit en aquesta tesi així com per altres treballs com una resposta adaptativa genèrica, com a mínim en una fase inicial, a diferents fonts d'estres (inclús en absència de DSB) per establir un ambient energèticament favorable per la supervivència³³². Tanmateix, la inducció dels DSB no només augmenta el consum de la glucosa sinó que promou la seva oxidació completa. A diferència de les cèl·lules tumorals normals, que presenten un metabolisme Warburg per generar biomolècules destinades a la ràpida proliferació (com nucleòtids), les cèl·lules tumorals amb dany a l'ADN redirigeixen aquests recursos a combatre el desequilibri energètic i de potencial reductor causat

pels mecanismes de reparació de l'ADN. Aquest fet va acompanyat inevitablement d'una reducció de la proliferació³³³. En aquesta tesi, s'ha descrit que aquesta resposta adaptativa és un mecanisme de resposta general observat en diferents tipus tumorals. A més, estudis previs en línies cel·lulars no transformades han observat el mateix fenomen, un increment del metabolisme oxidatiu quan s'indueix dany a l'ADN^{334,335}, indicant el rol cabdal del metabolisme oxidatiu com part dels mecanismes de resposta al dany en l'ADN³³⁶⁻³³⁸.

1.2. Sobre el mecanisme molecular de resposta a l'acumulació de DSB i la inducció del metabolisme oxidatiu

El canvi metabòlic produït pels DSB, promovent un increment en el metabolisme oxidatiu és mitjançat per l'acumulació de ROS citoplasmàtics que comporten una activació de NRF2 i una reducció dels nivells de HIF-1 α , tant a nivell proteic com d'activitat. Aquesta cascada és clau per mantenir l'activitat dels mecanismes subsegüents involucrats en la mitigació dels efectes del dany a l'ADN i la seva reparació. Compostos que impedeixin aquest canvi metabòlic (com l'ús d'antioxidants o la inhibició de NRF2), redueixen la plasticitat metabòlica del tumor, i per tant, permeten incrementar l'eficàcia del fàrmac emprat (per exemple, doxorubicina). Consistentment, la inducció de NRF2 per l'acumulació de ROS ja ha estat relacionada amb una baixada del metabolisme glicolític i un augment del metabolisme oxidatiu en altres contextos³³⁹. De la mateixa manera, la sobre activació de NRF2 és clau per promoure la resistència a tractaments com la radioteràpia en alguns tipus tumorals^{340,341}. No obstant, en aquesta tesi no s'ha avaluat quin és el paper que poden tenir les altres funcions de NRF2 en la resposta a inductors de DSB, per exemple la reducció de ROS o la protecció en front a xenobiòtics³⁴², i fins a quin punt són rellevants per la supervivència

de la cèl·lula tumoral en aquest context. Per altra banda tampoc s'ha avaluat en profunditat quin efecte produeixen els inductors de DSB en el metabolisme quan HIF-1 està sobre activat, per exemple en hipòxia. Dades preliminars obtingudes pel nostre grup suggereixen que malgrat la sensibilitat a inductors de DSB és la mateixa en normòxia que en hipòxia, l'acumulació d'aquests DSB promou la degradació de HIF-1 α també en condicions d'hipòxia i permet sensibilitzar a inhibidors del complex I (com l'IACS). Tot i que falta més recerca per entendre quins són els mecanismes i les adaptacions metabòliques que adquireixen aquestes cèl·lules, aquestes dades evidencien encara més l'eficàcia d'aquesta combinació.

Per altra banda, tot i que també BACH-1 és reprimit en resposta a DSB, els resultats d'aquesta tesi suggereixen que el seu rol és més limitat i podria tenir un paper redundant en aquest procés a pesar que la interacció amb NRF2 ha estat descrita ampliament³⁴³⁻³⁴⁵. Remarcablement, la repressió de HIF-1 o BACH-1 ja ha estat relacionada amb un increment dels OXPHOS en diferents situacions³⁴⁶⁻³⁴⁸ encara que els mecanismes darrere la coordinació d'aquestes vies no ha estat totalment descrit.

Finalment, altres treballs han proposat mecanismes complementaris que podrien explicar l'augment del metabolisme oxidatiu quan es produeix dany a l'ADN. Brace et al³³⁵ i Murata et al³³⁸ vinculen l'augment del metabolisme oxidatiu a una descompensació en les ràtios de NAD⁺/NADH i ATP/AMP produïts per una sobreactivació dels mecanismes de reparació dependents de PARP1 en models cel·lulars no tumorals. Aquest desequilibri promou l'activació de AMPK que seria el promotor d'aquest canvi metabòlic cap al metabolisme oxidatiu³³⁵. Tot i que no s'ha analitzat en els nostres models quin són els canvis en les ràtios NAD⁺/NADH i ATP/AMP, sí que en estudis anteriors es va observar que els models HRD mantenen un metabolisme oxidatiu elevat per tal de tenir més disponibilitat de NAD⁺ i

augmentar els nivells d'ATP³⁰⁴. Per altra banda, no s'ha estudiat la implicació d'AMPK en el nostre model. No obstant diferents estudis demostren que AMPK es capaç de fosforilar NRF2 i modular la seva activitat com factor de transcripció³⁴⁹⁻³⁵¹. Per tant, tot i que falta confirmació experimental, totes les evidències semblen suggerir que aquests mecanismes són complementaris, i reforcen la noció de que NRF2 ha de ser activat per produir aquest canvi metabòlic. Per altra banda, Shimura et al³³⁴ observen que ATM és clau en la detecció del dany produït per la radiació i la inducció de metabolisme oxidatiu en fibroblasts, tot i que no demostren quin és el mecanisme pel qual ATM promou aquest canvi. No obstant, suggereixen que ATM seria capaç d'activar AMPK, per tal de promoure el metabolisme oxidatiu, tot i que aquesta última afirmació no està demostrada experimentalment i només s'esmenta a la discussió avalada per bibliografia³⁵². En els models utilitzats en aquesta tesi la inhibició d'ATM no ha impedit el canvi metabòlic produït pels DSB. Tanmateix, si el mecanisme que proposen els autors acaba involucrant AMPK com efector d'aquest canvi, com s'ha comentat en el paràgraf anterior, això podria suposar una activació de NRF2 de nou. Aquest fet podria explicar perquè en el nostre model la inhibició de ATM no produeix aquest efecte, ja que és sobrepassat per l'activació de NRF2 via l'acumulació de ROS.

Malgrat els altres mecanismes proposats, és palès que mantenir una activitat baixa de HIF-1 és essencial per promoure nivells baixos de PDHK1, resultant en una caiguda dels nivells de fosforilació de la PDH. Això condueix a un augment de l'activitat d'aquest enzim promovent l'oxidació mitocondrial completa del piruvat, que és el punt crucial per promoure una resposta eficient a l'acumulació de DSB i mantenir l'homeòstasi cel·lular.

1.3. Sobre les oportunitats terapèutiques derivades de la promoció de OXPPOS per part dels fàrmacs inductors de DSB

El canvi metabòlic implicant l'activació de metabolisme oxidatiu per una pujada en l'activitat de la PDH així com de la cadena respiratòria, particularment en tumors HRD, representa una vulnerabilitat que obre la porta a noves alternatives terapèutiques per aquest subgrup de pacients. En estudis anteriors el meu grup havia demostrat l'efectivitat de la metformina com agent antitumoral en tumors HRD, mentre aquest efecte es veia limitat en tumors HRP³⁰⁴. L'efecte antineoplàstic de la metformina també ha estat descrit en diferents tipus de tumor²⁶⁷, així com estudis epidemiològics han avalat el seu efecte protector en pacients diabètics^{268,269}. No obstant, el fet que altres assajos clínics no han descrit efectes antitumorals, i tenint en compte la baixa especificitat del compost, no ha permès arribar a conclusions clares sobre el seu paper com a teràpia antitumoral²⁷⁶. Per altra banda, altres OXPPOSi amb poca o mitjana efectivitat han estat testats en pacients amb AML reduint la seva taxa de recaiguda³⁵³. El disseny de fàrmacs capaços d'inhibir de manera altament específica, com IACS-10759 ha estat molt eficaç en l'àmbit preclínic, tenint un potent efecte antitumoral *in-vitro* i *in-vivo*³⁵⁴. Tot i això la translació a la clínica dels OXPPOSi d'alta afinitat com a monoteràpia no ha estat fins ara exitosa, degut a la seva elevada toxicitat²⁷⁷. Per això el seu ús ha d'estar limitat a combinacions amb altres estratègies terapèutiques que tinguin com a diana altres mecanismes cel·lulars i que promoguin una dependència en el metabolisme oxidatiu. Això permetria administrar dosis no tòxiques d'OXPPOSi mentre es manté l'efecte antineoplàstic, com ja s'ha pogut observar amb la metformina^{274,275,278}.

En aquest punt, els resultats obtinguts en aquesta tesi suggereixen que l'ús de IACS-10759 (utilitzat en unes concentracions de 8 a 90 vegades

més baixa que en altres treballs^{277,355,356}) pot ser emprada no només en tumors HRD sinó que també en tumors HRP quan es troba en combinació amb quimioteràpies que generen DSB, així com radioteràpia. Aquest fet també podria comportar la resensibilització a tractaments, tot i que aquest fet no ha estat avaluat. Per altra banda també s'ha demostrat que la combinació en dosis reduïdes tant de IACS com de doxorubicina manté la seva efectivitat, cosa que podria suposar una finestra d'oportunitat terapèutica per donar alternatives a pacients amb toxicitats o intoleràncies al tractament. Les quimioteràpies en molts casos presenten efectes secundaris que acaben comportant la reducció de la dosi o inclús la parada del tractament degut a toxicitats intolerables en pacients³⁵⁷. En el cas concret de la doxorubicina, tot i tenir una gran eficàcia antitumoral el seu ús està limitat degut a la toxicitat cardíaca que genera³⁵⁸. Tot i que diferents formulacions s'han testat per reduir aquesta toxicitat³⁵⁹, com per exemple les formes liposomals, no en tots els casos s'empren. Altres fàrmacs inductors de DSB com el 5-FU o el irinotecan també presenten elevades toxicitats^{360,361}, i són fàrmacs emprats habitualment en la clínica. Per això l'ús de combinacions com la proposada permetria mantenir l'efecte terapèutic, reduint les dosis de fàrmac i per tant baixant la incidència d'aquests efectes secundaris.

Una de les qüestions més interessants que no s'han respost al llarg d'aquesta tesi, és si la combinació d'agents alquilants (com les teràpies basades en platins) amb OXPHOSi podria ser eficaç. Si bé els agents alquilants en un primer moment no generen DSB, l'exposició constant (o les dosis molt elevades) a aquests agents fa que els mecanismes de reparació es saturin i s'acumuli diferents tipus de dany que comporten l'aparició de DSB³⁶². La combinació amb platins és especialment interessant, ja que és una quimioteràpia emprada com a primera línia en diferents tipus de càncer³⁶²⁻³⁶⁴. Reforçant aquesta noció, diferents estudis han observat que cèl·lules de

càncer d'ovari resistent a platí són més oxidatives que el seu parellat sensible^{304,365}.

Tampoc s'ha abordat quin efecte pot tenir en el microambient i en la resposta immune. Dosis altes de quimioteràpia sovint s'han relacionat amb efectes immunosupressors³⁶⁶, mentre que dosis reduïdes d'aquests mateixos fàrmacs poden produir l'efecte contrari^{367,368}. Addicionalment, altres estudis han demostrat que l'ús de metformina estimula la immunitat antitumoral en diferents tipus de càncer³⁶⁹⁻³⁷¹. Totes aquestes dades obren la porta a estudiar quin és l'efecte de la combinació de doxorubicina+IACS en el sistema immune i si l'efecte antitumoral d'aquesta combinació es podria veure potenciat en combinació amb immunoteràpia.

2. L'estatus metabòlic del tumor en la resposta a PARPi

Els PARPi han estat una revolució alhora de tractar tumors HRD, augmentant dràsticament la supervivència d'aquests pacients. Tot i això, en els últims temps els treballs descrivint diferents mecanismes de resistència a PARPi s'han multiplicat. En aquesta part de la tesi, s'ha descrit com el status metabòlic del tumor influencia la sensibilitat a PARPi.

2.1. Sobre el preconditionament metabòlic del tumor i la resposta a PARPi

La modulació de l'activitat de PARP1 a partir d'alterar el metabolisme cel·lular i en conseqüència provocar canvis en la sensibilitat a PARPi era quelcom que ja s'havia observat amb anterioritat³⁰⁴. S'havia suggerit que el mecanisme subjacent a aquestes observacions estava relacionat amb la capacitat de *trapping* dels PARPi. Al augmentar l'activitat de PARP1 aquest s'unia més freqüentment a la cromatina augmentant la probabilitat

d'interaccionar amb una molècula de PARPi i quedar-se atrapat. No obstant, la importància del *trapping* en la sensibilitat a PARPi es troba subjecte a debat actualment. Per una banda, Murai et al³⁷² va observar que la retenció de PARP1 a la cromatina degut al efecte dels PARPi era més citotòxica que la manca de funció del propi PARP1. En una línia similar Chen et al³⁷³ demostraven que la retenció de PARP1 a l'ADN era la causa de la toxicitat a PARPi, tot i que suggerien que aquesta retenció no era deguda al efecte de la capacitat de mantenir a PARP1 unit a l'ADN del propi inhibidor, sinó com a conseqüència de la impossibilitat de PARP1 d'autoparilar-se i poder-se alliberar de la cromatina. Per altra banda, estudis més recents han posat en dubte aquest model. Cong et al suggereixen que la sensibilitat a PARPi es degut a l'acumulació de dany fruit de la replicació, mentre que Petropoulos et al³⁷⁴, vinculen l'eficàcia dels PARPi a l'acumulació de conflictes de transcripció-replicació que es donen en l'inici de la fase S del cicle cel·lular.

Xue et al³⁷⁵ proposen un mecanisme de dos passos basta en la retenció de PARP1 a la cromatina. Primerament, PARP1 s'uniria a la cromatina i la seva retenció dependria de la competició entre el NAD⁺ i el PARPi per unir-se al centre actiu. En un segon pas, aquests PARPi modularien al·lostèricament a PARP1 promovent la retenció de PARP1 (en el cas de Talazoparib i Olaparib) a la cromatina o facilitant el seu alliberament (en el cas de Veliparib o Niraparib). En aquest sentit, recentment s'ha vinculat l'eficàcia dels diferents PARPi a la concentració de NAD⁺³⁷⁶ en el nucli, i com el canvi de les quantitats de NAD⁺ en el compartiment citoplasma/nucli poden modificar l'efectivitat dels PARPi.

Tenint en compte les nostres dades, aquest últim model és el que semblaria explicar millor els resultats obtinguts. Al induir el metabolisme glicolític o oxidatiu s'està promovent el compartiment on es regenera el NAD⁺. En un metabolisme oxidatiu el NADH es regenera a NAD⁺ en el

compartiment mitocondrial, que és altament impermeable a la sortida de NAD^+ ^{377,378}. En canvi al promoure un metabolisme glicolític aquest fet es dona en el citoplasma. Per tant, es podria hipotetitzar que al promoure una regeneració mitocondrial del NAD^+ , disminueix la quantitat d'aquest en el citoplasma/nucli, facilitant l'acció dels PARPi. Oposadament, al promoure un metabolisme glicolític i reoxidar el NAD en el citoplasma/nucli, es retindria el NAD^+ en aquest compartiment, augmentant-ne la concentració i per tant facilitant la competició amb els PARPi i reduint la seva efectivitat. Aquest fenomen no afectaria als PARPi com Veliparib, que al no ser capaços de mantenir a PARP1 atrapat a la cromatina el seu potencial citotòxic seria més baix.

2.2. Sobre el rol dual de HIF-1 en la inducció de la resistència a PARPi

En aquesta segona part s'ha observat que HIF-1 té un rol rellevant en l'adquisició de la resistència a PARPi. Tot i que més validacions són necessàries per acabar de confirmar el rol exacte de HIF-1 en els mecanismes d'adquisició de resistència a PARPi, els resultats de la present tesi suggereixen que la sobreexpressió de HIF-1 és un punt essencial per adquirir un fenotip glicolític, augmentant els nivells de la PDHK1 així inhibint l'activitat de la PDH i impedit l'entrada de carbonis al cicle de Krebs. Per altra banda, aquests resultats semblen indicar que HIF-1 manté la seva funció de reprimir l'activitat de l'A-EJ, descrita en Espin et al, permetent l'acció d'altres mecanismes de reparació en el context de cèl·lules resistents a PARPi.

La coordinació d'aquests dos mecanismes que es troben concatenats permet que la cèl·lula tumoral, només incrementant HIF-1, promogui una reducció de la disponibilitat de NAD^+ , alhora que redueix els efectors de la

via d'A-EJ. D'aquesta manera s'assegura de reduir al mínim l'activitat de l'A-EJ, ja que no només limita els seus efectors (com PARP1) sinó disminueix els seus substrats (NAD⁺). Coherentment amb aquestes observacions, la combinació d'inhibidors de HIF-1 amb PARPi permet resensibilitzar línies resistents a PARPi de manera altament efectiva si es compara amb altres inhibidors del metabolisme glicolític (com 2-DG o VB-124) o inhibidors d'efectors de l'A-EJ (com Novobiocina). Tot i que es requereixen diferents validacions *in-vivo* per poder valorar si efectivament la combinació de PARPi amb inhibidors de HIF-1 resensibilitza a PARPi, l'ús de HIFi podria reduir l'activació de HIF-1 en les zones hipòxiques i reduir la taxa glicolítica. Aquestes cèl·lules al estar en hipòxia i al no poder activar els mecanismes dependents de HIF-1 no podrien consumir tanta glucosa com requereixen, conduint finalment al col·lapse energètic i a la posterior mort cel·lular.

Oposadament als resultats presentats s'han descrit correlacions positives entre HIF-1 i PARP1. En melanoma hi ha una forta associació entre l'expressió de PARP1 i HIF-1, i s'ha observat que PARP1 modifica a HIF-1 α per mantenir la seva estabilitat, promoure la seva activitat transcripcional i permetre una correcta adaptació a la hipòxia³⁷⁹. La correlació entre elevats nivells de PARP1 i HIF-1 en situacions d'hipòxia ja havia estat prèviament descrita en teixit cerebral^{380,381}. Cal destacar que en la present tesi l'expressió de PARP1 (i POLQ) són emprats com a readout de l'activitat de la via d'A-EJ. Per altra banda tampoc s'ha estudiat com es modifica l'activitat de PARP1 en condicions d'hipòxia en els nostres models, ni si l'activitat de PARP1 pot promoure l'estabilització de HIF-1. Totes aquestes evidències encara reforcen més la idea de que calen dur a terme més estudis per dilucidar el rol de HIF-1 en la regulació de PARP1.

2.3. Sobre el rol dels nínxols hipòxics com a origen de la resistència a PARPi

La hipòxia és el principal mecanisme d'activació de HIF-1. En tumors sòlids la generació de regions hipòxiques és freqüent, degut al creixement descontrolat. Per tant, la vinculació d'aquestes regions amb la resistència a PARPi és una hipòtesi més que plausible. De fet, la hipòxia ja s'ha relacionat com un element de resistència en radioteràpia²⁷⁸, immunoteràpia³⁸², així com en quimioteràpia³⁸³. Tot i això, l'experiment preliminar presentat en aquesta tesi (Fig51) no permet observar diferències en les diferents poblacions cel·lulars entre tumors tractats amb vehicle o PARPi. No obstant aquest experiment presenta certes limitacions i calen altres aproximacions per poder descartar o acceptar aquesta hipòtesi.

Per una banda, hom podria pensar que un dels motius pels quals no hi ha diferències en el nombre de cèl·lules hipòxiques és que els tumors controls tenen un volum més elevat que els tumors tractats i per tant es més probable que presentin més zones hipòxiques. De totes maneres, tenint en compte els resultats obtinguts en el *time course*, sembla que tot i que els tumors segueixen creixent, el percentatge de cèl·lules verdes es manté a partir d'una certa mida. A més, la normalització del percentatge de cèl·lules verdes obtingut pel volum del respectiu tumor tampoc permet observar cap diferència significativa. Per altra banda, cal destacar que l'experiment s'ha aturat abans d'arribar al punt de criteri final dels animals. És possible, que seguint el mateix esquema de tractament però deixant que el tumor recreixi durant un període més llarg de temps, sigui possible observar aquest enriquiment en els tumors tractats. Tampoc es pot descartar que faci falta augmentar els cicles de tractament per poder observar aquestes diferències.

Per altra banda, cal tenir en compte que diferents evidències al llarg d'aquesta segona part donen suport a la idea que les condicions d'hipòxia són importants per promoure la resistència a PARPi. Els mecanismes suggerits al llarg d'aquesta tesi indiquen que la inducció de la hipòxia permeten activar un mecanisme ràpid de resistència a PARPi, reprimint l'expressió de gens relacionats amb A-EJ (com PARP1) així com promovent un metabolisme més glicolític. No obstant, es difícil concloure que aquesta inducció sigui la raó final de la resistència a PARPi. Per una banda, diferents estudis han demostrat que al llarg del temps entre el 10-40% dels pacients (en funció de l'estudi) presenten reversions en gens de HRD o un 20% amplificacions en el gen *CCNE1*^{384,385}. Per l'altra, els nínxols hipòxics es generen per una mala difusió de l'oxigen degut al creixement descontrolat del tumor. Al reduir el nombre de cèl·lules, la difusió d'oxigen es facilitaria reduint aquestes zones hipòxiques i permetent a les cèl·lules retornar al seu metabolisme oxidatiu i per tant tornarien a ser sensibles a la teràpia. Per tant o aquestes cèl·lules són capaces de mantenir el fenotip hipòxia en normòxia, per exemple acumulant mutacions o silenciant *VHL* (cosa que no ha estat descrita), o han generat nous mecanismes de resistència. Per això, hom interpreta que aquests nínxols hipòxics podrien ser un primer mecanisme de resistència, que permetés generar un ambient favorable per la supervivència del tumor, guanyant temps per permetre l'acumulació de mutacions que fossin la causa final de la resistència als PARPi. En aquest sentit, el recent treball de França et al³⁸⁶ demostra que la resistència és un procés continu, i es desenvolupa a través de canvis progressius de l'estadi cel·lular augmentant gradualment la capacitat de supervivència de la cèl·lula. Aquesta adaptació implica un canvi gradual en l'expressió gènica reforçada per mecanismes epigenètics, d'adaptació al estrès i de reprogramació metabòlica. A més, analitzen aquest procés en el context de la resistència a PARPi, i observen que les cèl·lules més resistents tenien sobre activats gens de la via de HIF-1, cosa que

coincideix en els resultats d'aquesta tesi, així com de NRF2, el qual tindria un rol amb l'activació de la via de les pentoses per augmentar la producció de nucleòtids. La implicació de NRF2 no ha estat avaluada en els nostres models en el context de resistència, però com ja s'ha comentat en anteriors apartats de la discussió, diferents treballs han descrit la seva importància en la reducció d'estrès oxidatiu i la metabolització de xenobiòtics facilitant l'adopció de la resistència als tractaments³⁴².

2.4. Sobre les possibles aplicacions translacionals

A part dels aspectes més mecanístics, d'aquesta segona part es desprenen conclusions que obren la porta a possibles aplicacions a la clínica. La correlació entre el estatus metabòlic del tumor primari i la seva posterior resposta a PARPi, pot ser emprada com a predictor de resposta. Actualment, s'han proposat diferents predictors de resposta a PARPi. Per una banda, a la clínica s'ha demostrat que la resposta a platí és un predictor de la resposta a PARPi³⁸⁷, tot i que aquest criteri només és emprat alhora de tractar pacients de càncer de pàncrees amb mutacions a BRCA1/2^{388,389}. Per altra banda diferents estudis preclínic han demostrat que la capacitat de formació de *loci* Rad51 en tumors HRD correlaciona amb la resistència a PARPi^{390,391} així com altres estudis han demostrat que l'anàlisi de la inestabilitat genòmica també seria un predictor de resposta³⁹². Addicionalment, un estudi pilot ha testat la possibilitat de fer servir un escàner tipus PET amb un radiotraçador específic per mesurar l'expressió de PARP-1 en el tumor, observant un decreixement de l'expressió de PARP-1 quan es tractaven als pacients amb PARPi³⁹³. No obstant aquests biomarcadors sempre es basen en avaluar de diferents maneres la capacitat de resposta de les diferents vies de resposta al dany a l'ADN. Una de les possibilitats d'implementació de l'estatus metabòlic del tumor com a biomarcador és fent servir escàners tipus PET.

L'ús de F-fluorodeoxiglucosa ja s'empra en el diagnòstic per imatge per visualitzar el tumor, a més, diversos assajos clínics amb diferents traçadors metabòlics s'han dut a terme per analitzar el estatus metabòlic del tumor *in-vivo* en pacients. Per tant l'opció d'utilitzar aquesta tecnologia per predir la resposta a PARPi podria ser atractiva³⁹⁴.

Una altra aplicació que es desprèn d'aquesta tesi és l'ús de l'inhibidor HIF-1 en combinació amb PARPi per tornar a sensibilitzar aquelles cèl·lules resistents a PARPi. S'han proposat combinacions amb diferents inhibidors de vies relacionades amb la reparació de l'ADN, de cicle cel·lular o immunoteràpia^{116,118-121}. No obstant, la combinació proposada ataca una vulnerabilitat diferent de totes les altres alternatives que s'han proposat per augmentar l'efectivitat dels PARPi. Tot i això com ja s'ha destacat anteriorment, falta comprovar l'efectivitat d'aquesta combinació *in-vivo* per poder plantejar una translació a la clínica.

3. La plasticitat metabòlica i la seva limitació

La plasticitat és una característica essencial en la progressió tumoral i d'enfrontar estressos. Reduint la plasticitat, es redueix la capacitat del tumor d'evadir les diferents estratègies terapèutiques, augmentant-ne la seva efectivitat. El metabolisme tumoral no és una excepció. De fet el metabolisme ha evolucionat per estar preparat a canvis ràpids, per poder fer front a diferents estressos que un organisme es pot trobar, com un pic en la demanda energètica o la falta d'un nutrient determinat. En aquesta tesi s'han treballat dos escenaris diferents. En la primera part s'ha estudiat com el metabolisme tumoral canvia en una situació d'elevat dany a l'ADN, cosa que és freqüent quan es tracta als pacients amb quimio o radioteràpia. En la segona part s'ha analitzat la reprogramació metabòlica per induir la

resistència a un determinat tractament. Tot i tractar-se de situacions diferents, el mecanisme modulador d'aquesta plasticitat en aquests dos contextos és el mateix, convergint en un mateix efector, HIF-1. Com ja s'ha discutit prèviament, el rol dual de HIF-1 permet coordinar els mecanismes de reparació amb els requeriments energètics concrets pel seu correcte funcionament. Quan hi ha una acumulació aguda de DSB es disminueix l'expressió de HIF-1 α , augmentant el metabolisme oxidatiu i l'activitat de l'A-EJ. En canvi, en una situació on s'impedeix el funcionament de l'A-EJ la capacitat per augmentar l'activitat de HIF-1, promovent un metabolisme glicolític i facilitant l'activació d'altres mecanismes de reparació suposa un avantatge per la supervivència. L'adquisició d'aquests fenotips ha comportat una sensibilització al tractament (per exemple, l'ús d'IACS amb doxorubicina o l'ús de l'inhibidor de HIF-1 amb PARPi), cada cop més acusada com més limitat estava aquest fenotip. Una altra qüestió interessant que es desprèn d'aquest anàlisi és que podria succeir si es combinen dos fàrmacs que condicionen el metabolisme de manera oposada. El cas paradigmàtic en aquesta tesi seria la combinació de Doxorubicina (condicionant cap a OXPHOS) amb Olaparib (condicionant cap a metabolisme Warburg). En aquest sentit, tot i que en aquesta tesi no s'ha testat aquesta combinació, en la bibliografia es troba un assaig clínic en pacients de càncer d'ovari resistents a platí, on s'ha observat que millora el pronòstic dels pacients independentment del estatus mutacional de BRCA^{395,396}. Per això, seguir investigant com els diferents tipus de tumors modulen el seu metabolisme en funció dels tractaments que reben pot comportar la descripció de combinacions efectives, no només amb inhibidors metabòlics, sinó amb altres fàrmacs que ja s'empren en la clínica i que indueixen efectes metabòlicament antagònics, conduint al col·lapse metabòlic de la cèl·lula tumoral.

CONCLUSIONS

1. L'acumulació de DSB, independentment del seu origen, produeixen un canvi metabòlic incrementant el metabolisme oxidatiu.
2. Mecanísticament, el dany a l'ADN activa NRF2 promovent la producció de ROS. NRF2 bloqueja l'activitat transcripcional de HIF-1. Això impedeix l'expressió de PDHK1 i incrementant l'activitat de la PDH, promovent el metabolisme oxidatiu.
3. La combinació d'inductors de DSB, com la doxorubicina, amb inhibidors de la cadena respiratòria, té un efecte sinèrgic augmentant la mort tumoral en diferents tipus de càncer.
4. El estatus metabòlic del tumor condiona la resposta a PARPi.
5. Línies cel·lulars resistents a PARPi presenten un metabolisme glicolític més elevat.
6. HIF-1 indueix la resistència a PARPi de manera dual. Alhora, activa el metabolisme glicolític reduint la disponibilitat de NAD⁺, així com impedeix l'expressió de gens relacionats amb l'A-EJ, reduint de dues maneres diferents l'activitat de la via.
7. L'ús *in-vitro* d'inhibidors de HIF-1 en combinació amb PARPi sensibilitza les cèl·lules resistents als PARPi de nou.
8. La resposta dels pacients a PARPi correlaciona negativament amb l'expressió de HIF-1 α i amb d'altres marcadors glicolítics en mostres del tumor primari.
9. Les recidives que havien tingut bona resposta a PARPi presenten nivells més elevats de HIF-1 α i d'altres marcadors glicolítics.

10. L'efectivitat dels tractaments antineoplàsics actuals pot ser incrementada limitant la plasticitat metabòlica del tumor.

REFERÈNCIES

1. Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *Journal of Experimental Medicine* **79**, 137–158 (1944).
2. Lord, C. J. & Ashworth, A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* **481**, 287–294 (2012).
3. Kang, M. A., So, E. Y., Simons, A. L., Spitz, D. R. & Ouchi, T. DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death Dis* **3**, e249 (2012).
4. Goldstein, M. & Kastan, M. B. The DNA damage response: Implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annu Rev Med* **66**, 129–143 (2015).
5. Kowalczykowski, S. C. An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, 1–36 (2015).
6. Ferry, K. V., Hamilton, T. C. & Johnson, S. W. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol* **60**, 1305–1313 (2000).
7. Martin, L. P., Hamilton, T. C. & Schilder, R. J. Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. *Clinical Cancer Research* **14**, 1291–1295 (2008).
8. Lieber, M. R. The mechanism of DSB repair by the NHEJ. *Annu Rev Biochem* **79**, 181–211 (2011).
9. Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N. & Lieber, M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2017** 18:8 **18**, 495–506 (2017).
10. Tisi, R., Vertemara, J., Zampella, G. & Longhese, M. P. Functional and structural insights into the MRX/MRN complex, a key player in recognition and repair of DNA double-strand breaks. *Comput Struct Biotechnol J* **18**, 1137–1152 (2020).
11. Langerak, P., Mejia-Ramirez, E., Limbo, O. & Russell, P. Release of Ku and MRN from DNA Ends by Mre11 Nuclease Activity and Ctp1 Is Required for Homologous Recombination Repair of Double-Strand Breaks. *PLoS Genet* **7**, e1002271 (2011).

12. Czornak, K., Chughtai, S. & Chrzanowska, K. H. Mystery of DNA repair: The role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet* **49**, 383–396 (2008).
13. Stucki, M. *et al.* MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**, 1213–1226 (2005).
14. Huen, M. S. Y. *et al.* RNF8 Transduces the DNA-Damage Signal via Histone Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly. *Cell* **131**, 901–914 (2007).
15. Delgado-Díaz, M. R., Martín, Y., Berg, A., Freire, R. & Smits, V. A. J. Dub3 controls DNA damage signalling by direct deubiquitination of H2AX. *Mol Oncol* **8**, 884–893 (2014).
16. Zou, L. & Elledge, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* (1979) **300**, 1542–1548 (2003).
17. Tarsounas, M., Davies, D. & West, S. C. BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* **22**, 1115–1123 (2003).
18. Badie, S. *et al.* BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1461–1469 (2010).
19. Thorslund, T. *et al.* The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1263–1265 (2010).
20. Lisby, M. & Rothstein, R. Cell biology of mitotic recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, 1–21 (2015).
21. Qiu, Z., Oleinick, N. L. & Zhang, J. ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy. *Radiotherapy and Oncology* **126**, 450–464 (2018).
22. Saxena, S. & Zou, L. Hallmarks of DNA replication stress. *Mol Cell* **82**, 2298–2314 (2022).
23. Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. & Gorbunova, V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)* **7**, 1765–1771 (2008).
24. Ensminger, M. & Löbrich, M. One end to rule them all: non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Br J Radiol* (2020).
25. Chaplin, A. K. & Blundell, T. L. Structural biology of multicomponent assemblies in DNA double-strand-break repair through non-homologous end joining. *Curr Opin Struct Biol* **61**, 9–16 (2020).

26. Zhao, B., Rothenberg, E., Ramsden, D. A. & Lieber, M. R. The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 765–781 (2020).
27. Robert, I., Dantzer, F. & Reina-San-Martin, B. Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1047–1056 (2009).
28. Sfeir, A. & Symington, L. S. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends Biochem Sci* **40**, 701–714 (2015).
29. Yousefzadeh, M. J. *et al.* Mechanism of Suppression of Chromosomal Instability by DNA Polymerase POLQ. *PLoS Genet* **10**, (2014).
30. Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E. & Ira, G. Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends. *Cell* **134**, 981–994 (2008).
31. Mimitou, E. P. & Symington, L. S. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770–774 (2008).
32. Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S. & Sehorn, M. G. Rad51 Recombinase and Recombination Mediators. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 42729–42732 (2003).
33. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
34. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* vol. 144 646–674 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> (2011).
35. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).
36. Yamagiwa, K. Experimentelle studie uber die pathogenese der epithelialgeschwulste. *Mitt. Med. Fad. Tokio* **15**, 295–344 (1915).
37. Cook, J. W. The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar-Parts I, II and III. *J. Chew. Soc., Transactions* **1**, 395–405 (1933).
38. Tsuchiya, Y. *et al.* Genetic polymorphisms of cytochrome P450 1A1 and risk of gallbladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **21**, 119–124 (2002).
39. Peters, J. M. & Gonzalez, F. J. The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicological Sciences* **165**, 272–276 (2018).

40. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. p53 Mutations in Human Cancers. *Science* (1979) **253**, 49–53 (1991).
41. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
42. Dyson, N. & Balmain, A. Oncogenes and cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* **11–14** (1999) doi:10.1016/S0959-437X(95)90045-4.
43. Lipsick, J. A history of cancer research: Tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **12**, 1–11 (2020).
44. Knijnenburg, T. A. *et al.* Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. *Cell Rep* **23**, 239–254.e6 (2018).
45. Bensaad, K. *et al.* TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* **126**, 107–120 (2006).
46. Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O. & Oren, M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8763–8767 (1989).
47. Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J. & Strasser, A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ* **25**, 104–113 (2018).
48. Koo, N., Sharma, A. K. & Narayan, S. Therapeutics Targeting p53-MDM2 Interaction to Induce Cancer Cell Death. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
49. Ahmed, S. I., Bareeqa, S. B. & Samar, S. S. Re-expression of the p53 Gene by Inhibiting the Mdm-2 Receptor in Wild-type p53 Tumors for the Treatment of Glioblastoma: A Mini Review. *Cureus* **10**, e3034 (2018).
50. Meek, D. W. & Hupp, T. R. The regulation of MDM2 by multisite phosphorylation-Opportunities for molecular-based intervention to target tumours? *Semin Cancer Biol* **20**, 19–28 (2010).
51. Finlay, C. A., Hinds, P. W. & Levine, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083–1093 (1989).
52. Giacomelli, A. O. *et al.* Mutational processes shape the landscape of TP53 mutations in human cancer. *Nat Genet* **50**, 1381–1387 (2018).
53. Lord, C. J. & Ashworth, A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer* **16**, 110–120 (2016).
54. Miller, R. E. *et al.* ESMO recommendations on predictive biomarker testing for homologous recombination deficiency and PARP

- inhibitor benefit in ovarian cancer. *Annals of Oncology* **31**, 1606–1622 (2020).
55. Wooster, R. *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789–792 (1995).
56. Miki, Y. *et al.* A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science* (1979) **266**, 66–71 (1994).
57. Lisio, M. A., Fu, L., Goyeneche, A., Gao, Z. H. & Telleria, C. High-grade serous ovarian cancer: Basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
58. den Brok, W. D. *et al.* Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancer: A Clinical Review. *JCO Precis Oncol* **1–13** (2017) doi:10.1200/po.16.00031.
59. Lowery, M. A. *et al.* Prospective evaluation of germline alterations in patients with exocrine pancreatic neoplasms. *J Natl Cancer Inst* **110**, 1067–1074 (2018).
60. Petrelli, A. *et al.* BRCA2 Germline Mutations Identify Gastric Cancers Responsive to PARP Inhibitors. *Cancer Res* **83**, 1699–1710 (2023).
61. Doig, K. D., Fellowes, A. P. & Fox, S. B. Homologous Recombination Repair Deficiency: An Overview for Pathologists. *Modern Pathology* **36**, 100049 (2023).
62. Haince, J. F., Rouleau, M., Hendzel, M. J., Masson, J. Y. & Poirier, G. G. Targeting poly(ADP-ribosyl)ation: A promising approach in cancer therapy. *Trends Mol Med* **11**, 456–463 (2005).
63. Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913–917 (2005).
64. DeVita, V. T. & Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* **68**, 8643–8653 (2008).
65. Gilman, A. & S. Philips, F. The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides. *Science* (1979) **103**, 409–436 (1946).
66. HEIDELBERGER, C. *et al.* Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* **179**, 663–666 (1957).
67. Ernestos, B. *et al.* Increased Chromosomal Radiosensitivity in Women Carrying BRCA1/BRCA2 Mutations Assessed With the G2 Assay. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **76**, 1199–1205 (2010).
68. Fourquet, A., Stoppa-Lyonnet, D., Kirova, Y. M., Sigal-Zafrani, B. & Asselain, B. Familial breast cancer:

- Clinical response to induction chemotherapy or radiotherapy related to *brca1/2* mutations status. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials* **32**, 127–131 (2009).
69. Rainey, M. D., Charlton, M. E., Stanton, R. V. & Kastan, M. B. Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Res* **68**, 7466–7474 (2008).
70. Biddlestone-thorpe, L. *et al.* Glioma To Ionizing Radiation. **19**, 3189–3200 (2014).
71. Hickson, I. *et al.* Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res* **64**, 9152–9159 (2004).
72. Veuger, S. J., Curtin, N. J., Richardson, C. J., Smith, G. C. M. & Durkacz, B. W. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res* **63**, 6008–6015 (2003).
73. Konstantinidou, G. *et al.* Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin blockade is an effective radiosensitizing strategy for the treatment of non-small cell lung cancer harboring K-RAS mutations. *Cancer Res* **69**, 7644–7652 (2009).
74. Mukherjee, B. *et al.* The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses. *Neoplasia* **14**, 34–43 (2012).
75. Brown, E. J. & Baltimore, D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* **17**, 615–628 (2003).
76. Brown, E. J. & Baltimore, D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* **14**, 397–402 (2000).
77. Robertson, K. A. *et al.* Altered expression of Ape1/ref-1 in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation. *Cancer Res* **61**, 2220–2225 (2001).
78. Herringl, C. J. *et al.* Levels of the DNA repair enzyme human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1, APEX, Ref-1) are associated with the intrinsic radiosensitivity of cervical cancers. *British Journal of Cancer* **78**, 78 (1998).
79. Powell, C. *et al.* Pre-clinical and clinical evaluation of PARP inhibitors as tumour-specific radiosensitisers. *Cancer Treat Rev* **36**, 566–575 (2010).
80. Allen, C., Her, S. & Jaffray, D. A. Radiotherapy for Cancer: Present and

- Future. *Adv Drug Deliv Rev* **109**, 1–2 (2017).
81. Usanova, S. *et al.* Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Mol Cancer* **9**, 1–11 (2010).
82. Vollebergh, M. A. *et al.* An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Annals of Oncology* **22**, 1561–1570 (2011).
83. Swisher, E. M., Sakai, W., Karlan, B. Y., Wurz, K. & Taniguchi, T. Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance. **68**, 2581–2586 (2009).
84. Tsao, L. R., Young, F. D., Otani, I. M. & Castells, M. C. Hypersensitivity Reactions to Platinum Agents and Taxanes. *Clin Rev Allergy Immunol* **62**, 432–448 (2022).
85. Emadi, A., Jones, R. J. & Brodsky, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 638–647 (2009).
86. Delgado, J. L., Hsieh, C. M., Chan, N. L. & Hiasa, H. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochemical Journal* **475**, 373–398 (2018).
87. Buzun, K., Bielawska, A., Bielawski, K. & Gornowicz, A. DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem* **35**, 1781–1799 (2020).
88. Fedier, A. *et al.* The effect of loss of Brca1 on the sensitivity to anticancer agents in p53-deficient cells. *Int J Oncol* **22**, 1169–1173 (2003).
89. Willmore, E. *et al.* A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* **103**, 4659–4665 (2004).
90. Davidson, D. *et al.* Irinotecan and DNA-PKcs inhibitors synergize in killing of colon cancer cells. *Invest New Drugs* **30**, 1248–1256 (2012).
91. Moore, K. *et al.* Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine* **379**, 2495–2505 (2018).
92. Robson, M. *et al.* Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine* **377**, 523–533 (2017).
93. Golan, T. *et al.* Maintenance Olaparib for Germline BRCA -Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* **381**, 317–327 (2019).

94. de Bono, J. *et al.* Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* **382**, 2091–2102 (2020).
95. Cartwright, E. *et al.* SOLar: A translational phase II study of single-agent olaparib in the treatment of advanced esophagogastric cancer. *Journal of Clinical Oncology* **38**, TPS471–TPS471 (2020).
96. Amé, J. C. *et al.* PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 17860–17868 (1999).
97. Hanzlikova, H., Gittens, W., Krejčíkova, K., Zeng, Z. & Caldecott, K. W. Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin. *Nucleic Acids Res* **45**, 2546–2557 (2017).
98. Alemasova, E. E. & Lavrik, O. I. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: Reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Research* vol. 47 3811–3827 Preprint at <https://doi.org/10.1093/nar/gkz120> (2019).
99. Murai, J. *et al.* Differential trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res* **72**, 5588–5599 (2012).
100. Veneziani, A. C., Scott, C., Wakefield, M. J., Tinker, A. V. & Lheureux, S. Fighting resistance: post-PARP inhibitor treatment strategies in ovarian cancer. *Ther Adv Med Oncol* **15**, 1–22 (2023).
101. Romeo, M. *et al.* Multicenter Real-World Data of Subsequent Chemotherapy after Progression to PARP Inhibitors in a Maintenance Relapse Setting. *Cancers (Basel)* **14**, (2022).
102. Tobalina, L., Armenia, J., Irving, E., O'Connor, M. J. & Forment, J. V. A meta-analysis of reversion mutations in BRCA genes identifies signatures of DNA end-joining repair mechanisms driving therapy resistance. *Annals of Oncology* **32**, 103–112 (2021).
103. Kondrashova, O. *et al.* Secondary somatic mutations restoring RAD51C and RAD51D associated with acquired resistance to the PARP inhibitor rucaparib in high-grade ovarian carcinoma. *Cancer Discov* **7**, 984–998 (2017).
104. Ter Brugge, P. *et al.* Mechanisms of therapy resistance in patient-derived xenograft models of brca1-deficient breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **108**, 1–12 (2016).
105. Kondrashova, O. *et al.* Methylation of all BRCA1 copies predicts response to the PARP inhibitor rucaparib in

- ovarian carcinoma. *Nat Commun* **9**, (2018).
106. Bunting, S. F. *et al.* 53BP1 inhibits homologous recombination in *brca1*-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* **141**, 243–254 (2010).
107. Callen, E. *et al.* 53BP1 Enforces Distinct Pre- and Post-resection Blocks on Homologous Recombination. *Mol Cell* **77**, 26-38.e7 (2020).
108. Gogola, E. *et al.* Selective Loss of PARG Restores PARylation and Counteracts PARP Inhibitor-Mediated Synthetic Lethality. *Cancer Cell* **33**, 1078-1093.e12 (2018).
109. Min, W. *et al.* Poly(ADP-ribose) binding to Chk1 at stalled replication forks is required for S-phase checkpoint activation. *Nat Commun* **4**, (2013).
110. Pillay, N. *et al.* DNA Replication Vulnerabilities Render Ovarian Cancer Cells Sensitive to Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase Inhibitors. *Cancer Cell* **35**, 519-533.e8 (2019).
111. Tagliatela, A. *et al.* Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Mol Cell* **68**, 414-430.e8 (2017).
112. Tapodi, A. *et al.* Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 35767–35775 (2005).
113. Du, Y. *et al.* Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors. *Nat Med* **22**, 194–201 (2016).
114. Christie, E. L. *et al.* Multiple ABCB1 transcriptional fusions in drug resistant high-grade serous ovarian and breast cancer. *Nat Commun* **10**, 5–14 (2019).
115. Zatreanu, D. *et al.* Polθ inhibitors elicit BRCA-gene synthetic lethality and target PARP inhibitor resistance. *Nat Commun* **12**, 1–15 (2021).
116. Zhou, J. *et al.* A first-in-class polymerase theta inhibitor selectively targets homologous-recombination-deficient tumors. *Nat Cancer* **2**, 598–610 (2021).
117. Lloyd, R. L. *et al.* Combined PARP and ATR inhibition potentiates genome instability and cell death in ATM-deficient cancer cells. *Oncogene* **39**, 4869–4883 (2020).
118. Yazinski, S. A. *et al.* ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant

- BRCA-deficient cancer cells. *Genes Dev* **31**, 318–332 (2017).
119. Yi, J. *et al.* MYC status as a determinant of synergistic response to Olaparib and Palbociclib in ovarian cancer. *EBioMedicine* **43**, 225–237 (2019).
120. Shen, J. *et al.* PARPI triggers the STING-dependent immune response and enhances the therapeutic efficacy of immune checkpoint blockade independent of BRCANess. *Cancer Res* **79**, 311–319 (2019).
121. Lampert, E. J. *et al.* Combination of PARP Inhibitor Olaparib, and PD-L1 Inhibitor Durvalumab, in Recurrent Ovarian Cancer: a Proof-of-Concept Phase II Study. *Clinical Cancer Research* **26**, 4268–47279 (2020).
122. Turchick, A. *et al.* Selective inhibition of ATM-dependent double-strand break repair and checkpoint control synergistically enhances the efficacy of ATR inhibitors. *Mol Cancer Ther* **22**, 859–872 (2023).
123. Ngoi, N. Y. L., Leo, E., O'Connor, M. J. & Yap, T. A. Development of Next-Generation Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1-Selective Inhibitors. *The Cancer Journal* **27**, (2021).
124. Yap, T. A. *et al.* Abstract CT007: PETRA: A first-in-class , first-in-human trial of the next-generation PARP1-selective inhibitor AZD5305 in Speaker. 1–28 Preprint at <https://doi.org/https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2022-ct007> (2022).
125. Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* **17**, 624–625 (1929).
126. Meyerhof, O. & Lohmann, K. Über energetische wechselbeziehungen zwischen dem umsatz der phosphorsaureester im muskelextrakt [On energetic interactions between the turnover of the phosphoric acid esters in the muscle extract. *Biochem Z* 431–461 (1932).
127. Cox, M. & Nelson, D. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. (2004). doi:10.1002/bmb.2005.4940330104 19.
128. Judge, A. & Dodd, M. S. *Metabolism*. **0**, 607–647 (2020).
129. Rodwell, V. W. *Harper Bioquímica Ilustrada. Trigésima Primera Edición*. (2018).
130. Guo, D., Meng, Y., Jiang, X. & Lu, Z. Hexokinases in cancer and other pathologies. *Cell Insight* **2**, 100077 (2023).
131. Akram, M. Mini-review on glycolysis and cancer. *Journal of Cancer Education* **28**, 454–457 (2013).

132. Zuo, J. *et al.* Glycolysis Rate-Limiting Enzymes: Novel Potential Regulators of Rheumatoid Arthritis Pathogenesis. *Front Immunol* **12**, (2021).
133. Herzig, S. & Shaw, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 121–135 (2018).
134. Meyerhof, O. & Beck, L. V. Triose Phosphate Isomerase. *Journal of Biological Chemistry* **156**, 109–120 (1944).
135. Needham, D. M. & Pillai, R. K. Coupling of dismutations with esterification of phosphate in muscle [4]. *Nature* **140**, 64–65 (1937).
136. Meyerhof, O. Über die Synthese der Kreatinphosphorsäure im Muskel und die „Reaktionsform“ des Zuckers. *Naturwissenschaften* **25**, 443–446 (1937).
137. Mazurek, S., Grimm, H., Boschek, C. B., Vaupel, P. & Eigenbrodt, E. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *British Journal of Nutrition* **87**, S23–S29 (2002).
138. Arnold, P. K. & Finley, L. W. S. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *Journal of Biological Chemistry* **299**, 102838 (2023).
139. Fletcher, W. M. & Hopkins, F. G. Lactic acid in amphibian muscle. *J Physiol* **35**, 247–309 (1907).
140. Hill, A. V & Hartree, W. The four phases of heat-production of muscle. *J Physiol* **54**, 84–128 (1920).
141. Locasale, J. W. & Cantley, L. C. Altered metabolism in cancer. *BMC Biol* **8**, 8–10 (2010).
142. Sharma, D., Singh, M. & Rani, R. Role of LDH in tumor glycolysis: Regulation of LDHA by small molecules for cancer therapeutics. *Semin Cancer Biol* **87**, 184–195 (2022).
143. Herzig, S. *et al.* Identification and Functional Expression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Science (1979)* **337**, 93–96 (2012).
144. Patel, M. S. & Korotchkina, L. G. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans* **34**, 217–222 (2006).
145. Stacpoole, P. W., Kurtz, T. L., Han, Z. & Langae, T. Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 1478–1487 (2008).
146. Behal, R. H., Buxton, D. B., Robertson, J. G. & Olson, M. S. Regulation of the Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex. *Annu Rev Nutr* **13**, 497–520 (1993).

147. Saunier, E., Benelli, C. & Bortoli, S. The pyruvate dehydrogenase complex in cancer: An old metabolic gatekeeper regulated by new pathways and pharmacological agents. *Int J Cancer* **138**, 809–817 (2016).
148. Kolobova, E., Tuganova, A., Boulatnikov, I. & Popov, K. M. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochemical Journal* **358**, 69–77 (2001).
149. Golias, T. *et al.* Hypoxic repression of pyruvate dehydrogenase activity is necessary for metabolic reprogramming and growth of model tumours. *Scientific Reports* **2016 6:1** **6**, 1–11 (2016).
150. Seifert, F. *et al.* Phosphorylation of serine 264 impedes active site accessibility in the E1 component of the human pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Biochemistry* **46**, 6277–6287 (2007).
151. Cai, Z. *et al.* Phosphorylation of PDHA by AMPK Drives TCA Cycle to Promote Cancer Metastasis. *Mol Cell* **80**, 263–278.e7 (2020).
152. Echeverri Ruiz, N. P. *et al.* Dynamic regulation of mitochondrial pyruvate metabolism is necessary for orthotopic pancreatic tumor growth. *Cancer Metab* **9**, 1–12 (2021).
153. Korotchkina, L. G. & Patel, M. S. Site Specificity of Four Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoenzymes toward the Three Phosphorylation Sites of Human Pyruvate Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 37223–37229 (2001).
154. Krebs, H. A. & Johnson, W. A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* **4**, 148–156 (1937).
155. Krebs, H. A. & Johnson, W. A. Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochemical Journal* **31**, 645–660 (1937).
156. Krebs, H. A. & Johnson, W. A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *FEBS Lett* **117**, K2–K10 (1980).
157. Inigo, M., Deja, S. & Burgess, S. C. Ins and Outs of the TCA Cycle: The Central Role of Anaplerosis. *Annu Rev Nutr* **41**, 19–47 (2021).
158. Stern, J. R. & Ochoa, S. Enzymatic synthesis of citric acid by condensation of acetate and oxalacetate. *J Biol Chem* **179**, 491 (1949).
159. Stern, J. R., Ochoa, Severo. & Lynen, Feodor. Enzymatic Synthesis of Citric Acid V. Reaction of acetyl Coenzyme A. *Journal of Biological Chemistry* **198**, 313–321 (1952).

160. Liu, Y., Hu, L., Ma, T., Yang, J. & Ding, J. Insights into the inhibitory mechanisms of NADH on the α heterodimer of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. *Sci Rep* **8**, 1–12 (2018).
161. Guo, D., He, H., Meng, Y., Luo, S. & Lu, Z. Determiners of cell fates: the tricarboxylic acid cycle versus the citrate-malate shuttle. *Protein Cell* **14**, 162–164 (2023).
162. Liu, S., Cadoux-Hudson, T. & Schofield, C. J. Isocitrate dehydrogenase variants in cancer – Cellular consequences and therapeutic opportunities. *Curr Opin Chem Biol* **57**, 122–134 (2020).
163. Borst, P. The aerobic oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide formed by glycolysis in Ehrlich ascites-tumour cells. *Biochim Biophys Acta* **57**, 270–282 (1962).
164. Chang, L.-C., Chiang, S.-K., Chen, S.-E. & Hung, M.-C. Targeting 2-oxoglutarate dehydrogenase for cancer treatment. *Am J Cancer Res* **12**, 1436–1455 (2022).
165. Dalla Pozza, E. *et al.* Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. *Semin Cell Dev Biol* **98**, 4–14 (2020).
166. Leshets, M., Silas, Y. B. H., Lehming, N. & Pines, O. Fumarase: From the TCA Cycle to DNA Damage Response and Tumor Suppression. *Front Mol Biosci* **5**, 1–10 (2018).
167. Minárik, P., Tomásková, N., Kollárová, M. & Antalík, M. Malate dehydrogenases--structure and function. *Gen Physiol Biophys* **21**, 257–265 (2002).
168. Krebs, H. A. & Eggleston, L. V. THE OXIDATION OF PYRUVATE IN PIGEON BREAST MUSCLE. *Biochemical Journal* **34**, 442–459 (1940).
169. MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
170. REID, R. A., MOYLE, J. & MITCHELL, P. Synthesis of Adenosine Triphosphate by a Protonmotive Force in Rat Liver Mitochondria. *Nature* **212**, 257–258 (1966).
171. Hatefi, Y., Haavik, A. G., Fowler, L. R. & Griffiths, D. E. Studies on the Electron Transfer System. *Journal of Biological Chemistry* **237**, 2661–2669 (1962).
172. CHANCE, B. & WILLIAMS, G. R. A Method for the Localization of Sites for Oxidative Phosphorylation. *Nature* **176**, 250–254 (1955).
173. Green, D. E. & Tzagoloff, A. The mitochondrial electron transfer chain.

- Arch Biochem Biophys* **116**, 293–304 (1966).
174. Lobo-Jarne, T. & Ugalde, C. Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **76**, 179–190 (2018).
175. Hirst, J. Why does mitochondrial complex I have so many subunits? *Biochemical Journal* **437**, e1–e3 (2011).
176. Jones, A. J. Y., Blaza, J. N., Varghese, F. & Hirst, J. Respiratory complex I in *Bos taurus* and *Paracoccus denitrificans* pumps four protons across the membrane for every NADH oxidized. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 4987–4995 (2017).
177. Rizwan, M., Rasheed, H. Al & Tarjan, G. Succinate dehydrogenase complex: An updated review. *Arch Pathol Lab Med* **142**, 1564–1570 (2018).
178. Meunier, B., Fisher, N., Ransac, S., Mazat, J. P. & Brasseur, G. Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1827**, 1346–1361 (2013).
179. Kadenbach, B. Complex IV – The regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion* **58**, 296–302 (2021).
180. Boyer, P. D. The ATP synthase - A splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* **66**, 717–749 (1997).
181. Capaldi, R. A., Aggeler, R., Wilkens, S. & Grüber, G. Structural changes in the γ and ϵ subunits of the *Escherichia coli* F₁F₀-type ATPase during energy coupling. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 397–401 (1996).
182. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489 (1997).
183. Adeva-Andany, M. M., Carneiro-Freire, N., Seco-Filgueira, M., Fernández-Fernández, C. & Mouriño-Bayolo, D. Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion* **46**, 73–90 (2019).
184. Lu, S. C. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1830**, 3143–3153 (2013).
185. Masisi, B. K. *et al.* The role of glutaminase in cancer. *Histopathology* **76**, 498–508 (2020).
186. Alfarouk, K. O. *et al.* The pentose phosphate pathway dynamics in cancer and its dependency on intracellular pH. *Metabolites* **10**, 1–16 (2020).
187. Mullen, N. J. & Singh, P. K. Nucleotide metabolism: a pan-cancer metabolic

- dependency. *Nat Rev Cancer* **23**, 275–294 (2023).
188. Ducker, G. S. & Rabinowitz, J. D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* **25**, 27–42 (2017).
189. Newman, A. C. & Maddocks, O. D. K. One-carbon metabolism in cancer. *Br J Cancer* **116**, 1499–1504 (2017).
190. Semenza, G. L., Neifelt, M. K., Chi, S. M. & Antonarakis, S. E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5680–5684 (1991).
191. Semenza, G. L. & Wang, G. L. A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447–5454 (1992).
192. Jaakkola, P. *et al.* Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* (1979) **292**, 468–472 (2001).
193. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275 (1999).
194. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510–5514 (1995).
195. Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. & Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 23757–23763 (1994).
196. Itoh, K. *et al.* An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 313–322 (1997).
197. Kobayashi, A. *et al.* Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**, 7130–7139 (2004).
198. Cullinan, S. B., Gordan, J. D., Jin, J., Harper, J. W. & Diehl, J. A. The Keap1-BTB Protein Is an Adaptor That Bridges Nrf2 to a Cul3-Based E3 Ligase: Oxidative Stress Sensing by a Cul3-Keap1 Ligase. *Mol Cell Biol* **24**, 8477–8486 (2004).
199. Itoh, K. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **13**, 76–86 (1999).

200. Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., Nishizawa, M. & Yamamoto, M. Cloning and Characterization of a Novel Erythroid Cell-Derived CNC Family Transcription Factor Heterodimerizing with the Small Maf Family Proteins. *Mol Cell Biol* **15**, 4184–4193 (1995).
201. Dinkova-Kostova, A. T. & Abramov, A. Y. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med* **88**, 179–188 (2015).
202. Viña, J., Saez, G. T., Gambini, J., Gomez-Cabrera, M. C. & Borrás, C. Role of NAD⁺/NADH redox ratio in cell metabolism A tribute to Helmut Sies and Theodor Bücher and Hans A. Krebs. *Arch Biochem Biophys* **595**, 176–180 (2016).
203. Mihaylova, M. M. & Shaw, R. J. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat Cell Biol* **13**, 1016–1023 (2011).
204. Condon, K. J. & Sabatini, D. M. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. *J Cell Sci* **132**, (2019).
205. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
206. Dang, W. The controversial world of sirtuins. *Drug Discov Today Technol* **12**, e9–e17 (2014).
207. Rahman, S. & Islam, R. Mammalian Sirt1: Insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling* **9**, 1–8 (2011).
208. Grabowska, W., Sikora, E. & Bielak-Zmijewska, A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology* **18**, 447–476 (2017).
209. Bell, E. L., Emerling, B. M., Ricoult, S. J. H. & Guarente, L. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1 α and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene* **30**, 2986–2996 (2011).
210. Yang, X. *et al.* Sirt3 Protects Against Ischemic Stroke Injury by Regulating HIF-1 α /VEGF Signaling and Blood-Brain Barrier Integrity. *Cell Mol Neurobiol* **41**, 1203–1215 (2021).
211. Min, Z., Gao, J. & Yu, Y. The roles of mitochondrial SIRT4 in cellular metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, 1–8 (2019).
212. Mao, Z. *et al.* SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* (1979) **332**, 1443–1446 (2011).
213. Guo, Z., Li, P., Ge, J. & Li, H. SIRT6 in Aging, Metabolism, Inflammation and Cardiovascular Diseases. *Aging Dis* **13**, 1787–1822 (2022).

214. Harden, A. & Young, W. J. The alcoholic ferment of yeast-juice. Part II.—The coferment of yeast-juice. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 369–375 (1906) doi:<https://doi.org/10.1098/rspb.1906.0070>.
215. Xie, N. *et al.* NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct Target Ther* 5, (2020).
216. PREISS, J. & HANDLER, P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *J Biol Chem* 233, 493–500 (1958).
217. Cambronne, X. A. & Kraus, W. L. Location, Location, Location: Compartmentalization of NAD⁺ Synthesis and Functions in Mammalian Cells. *Trends Biochem Sci* 45, 858–873 (2020).
218. Morandi, F. *et al.* Subsets and Extracellular Vesicles, to a Target for Therapeutic Strategies.
219. Malavasi, F. *et al.* Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 88, 841–886 (2008).
220. Figley, M. D. *et al.* SARM1 is a metabolic sensor activated by an increased NMN/NAD⁺ ratio to trigger axon degeneration. *Neuron* 109, 1118–1136.e11 (2021).
221. Kawai, S. & Murata, K. Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: Key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD(H) and NADP(H). *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 919–930 (2008).
222. Ho, H. Y., Lin, Y. T., Lin, G., Wu, P. R. & Cheng, M. L. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) deficiency dysregulates mitochondrial retrograde signaling and impedes proliferation. *Redox Biol* 12, 916–928 (2017).
223. Cambronne, X. A. *et al.* Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD⁺. *Science* (1979) 352, 1474–1477 (2016).
224. Lu, M. J. *et al.* SLC25A51 decouples the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio to control proliferation of AML cells. *Cell Metab* 1–14 (2024) doi:10.1016/j.cmet.2024.01.013.
225. Luongo, T. S. *et al.* SLC25A51 is a mammalian mitochondrial NAD⁺ transporter. *Nature* 588, 174–179 (2020).
226. Gldenpfennig, A. *et al.* Absence of mitochondrial SLC25A51 enhances PARP1-dependent DNA repair by increasing nuclear NAD⁺ levels. *Nucleic Acids Res* 51, 9248–9265 (2023).
227. Li, Y. *et al.* SLC25A51 promotes tumor growth through sustaining

- mitochondria acetylation homeostasis and proline biogenesis. *Cell Death Differ* **30**, 1916–1930 (2023).
228. Sies, H. & Jones, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 363–383 (2020).
229. Sies, H. & Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **617**–631 (1985).
230. Sies, H. Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol* **41**, 101867 (2021).
231. Bodega, G., Alique, M., Puebla, L., Carracedo, J. & Ramírez, R. M. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *J Extracell Vesicles* **8**, (2019).
232. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A. & Hekimi, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology* **217**, 1915–1928 (2018).
233. Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K. & McCord, J. M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med* **32**, 234–246 (2011).
234. Li, Z. & Zhang, H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci* **73**, 377–392 (2016).
235. Warburg, O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* **12**, 1131–1137 (1924).
236. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. I . Killing-Off of Tumor Cells in Vitro . *J Gen Physiol* **8**, 519–530 (1927).
237. Racker, E. Bioenergetics and the problem of tumor growth. *Am Sci* **60**, 56–63 (1972).
238. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**, 85–95 (2011).
239. Jenniskens, J. C. A. *et al.* Energy balance-related factors in childhood and adolescence and risk of colorectal cancer expressing different levels of proteins involved in the Warburg-effect. *Int J Cancer* **150**, 1812–1824 (2022).
240. Wellen, K. E. & Thompson, C. B. A two-way street: Reciprocal regulation of metabolism and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 270–276 (2012).
241. Goetzman, E. S. & Prochownik, E. V. The role for myc in coordinating glycolysis, oxidative phosphorylation, glutaminolysis, and fatty acid metabolism in normal and neoplastic tissues. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, (2018).

242. Linehan, W. M., Lerman, M. I. & Zbar, B. Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA* **273**, 564–570 (1995).
243. Eagle, H. Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science* (1979) 501–504 (1955) doi:DOI:10.1126/science.122.3168.501.
244. Wise, D. R. *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18782–18787 (2008).
245. Tian, Y. *et al.* Systematic analyses of glutamine and glutamate metabolisms across different cancer types. *Chin J Cancer* **36**, 1–14 (2017).
246. Farber, S., Diamond, L. K., Mercer, R. D., Sylvester, R. F. & Wolff, J. A. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *New England Journal of Medicine* **238**, 787–793 (1948).
247. Mehrmohamadi, M., Liu, X., Shestov, A. A. & Locasale, J. W. Characterization of the Usage of the Serine Metabolic Network in Human Cancer. *Cell Rep* **9**, 1507–1519 (2014).
248. Locasale, J. W. *et al.* Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet* **43**, 869–874 (2011).
249. DeNicola, G. M. *et al.* NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat Genet* **47**, 1475–1481 (2015).
250. Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S. J. H., Asara, J. M. & Manning, B. D. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* (1979) **351**, 728–733 (2016).
251. Piskounova, E. *et al.* Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* **527**, 186–191 (2015).
252. Cocconi, G. *et al.* Open, randomized, multicenter trial of raltitrexed versus fluorouracil plus high-dose leucovorin in patients with advanced colorectal cancer. Tomudex Colorectal Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology* **16**, 2943–2952 (1998).
253. Vogelzang, N. J. *et al.* Phase III Study of Pemetrexed in Combination With Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 2636–2644 (2003).
254. Hanna, N. *et al.* Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with

- chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* **22**, 1589–1597 (2004).
255. Luengo, A., Gui, D. Y. & Vander Heiden, M. G. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol* **24**, 1161–1180 (2017).
256. Elion, G. B. The Purine Path to Chemotherapy. *Science* (1979) **244**, 41–47 (1989).
257. Wagner, A. D. *et al.* Chemotherapy in advanced gastric cancer: A systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *Journal of Clinical Oncology* **24**, 2903–2909 (2006).
258. Parker, W. B. Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer. *Chem Rev.* **109**, 2880–2893 (2009).
259. Vander Heiden, M. G. & DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **168**, 657–669 (2017).
260. Price, G. S., Page, R. L., Riviere, J. E., Cline, J. M. & Thrall, D. E. Pharmacokinetics and toxicity of oral and intravenous lonidamine in dogs. *Cancer Chemother Pharmacol* **38**, 129–135 (1996).
261. Landau, B. R., Laszlo, J., Stengle, J. & Burk, D. Certain Metabolic and Pharmacologic Effects in Cancer Patients Given Infusions of 2-Deoxy-D-Glucose. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **21**, 485–494 (1958).
262. Mohanti, B. K. *et al.* Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose: phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **35**, 103–111 (1996).
263. d'Amico, A. Review of clinical practice utility of positron emission tomography with ¹⁸F-fluorodeoxyglucose in assessing tumour response to therapy. *Radiologia Medica* **120**, 345–351 (2015).
264. Ko, Y. H. *et al.* A translational study 'case report' on the small molecule 'energy blocker' 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: From bench side to bedside. *J Bioenerg Biomembr* **44**, 163–170 (2012).
265. El Sayed, S. M. *et al.* Safety and outcome of treatment of metastatic melanoma using 3-bromopyruvate: A concise literature review and case study. *Chin J Cancer* **33**, 356–364 (2014).
266. Halford, S. *et al.* A Phase I Dose-Escalation Study of AZD3965, an Oral Monocarboxylate Transporter 1 Inhibitor, in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research* **29**, 1429–1439 (2023).

267. Ashton, T. M., Gillies McKenna, W., Kunz-Schughart, L. A. & Higgins, G. S. Oxidative phosphorylation as an emerging target in cancer therapy. *Clinical Cancer Research* **24**, 2482–2490 (2018).
268. Stevens, R. J. *et al.* Cancer outcomes and all-cause mortality in adults allocated to metformin: Systematic review and collaborative meta-analysis of randomised clinical trials. *Diabetologia* **55**, 2593–2603 (2012).
269. M M Evans, J., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R. & Morris, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Br Med J* **330**, 1304–1305 (2005).
270. Chen, H. P. *et al.* Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: Population-based and in vitro studies. *Gut* **62**, 606–615 (2013).
271. Zhuang, A. *et al.* Metformin promotes histone deacetylation of optineurin and suppresses tumour growth through autophagy inhibition in ocular melanoma. *Clin Transl Med* **12**, (2022).
272. Zakikhani, M., Dowling, R., Fantus, I. G., Sonenberg, N. & Pollak, M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* **66**, 10269–10273 (2006).
273. Rothermundt, C. *et al.* Metformin in chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer: A multicenter phase 2 trial (SAKK 08/09). *Eur Urol* **66**, 468–474 (2014).
274. Brown, J. R. *et al.* Phase II clinical trial of metformin as a cancer stem cell-targeting agent in ovarian cancer. *JCI Insight* **5**, 0–12 (2020).
275. Gulati, S. *et al.* Phase 1 dose-finding study of metformin in combination with concurrent cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced head and neck squamous cell cancer. *Cancer* **126**, 354–362 (2020).
276. Hua, Y. *et al.* Metformin and cancer hallmarks: shedding new lights on therapeutic repurposing. *J Transl Med* **21**, 1–20 (2023).
277. Yap, T. A. *et al.* Complex I inhibitor of oxidative phosphorylation in advanced solid tumors and acute myeloid leukemia: phase I trials. *Nature Medicine* **29**:1 **29**, 115–126 (2023).
278. Machado, N. D., Heather, L. C., Harris, A. L. & Higgins, G. S. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation: lessons, advantages, and opportunities. *Br J Cancer* **129**, 897–899 (2023).
279. Secomb, T. W., Hsu, R., Ong, E. T., Gross, J. F. & Dewhirst, M. W. Analysis

- of the effects of oxygen supply and demand on hypoxic fraction in tumors. *Acta Oncol (Madr)* **34**, 313–316 (1995).
280. Skwarski, M. *et al.* Mitochondrial inhibitor atovaquone increases tumor oxygenation and inhibits hypoxic gene expression in patients with non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* **27**, 2459–2469 (2021).
281. Watson, M. *et al.* The Small Molecule GMX1778 Is a Potent Inhibitor of NAD⁺ Biosynthesis: Strategy for Enhanced Therapy in Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase 1-Deficient Tumors. *Mol Cell Biol* **29**, 5872–5888 (2009).
282. Tan, B. *et al.* Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), an enzyme essential for NAD⁺ biosynthesis, leads to altered carbohydrate metabolism in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 15812–15824 (2015).
283. von Heideman, A., Berglund, Å., Larsson, R. & Nygren, P. Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: results of a phase I clinical trial of CHS 828 and overview of published data. *Cancer Chemother Pharmacol* **65**, 1165–1172 (2010).
284. Hovstadius, P. *et al.* A Phase I study of CHS 828 in patients with solid tumor malignancy. *Clin Cancer Res* **8**, 2843–2850 (2002).
285. Sauriol, A. *et al.* Inhibition of nicotinamide dinucleotide salvage pathway counters acquired and intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor resistance in high-grade serous ovarian cancer. *Sci Rep* **13**, 1–13 (2023).
286. Heske, C. M. *et al.* Matrix screen identifies synergistic combination of PARP inhibitors and nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors in Ewing sarcoma. *Clinical Cancer Research* **23**, 7301–7311 (2017).
287. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).
288. Losman, J. A. & Kaelin, W. G. What a difference a hydroxyl makes: Mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev* **27**, 836–852 (2013).
289. Baysal, B. E. *et al.* Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science (1979)* **287**, 848–851 (2000).
290. Tomlinson, I. P. M. *et al.* Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer the multiple leiomyoma

- consortium. *Nat Genet* **30**, 406–410 (2002).
291. Frezza, C. *et al.* Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. *Nature* **477**, 225–228 (2011).
292. Adam, J. *et al.* A Role for Cytosolic Fumarate Hydratase in Urea Cycle Metabolism and Renal Neoplasia. *Cell Rep* **3**, 1440–1448 (2013).
293. Ascierto, P. A. *et al.* Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: Results from phase I and II studies. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 7660–7668 (2005).
294. Szlosarek, P. W., Luong, P., Phillips, M. M., Baccharini, M. & Ellis, S. Metabolic Response to Pegylated Arginine Deiminase in Mesothelioma With Promoter Methylation of Argininosuccinate Synthetase. **31**, 111–113 (2013).
295. Long, Y. *et al.* Arginine deiminase resistance in melanoma cells is associated with metabolic reprogramming, glucose dependence, and glutamine addiction. *Mol Cancer Ther* **12**, 2581–2590 (2013).
296. Seltzer, M. J. *et al.* Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res* **70**, 8981–8987 (2010).
297. Qie, S., Chu, C., Li, W., Wang, C. & Sang, N. ErbB2 activation upregulates glutaminase 1 expression which promotes breast cancer cell proliferation. *J Cell Biochem* **115**, 498–509 (2014).
298. Lee, Y. Z. *et al.* Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget* **5**, 6087–6101 (2014).
299. Ramachandran, S. *et al.* Structural basis for exploring the allosteric inhibition of human kidney type glutaminase. *Oncotarget* **7**, 17–19 (2016).
300. Gross, M. I. *et al.* Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* **13**, 890–901 (2014).
301. Fendt, S. M., Frezza, C. & Erez, A. Targeting metabolic plasticity and flexibility dynamics for cancer therapy. *Cancer Discov* **10**, 1797–1807 (2020).
302. Kelley, D. E. & Mandarino, L. J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: A reexamination. *Diabetes* **49**, 677–683 (2000).
303. Vriens, K. *et al.* Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity. *Nature* **566**, 403–406 (2019).

304. Lahiguera, Á. *et al.* Tumors defective in homologous recombination rely on oxidative metabolism: relevance to treatments with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med* **12**, (2020).
305. Barbie, D. A. *et al.* Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* **462**, 108–112 (2009).
306. Hänzelmann, S., Castelo, R. & Guinney, J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* **14**, 7 (2013).
307. Liu, Q. *et al.* Loss of TGF β signaling increases alternative end-joining DNA repair that sensitizes to genotoxic therapies across cancer types. *Sci Transl Med* **13**, (2021).
308. Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. & Morishima, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* **45**, D353–D361 (2017).
309. Carbon, S. *et al.* AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**, 288–289 (2009).
310. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545–15550 (2005).
311. Rouillard, A. D. *et al.* The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)* **2016**, (2016).
312. Yang, W. *et al.* Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Res* **41**, D955–61 (2013).
313. DepMap. DepMap 24Q2 Public. Figshare+ Dataset. *Broad* <https://doi.org/10.25452/figshare.plus.25880521.v1> (2024) doi:10.25452.
314. Walton, J. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated Trp53 and Brca2 knockout to generate improved murine models of ovarian high-grade serous carcinoma. *Cancer Res* **76**, 6118–6129 (2016).
315. Evers, B. *et al.* A high-throughput pharmaceutical screen identifies compounds with specific toxicity against BRCA2-deficient tumors. *Clin Cancer Res* **16**, 99–108 (2010).
316. Iriondo, O. *et al.* Hypoxic Memory Mediates Prolonged Tumor Intrinsic Type I Interferon Suppression to Promote Breast Cancer Progression. *Cancer Res* (2024) doi:10.1158/0008-5472.CAN-23-2028.
317. Berra, E., Richard, D. E., Gothié, E. & Pouyssegur, J. HIF-1-dependent

- transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett* **491**, 85–90 (2001).
318. Bankhead, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports* **2017** 7:1 7, 1–7 (2017).
319. Di Veroli, G. Y. *et al.* Combenefit: An interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics* **32**, 2866–2868 (2016).
320. Liu, J. *et al.* An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell* **173**, 400–416.e11 (2018).
321. Mootha, V. K. *et al.* ARTICLES PGC-1 α -Responsive Genes Involved in Oxidative Phosphorylation Are Coordinately Downregulated in Human Diabetes. *NATURE GENETICS VOLUME* vol. 34 (2003).
322. Marx, C. *et al.* Global metabolic alterations in colorectal cancer cells during irinotecan-induced DNA replication stress. *Cancer Metab* **10**, (2022).
323. Rodriguez, R. *et al.* Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nature Chemical Biology* **2012** 8:3 8, 301–310 (2012).
324. Zou, Z., Ohta, T., Miura, F. & Oki, S. ChIP-Atlas 2021 update: a data-mining suite for exploring epigenomic landscapes by fully integrating ChIP-seq, ATAC-seq and Bisulfite-seq data. *Nucleic Acids Res* **50**, W175–W182 (2022).
325. Lee, K. & Kim, H. M. A novel approach to cancer therapy using PX-478 as a HIF-1 α inhibitor. *Arch Pharm Res* **34**, 1583–1585 (2011).
326. Sablina, A. A. *et al.* The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* **11**, 1306–1313 (2005).
327. Rowe, L. A., Degtyareva, N. & Doetsch, P. W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* **45**, 1167–1177 (2008).
328. Rogerson, C. *et al.* FOXA2 controls the anti-oxidant response in FH-deficient cells. *Cell Rep* **42**, (2023).
329. Lahiguera, Á. *et al.* Tumors defective in homologous recombination rely on oxidative metabolism: relevance to treatments with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med* **12**, (2020).
330. Di Veroli, G. Y. *et al.* Combenefit: An interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics* **32**, 2866–2868 (2016).

331. Barretina, J. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603–607 (2012).
332. Marx, C. *et al.* Global metabolic alterations in colorectal cancer cells during irinotecan-induced DNA replication stress. *Cancer Metab* **10**, (2022).
333. Finley, L. W. S. What is cancer metabolism? *Cell* **186**, 1670–1688 (2023).
334. Shimura, T. *et al.* ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle* **16**, 2345–2354 (2017).
335. Brace, L. E. *et al.* Increased oxidative phosphorylation in response to acute and chronic dna damage. *NPJ Aging Mech Dis* **2**, 1–11 (2016).
336. Efimova, E. V. *et al.* Linking cancer metabolism to DNA repair and accelerated senescence. *Molecular Cancer Research* **14**, 173–184 (2016).
337. Panier, S. & Boulton, S. J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2013 15:1** **15**, 7–18 (2013).
338. Murata, M. M. *et al.* NAD⁺ consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival. *Mol Biol Cell* **30**, 2584–2597 (2019).
339. Weiss-Sadan, T. *et al.* NRF2 activation induces NADH-reductive stress, providing a metabolic vulnerability in lung cancer. *Cell Metab* **35**, 487–503.e7 (2023).
340. Zavitsanou, A.-M. *et al.* KEAP1 mutation in lung adenocarcinoma promotes immune evasion and immunotherapy resistance. *Cell Rep* **42**, 113295 (2023).
341. Zhang, P. *et al.* Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol Cancer Ther* **9**, 336–346 (2010).
342. Motohashi, H. & Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* **10**, 549–557 (2004).
343. Nishizawa, H., Yamanaka, M. & Igarashi, K. Ferroptosis: regulation by competition between NRF2 and BACH1 and propagation of the death signal. *FEBS Journal* vol. 290 1688–1704 Preprint at <https://doi.org/10.1111/febs.16382> (2023).
344. Igarashi, K., Nishizawa, H., Saiki, Y. & Matsumoto, M. The transcription factor BACH1 at the crossroads of cancer biology: From epithelial–

- mesenchymal transition to ferroptosis. *Journal of Biological Chemistry* vol. 297 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101032> (2021).
345. Padilla, J. & Lee, J. A Novel Therapeutic Target, BACH1, Regulates Cancer Metabolism. *Cells* 2021, Vol. 10, Page 634 **10**, 634 (2021).
346. Wiel, C. *et al.* BACH1 Stabilization by Antioxidants Stimulates Lung Cancer Metastasis. *Cell* **178**, 330-345.e22 (2019).
347. Muz, B., de la Puente, P., Azab, F. & Azab, A. K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia* **3**, 83 (2015).
348. Wang, X. J., Hayes, J. D., Henderson, C. J. & Roland Wolf, C. *Identification of Retinoic Acid as an Inhibitor of Transcription Factor Nrf2 through Activation of Retinoic Acid Receptor Alpha.* (2007).
349. Petsouki, E., Cabrera, S. N. S. & Heiss, E. H. AMPK and NRF2: Interactive players in the same team for cellular homeostasis? *Free Radic Biol Med* **190**, 75-93 (2022).
350. Matzinger, M., Fischhuber, K., Pölöske, D., Mechtler, K. & Heiss, E. H. AMPK leads to phosphorylation of the transcription factor Nrf2, tuning transactivation of selected target genes. *Redox Biol* **29**, 101393 (2020).
351. Schaffer, B. E. *et al.* Identification of AMPK Phosphorylation Sites Reveals a Network of Proteins Involved in Cell Invasion and Facilitates Large-Scale Substrate Prediction. *Cell Metab* **22**, 907-921 (2015).
352. Fu, X., Wan, S., Lyu, Y. L., Liu, L. F. & Qi, H. Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS One* **3**, e2009 (2008).
353. Xiang, M. *et al.* Gene expression-based discovery of atovaquone as a STAT3 inhibitor and anticancer agent. *Blood* **128**, 1845-1853 (2016).
354. Zhou, Y. *et al.* Recent advances of mitochondrial complex I inhibitors for cancer therapy: Current status and future perspectives. *Eur J Med Chem* **251**, 115219 (2023).
355. Ghilardi, C. *et al.* PGC1 α / β Expression Predicts Therapeutic Response to Oxidative Phosphorylation Inhibition in Ovarian Cancer. *Cancer Res* **82**, 1423-1434 (2022).
356. Molina, J. R. *et al.* An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nature Medicine* 2018 24:7 **24**, 1036-1046 (2018).
357. Livshits, Z., Rao, R. B. & Smith, S. W. An Approach to Chemotherapy-

- Associated Toxicity. *Emerg Med Clin North Am* **32**, 167–203 (2014).
358. Shafei, A. *et al.* A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. *Biomed Pharmacother* **95**, 1209–1218 (2017).
359. Carvalho, C. *et al.* Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* **16**, 3267–3285 (2009).
360. Woloch, C. *et al.* Population pharmacokinetic analysis of 5-FU and 5-FDHU in colorectal cancer patients: search for biomarkers associated with gastro-intestinal toxicity. *Curr Top Med Chem* **12**, 1713–1719 (2012).
361. de With, M. *et al.* Irinotecan-Induced Toxicity: A Pharmacogenetic Study Beyond UGT1A1. *Clin Pharmacokinet* **62**, 1589–1597 (2023).
362. Borchert, S. *et al.* Screening of Pleural Mesothelioma Cell Lines for Kinase Activity May Identify New Mechanisms of Therapy Resistance in Patients Receiving Platin-Based Chemotherapy. *J Oncol* **2019**, 2902985 (2019).
363. Nathalie Baize Isabelle Monnet, L. G. G. Q. M. K. H. J. A. V. J. B. A. & Chouaid, C. Second-line treatments of small-cell lung cancers. *Expert Rev Anticancer Ther* **17**, 1033–1043 (2017).
364. Pernar Kovač, M. *et al.* Carboplatin-induced upregulation of pan β -tubulin and class III β -tubulin is implicated in acquired resistance and cross-resistance of ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* **80**, 294 (2023).
365. Sriramkumar, S. *et al.* Platinum-induced mitochondrial OXPPOS contributes to cancer stem cell enrichment in ovarian cancer. *J Transl Med* **20**, 246 (2022).
366. Weiner, H. L. & Cohen, J. A. Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. *Multiple Sclerosis Journal* **8**, 142–154 (2002).
367. Guerriero, J. L. *et al.* DNA alkylating therapy induces tumor regression through an HMGB1-mediated activation of innate immunity. *J Immunol* **186**, 3517–3526 (2011).
368. Viaud, S. *et al.* Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res* **71**, 661–665 (2011).
369. Cha, J.-H. *et al.* Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol Cell* **71**, 606–620.e7 (2018).
370. Finisguerra, V. *et al.* Metformin improves cancer immunotherapy by

- directly rescuing tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes from hypoxia-induced immunosuppression. *J Immunother Cancer* **11**, (2023).
371. Huang, X. *et al.* Metformin Reprograms Tryptophan Metabolism to Stimulate CD8+ T-cell Function in Colorectal Cancer. *Cancer Res* **83**, 2358–2371 (2023).
372. Murai, J. *et al.* Differential trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res* **72**, 5588–5599 (2012).
373. Cong, K. *et al.* Replication gaps are a key determinant of PARP inhibitor synthetic lethality with BRCA deficiency. *Mol Cell* **81**, 3128–3144.e7 (2021).
374. Petropoulos, M. *et al.* Transcription-replication conflicts underlie sensitivity to PARP inhibitors. *Nature* **628**, 433–441 (2024).
375. Xue, H. *et al.* A two-step mechanism governing PARP1-DNA retention by PARP inhibitors. *Sci Adv* **8**, eabq0414 (2022).
376. Güldenpfennig, A. *et al.* Absence of mitochondrial SLC25A51 enhances PARP1-dependent DNA repair by increasing nuclear NAD⁺ levels. *Nucleic Acids Res* **51**, 9248–9265 (2023).
377. Cambronne, X. A. & Kraus, W. L. Location, Location, Location: Compartmentalization of NAD⁺ Synthesis and Functions in Mammalian Cells. *Trends Biochem Sci* **45**, 858–873 (2020).
378. Li, Y. *et al.* SLC25A51 promotes tumor growth through sustaining mitochondria acetylation homeostasis and proline biogenesis. *Cell Death Differ* **30**, 1916–1930 (2023).
379. Martí, J. M. *et al.* Selective modulation by PARP-1 of HIF-1 α -recruitment to chromatin during hypoxia is required for tumor adaptation to hypoxic conditions. *Redox Biol* **41**, 101885 (2021).
380. Martínez-Romero, R. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulation of in vivo response of brain hypoxia-inducible factor-1 to hypoxia/reoxygenation is mediated by nitric oxide and factor inhibiting HIF. *J Neurochem* **111**, 150–159 (2009).
381. Martínez-Romero, R. *et al.* Aging affects but does not eliminate the enzymatic antioxidative response to hypoxia/reoxygenation in cerebral cortex. *Exp Gerontol* **41**, 25–31 (2006).
382. Kopecka, J. *et al.* Hypoxia as a driver of resistance to immunotherapy. *Drug Resist Updat* **59**, 100787 (2021).
383. Schöning, J. P., Monteiro, M. & Gu, W. Drug resistance and cancer stem cells:

- the shared but distinct roles of hypoxia-inducible factors HIF1 α and HIF2 α . *Clin Exp Pharmacol Physiol* **44**, 153–161 (2017).
384. Collet, L. *et al.* BRCA1/2 alterations and reversion mutations in the area of PARP inhibitors in high grade ovarian cancer: state of the art and forthcoming challenges. *Front Oncol* **14**, 1354427 (2024).
385. Lheureux, S. *et al.* EVOLVE: A Multicenter Open-Label Single-Arm Clinical and Translational Phase II Trial of Cediranib plus Olaparib for Ovarian Cancer after PARP Inhibition Progression. *Clinical Cancer Research* **26**, 4206–4215 (2020).
386. França, G. S. *et al.* Cellular Adaptation to Cancer Therapy along a Resistance Continuum. *Nature* vol. 631 (Springer US, 2024).
387. Rafii, S. *et al.* Baseline clinical predictors of antitumor response to the PARP inhibitor olaparib in germline BRCA1/2 mutated patients with advanced ovarian cancer. *Oncotarget* **8**, 47154–47160 (2017).
388. Kindler, H. L. *et al.* Overall Survival Results From the POLO Trial: A Phase III Study of Active Maintenance Olaparib Versus Placebo for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol* **40**, 3929–3939 (2022).
389. Hammel, P. *et al.* PARP inhibition in treatment of pancreatic cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **20**, 939–945 (2020).
390. Cruz, C. *et al.* RAD51 foci as a functional biomarker of homologous recombination repair and PARP inhibitor resistance in germline BRCA-mutated breast cancer. *Ann Oncol* **29**, 1203–1210 (2018).
391. Pellegrino, B. *et al.* Preclinical In Vivo Validation of the RAD51 Test for Identification of Homologous Recombination-Deficient Tumors and Patient Stratification. *Cancer Res* **82**, 1646–1657 (2022).
392. Pozzorini, C. *et al.* Gllnger predicts homologous recombination deficiency and patient response to PARPi treatment from shallow genomic profiles. *Cell Rep Med* **4**, 101344 (2023).
393. Pantel, A. R. *et al.* [18F]FluorThanatrace ([18F]FTT) PET Imaging of PARP-Inhibitor Drug-Target Engagement as a Biomarker of Response in Ovarian Cancer, a Pilot Study. *Clinical Cancer Research* **29**, 1515–1527 (2023).
394. Croteau, E. *et al.* PET Metabolic Biomarkers for Cancer. *Biomark Cancer* **8**, 61–69 (2016).
395. Perez-Fidalgo, J. A. *et al.* Olaparib in combination with pegylated liposomal

- doxorubicin for platinum-resistant ovarian cancer regardless of BRCA status: a GEICO phase II trial (ROLANDO study). *ESMO Open* **6**, 100212 (2021).
396. Perez-Fidalgo, J. A. *et al.* Clinical and molecular signature of survival and resistance to olaparib plus pegylated liposomal doxorubicin in platinum-resistant ovarian cancer: a stratified analysis from the phase II clinical trial ROLANDO, GEICO-1601. *Int J Gynecol Cancer* **33**, 929–936 (2023).