

Caracterització metabòlica de la transformació i la progressió tumoral i anàlisi de l'efecte de nous compostos amb potencial terapèutic.

Miriam Zanuy Porquet

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

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

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

Caracterització metabòlica de la transformació i la progressió tumoral i anàlisi de l'efecte de nous compostos amb potencial terapèutic.

Miriam Zanuy Porquet

Abril 2010



Caracterització metabòlica de la transformació i la progressió tumoral i anàlisi de l'efecte de nous compostos amb potencial terapèutic.

Memòria presentada per **Miriam Zanuy Porquet**, llicenciada en Farmàcia i en Bioquímica per la Universitat de Barcelona, per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona.

Els estudis de tercer cicle necessaris per tal efecte s'han emmarcat en el programa de doctorat de Biomedicina, bienni **2005-2007**, de la Universitat de Barcelona; i el projecte de tesi doctoral es troba inscrit en el **Departament de Bioquímica i Biologia Molecular** de la facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. El treball experimental i la redacció de la memòria que es presenten han estat codirigits per la doctora **Marta Cascante Serratosa** i el doctor **Antonio F. Ramos Montoya**.

Aquesta Tesi Doctoral ha rebut el suport econòmic de la Generalitat de Catalunya.

Barcelona, abril de 2010

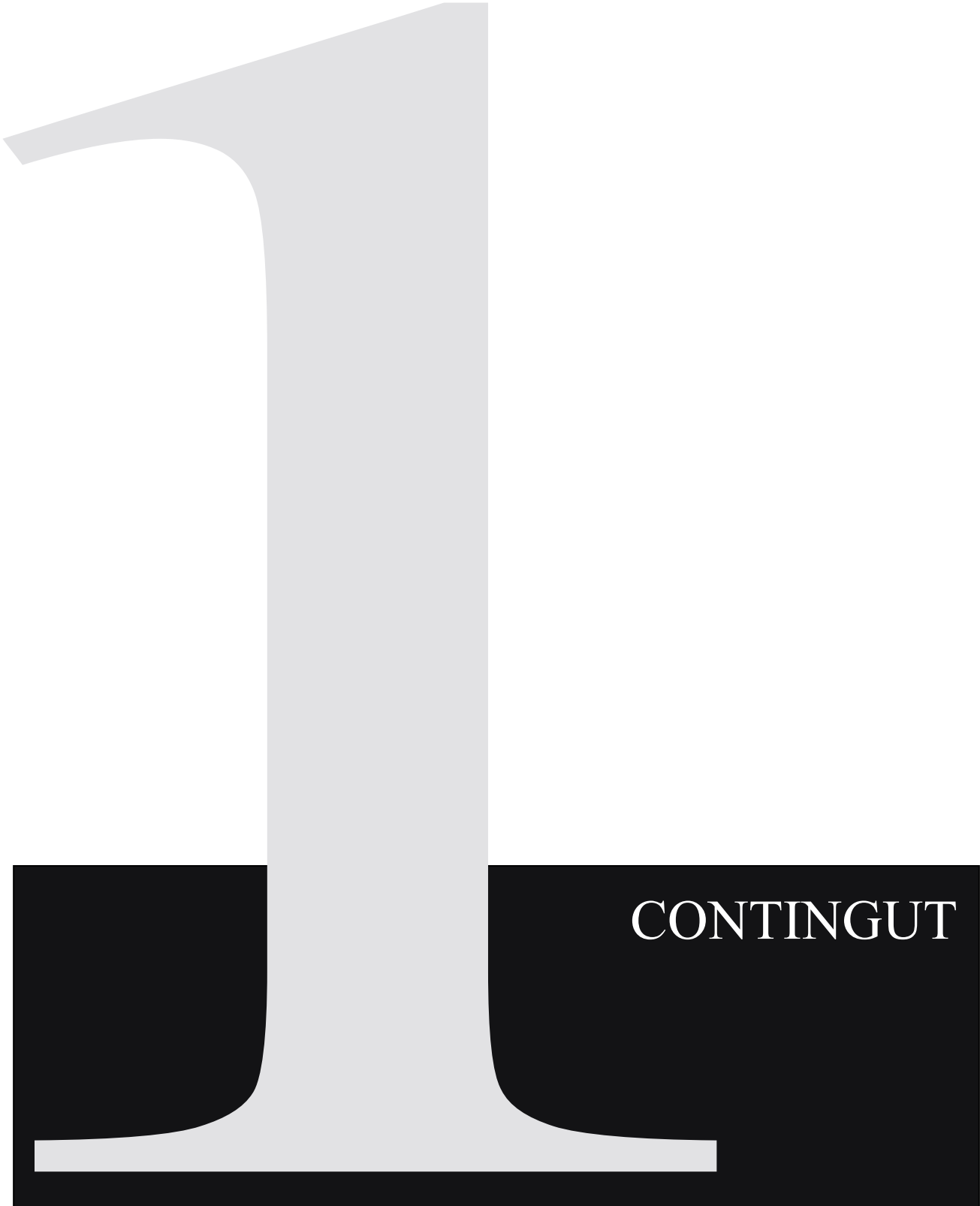
Els directors de la Tesi:

La doctoranda:

Dra. Marta Cascante Serratosa

Miriam Zanuy Porquet

Dr. Antonio F. Ramos Montoya



CONTINGUT

CONTINGUT	i
ABREVIATURES	v
INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1. El càncer	3
1.1 Càncer de còlon, mama i pulmó	4
1.2 Característiques tumorals	9
1.3 El metabolisme tumoral	13
1.3.1 L'efecte Warburg	14
1.3.2 El cicle dels àcids tricarboxílics	17
1.3.3 La glutaminòlisi	17
1.3.4 L'activació de rutes biosintètiques	19
1.3.5 L'expressió de isoenzims i ROS	20
2. El cicle cel·lular i el càncer	22
2.1 Cicle cel·lular i apoptosi com a dianes de teràpia antitumoral	26
2.2 La transició G1/S en la desregulació del cicle cel·lular i la proliferació tumoral	29
2.3 La proteïna del retinoblastoma en la transició G1/S	32
2.4 La inhibició dels enzims que controlen la progressió del cicle cel·lular com estratègia antitumoral	34
3. Rutes de senyalització molecular	36
3.1 Via de transducció de senyal PI3K i factors de transcripció FOXO	39
3.2 La transformació oncogènica: els oncògens <i>Ras</i>	42
4. El <i>crosstalk</i> en càncer	47
5. La metabolòmica	48

OBJECTIUS	53
INFORME DEL DIRECTOR DEL FACTOR D'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS	57
RESUM GLOBAL: RESULTATS, DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS	61
Resultats	63
Discussió	73
Conclusions	80
BIBLIOGRAFIA	83
PUBLICACIONS	101
<i>Capítol 1.</i> La inhibició de CDK4 i CDK6 afecta la progressió tumoral i pertorba el robust perfil metabòlic tumoral	103
<i>Capítol 2.</i> Nova estratègia per a inhibir CDK4 i CDK6 mimetitzant el mecanisme d'acció de p16 ^{INK4a}	141
<i>Capítol 3.</i> Disseny, síntesi i propietats antitumorals de nous inhibidors de CDKs	171
<i>Capítol 4.</i> FOXO3a intervé en els efectes antitumorals de l'àcid metilselenínic aturant el cicle cel·lular induint apoptosi i detoxificant el tumor	189
<i>Capítol 5.</i> Perfil metabòlic associat a la mutació V12 en el gen <i>HRas</i> en fibroblasts de ratolí	211
ANNEX	241
Vizán/Alcarraz-Vizán <i>et al.</i> (2007) <i>Anal Chem.</i> 79 (13):5000-5	



ABREVIATURES

ACC	Acetil-CoA Carboxilasa
Ac-CoA	Acetil-CoA
ACL	ATP citrat liasa
AHH	Aril hidrocarboni hidroxilasa
AIF	Factor inductor de apoptosi
APC-C	Complex promotor de l'anafase
ATM	Proteïna mutada en ataxia telangiectasia
ATR	Proteïna relacionada amb ataxia telangiectasia i RAD3
AVCRI	Agència de Valorització i Comercialització dels Resultats de la Investigació
CAK	Activador de cinasa depenent de ciclina
CDK	Cinasa depenent de ciclina
CHKs	Cinases de control del dany cel·lular
CKI	Inhibidor de cinasa depenent de ciclina
DAG	Diacilglicerol
E4P	Eritrosa-4-fosfat
EGFR	Receptor de factor de creixement epidèrmic
F6P	Fructosa-6-fosfat
FAP	Poliposis adenomatosa familiar
FAS	Àcid gras sintasa
FasL	Lligand a FAS
FBP	Fructosa-1,6-bisfosfat
FOXO	Factors de transcripció <i>forkhead</i> classe O
G3P	Gliceraldehid-3-fosfat

G6P	Glucosa-6-fosfat
G6Pase	Glucosa-6-fosfatasa
G6PDH	Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
GAPS	Proteïnes activadores de l'activitat GTPasa
GC/MS	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
GNEF	Factors intercanviadors de nucleòtids amb guanosina
GSK3- β	Glicogen sintasa cinasa 3 β
HDAC	Histona deacetilases
HER2	Receptor de factor de creixement epidèrmic tipus 2
HIF-1	Factor induïble per hipòxia-1
HK	Hexocinasa
IGFR	Receptor de la insulina
IDH	Isocitrat deshidrogenasa
IP3	Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfat
LC/MS	Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses
LDH	Lactat deshidrogenasa
M2-PK	Piruvat cinasa tipus M2
MAPK	Ruta de cinases acivades per mitògens
MCA	Anàlisi del control metabòlic
ME	Enzim màlic
MEF	Fibroblast embriogènics de ratolí
MIDA	Anàlisi de distribució d'isotopòmers de massa
MnSOD	Superòxid dismutasa de manganès

MS	Espectrometria de masses
NSCLC	Càncer de pulmó de cèl·lules no petites
PEP	Fosfoenolpiruvat
PET	Tomografia per emissió de positrons
PFK	Fosfofructocinasa
PGM	Fosfoglicerat mutasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvat carboxicinasa
PI3K	Fosfoinositol-3-cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat
PK	Piruvat cinasa
PKB	Proteïna cinasa B
PKC	Proteïna cinasa C
PPP	Ruta/Via de las pentoses fosfat
pRb	Proteïna del Retinoblastoma
RMN	Ressonància magnètica nuclear
ROS	Especies reactives d'oxigen
S7P	Sedoheptulosa-7-fosfat
SCLC	Càncer de pulmó de cèl·lules petites
SCO ₂	Proteïna de síntesi de citocrom c oxidasa 2
SDH	Succinat deshidrogenasa
TA	Transaldolasa
TCA	Cicle dels àcids tricarboxílics
TGF α	Factor de creixement tumoral α

TGF β	Factor de creixement tumoral β
TKO	Triple <i>knockout</i>
TKT	Transcetolasa
TKTL1	Transcetolasa <i>like-1</i>
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular



INTRODUCCIÓ
GENERAL

1. El càncer

El càncer és una malaltia altament complexa i heterogènia que s'origina a partir d'una proliferació accelerada, desordenada i descontrolada de les cèl·lules d'un teixit que envaeixen, desplacen i destrueixen, localment i a distància, altres teixits sans de l'organisme. També es denomina càncer, neoplàsies o tumors malignes a un conjunt de més de cent malalties que es classifiquen en funció del teixit i cèl·lula d'origen (Jemal *et al.*, 2005). Cadascuna de les neoplàsies posseeix unes característiques particulars, que en alguns casos són completament diferents a la resta de les altres, podent-se considerar malalties independents, amb les seves causes, evolució i tractament específic. No obstant, en totes elles s'hi dona un descontrol del procés ordenat de divisió cel·lular i cèl·lules innecessàries formen una massa de teixit anomenada tumor (www.cancer.gov).

Segons estimacions de l'agència Internacional d'Investigació del Càncer, que és una branca de l'Organització Mundial de la Salut encarregada de coordinar i promoure la col·laboració internacional en la recerca contra el càncer, aproximadament 12,3 milions de persones van desenvolupar algun tipus de càncer durant el 2007 (www.aecc.es). Els diferents tipus de càncer eren la segona causa principal de mort darrera de les malalties cardiovasculars (Jemal *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 2006). No obstant, mentre les morts per malalties cardíaques ha disminuït poc a poc, les degudes a neoplàsies segueixen augmentant, estant en primer lloc les produïdes com a conseqüència del càncer de pulmó, seguides d'aprop per les de colorectal, mama, pròstata i pàncrees (Terstriep i Grothey, 2006). El perfil espanyol en aquestes estadístiques sembla indicar que al 2015, 220.000 persones seran diagnosticades de càncer, essent el de major incidència el colorectal seguit per pulmó, mama i pròstata.

Cada any la Societat Americana del Càncer estima el nombre de nous casos i morts esperades als Estats Units. Les dades semblen indicar que els ràtios d'incidència han disminuït en els últims temps tant en homes com en dones degut a que els càncers més prevalents en homes (pulmó, còlon i pròstata) i en dones (mama i còlon) han disminuït en incidència. Però malgrat aquesta disminució en incidència i mortalitat i la millora de la supervivència en aquells individus diagnosticats, el càncer és avui en dia la primera causa de mort per malalties en menors de 85 anys (Ahmedin *et al.*, 2009) i es calcula que al 2020 serà la principal causa de mort per a 20 milions de persones (Jemal *et al.*, 2008).

L'aparició del càncer no es deu a un únic factor sinó a la combinació de diversos factors que s'engloben de manera general en dos grups: factors genètics i ambientals. El procés pel qual s'origina un càncer i les cèl·lules normals es transformen en cancerígenes i pel qual adquireixen la capacitat de multiplicar-se descontroladament i envair teixits i altres òrgans es diu carcinogènesis. Aquest procés sol ser llarg i passa per diferents etapes, que podríem separar en

tres fases: iniciació, promoció i progressió. Totes les cèl·lules que formen part d'un tumor deriven d'una única cèl·lula que adquireix la capacitat de proliferar descontroladament respecte a la resta de cèl·lules que l'envolten degut a alguna alteració en el seu material genètic (fase d'iniciació) (Davidsson *et al.*, 2005). Després d'acumular-se diverses mutacions (fase de promoció), aquestes cèl·lules adquireixen un fenotip característic més agressiu (fase de progressió). Una única mutació no és suficient perquè la cèl·lula sigui tumoral però el cúmul de diverses mutacions pot fer que la cèl·lula alterada sigui capaç de dividir-se de forma incontrolada. Les alteracions que es produeixen en aquesta fase són irreversibles però no són suficients per convertir les cèl·lules en tumorals. Aquestes cèl·lules iniciades poden sofrir noves mutacions que produeixen un augment en la taxa de proliferació i que al seu torn fan que s'acumulin més mutacions a les cèl·lules, que són ara ja cèl·lules promocionades. Mitjançant noves mutacions (Goodrich, 2006; Hahn i Weinberg, 2002) aquestes cèl·lules poden adquirir un fenotip maligne i per tant la capacitat d'invasió, tant a nivell local com a distància, de manera que en aquesta tercera fase de progressió es poden originar metàstasi.

De totes maneres, tan sols una mínima part de les cèl·lules d'un organisme que muten acaben originant un tumor degut a que la major part de les cèl·lules mutades deixen de ser viables i moren i només algunes cèl·lules mutades sobreviuen i perden els controls de retroalimentació que impedeixen el seu creixement excessiu. A més a més, les cèl·lules potencialment canceroses solen ser destruïdes pel sistema immunitari de l'organisme que forma anticossos contra les cèl·lules canceroses i les destrueix.

Aquelles cèl·lules que hagin sobrepassin els mecanismes de control cel·lular adquiriran un gran potencial maligne que només es manifestarà quan sofreixin una transformació metabòlica necessària per proporcionar els requeriments biosintètics i energètics per a la proliferació tumoral (Gatenby i Gillies, 2004; Tennant *et al.*, 2009).

1.1 Càncer de còlon, mama i pulmó

Segons el teixit d'origen on la cèl·lula tumoral comenci a desenvolupar una massa tumoral es parla de diferents tipus de càncer:

Càncer de còlon:

El càncer de còlon seria un clar exemple de la progressió tumoral característica dels càncers. Al 1990, Vogelstein, va proposar un model per explicar com successius canvis genètics acabaven donant lloc al càncer colorectal. El model proposà que gens com *APC*, *KRas*, *DCC* i *p53* han d'estar mutats per produir la patologia (Arends, 2000). Totes aquestes mutacions confereixen avantatges adaptatius pel creixement de les cèl·lules epitelials promovent la seva

transformació a pòlips adenomatosos que poden desenvolupar invasió local i metàstasi gràcies a la interacció amb la matriu extracel·lular, indispensable per la cèl·lula tumoral, per tal d'adquirir nutrients i oxigen (Gout i Huot, 2008).

Aquesta caracterització de la progressió tumoral és de gran importància, ja que el càncer de còlon és la primera causa de mort per càncer a Espanya. Per gèneres, és la segona en homes i en dones, per darrere dels càncers de pulmó i mama, respectivament (Lopez-Abente *et al.*, 2004).

Partint de la seva forma de transmissió i origen s'ha classificat en esporàdic i hereditari, sent l'esporàdic el que representa el 75% dels casos (Kitisin i Mishra, 2006). Que la incidència del càncer de còlon sigui major en països desenvolupats en relació amb països menys desenvolupats és atribuïble a factors relacionats amb l'estil de vida com són l'obesitat o el consum de carn processada i inversament relacionada amb l'activitat física i el consum de fruites i verdures (Ballinger i Anggiansah, 2007). En relació amb els casos en els quals la genètica juga un paper important, l'història familiar és el factor de risc més comú per als càncers de còlon. Encara que només representin el 5% dels casos de càncer colorectal, les síndromes familiars més comunes són la poliposis adenomatosa familiar (FAP) i el càncer colorectal no polipòsit hereditari (Winawer *et al.*, 2003).

En l'actualitat, d'un mode accelerat està minvant els ràtios d'incidència de càncer de còlon essent conseqüència de la implantació generalitzada dels *screenings* que es realitzen en adults major de 50 anys. Malauradament altres estudis indiquen que la incidència en càncer colorectal ha augmentat un 1,5% i un 1,6 % per any en homes i dones menors de 50 anys, respectivament des del 1992 al 2005. Per aquest motiu, són necessaris encara molt més estudis encarats a la prevenció i detecció d'aquest càncer en la població (Siegel *et al.*, 2009). L'estat dels diferents tractaments del càncer es pot revisar a Chau i col·laboradors del 2009 on es fa un estudi de les diferents teràpies emprades per combatre el càncer de còlon (Chau i Cunningham, 2009).

Càncer de mama:

Existeixen dos tipus principals de càncer de mama: El carcinoma ductal, que és el majoritari, que comença als conductes que porten llet des de la mama fins a al mugró i el carcinoma lobel·lar que comença a les parts de les mames que produeixen llet. Molts càncers de mama són sensibles als estrògens (càncer positiu per a receptors d'estrògens o càncer RE+), la qual cosa significa que l'estrògen fa que el tumor cancerós mamari creixi i sigui més agressiu i recurrent. També existeix un component genètic associat al desenvolupament del càncer de

mama. Al voltant del 20 al 30% de les dones amb càncer de mama tenen antecedents familiars de la malaltia.

Avui en dia, el càncer de mama, com altres formes de càncer, és considerat el resultat del dany ocasionat al DNA. Aquest dany prové de molts factors coneguts o hipotètics (tals com l'exposició a radiació ionitzant, exposició a estrògens, mutació en els gens *BRCA1*, *BRCA2* (Hamilton, 2009), i p53).

Sembla ser que hi ha un increment del risc de càncer de mama en els primers 3 o 4 anys després de parir, essent el risc menor de que si no s'hagués parit. Per una altra banda, la lactància disminueix el risc de càncer de mama (Freund *et al.*, 2005). La probabilitat d'adquirir càncer de mama augmenta amb l'edat, però el càncer de mama tendeix a ser més agressiu quan ocorre en dones joves, essent el càncer de mama inflamatori especialment agressiu i desproporcional.

La incidència del càncer de mama s'ha vist augmentada en els darrer anys en els països desenvolupats (Glass *et al.*, 2007; Hery *et al.*, 2008). Concretament des de finals dels 70 amb la introducció dels *screenings*, va augmentar un 2% per any (Westlake i Cooper, 2008). Durant els 90 l'increment en l'ús de teràpia de reemplaçament hormonal va anar lligada amb el increment amb la incidència del càncer de mama (Beral *et al.*, 1997; Quinn *et al.*, 2008). A nivell mundial més d'un milió de dones són diagnosticades anualment de càncer de mama, essent la incidència més marcada al Nord d'Amèrica i menys a l'Àfrica o l'Àsia (<http://info.cancerresearchuk.org/index.htm>).

L'inici i la progressió del càncer de mama són processos altament influïts per l'exposició a estrògens tant endògens com exògens (Hankinson *et al.*, 2004). Aquestes molècules, a causa del seu efecte mitòtic sobre les cèl·lules mamàries, poden accelerar el desenvolupament del càncer de mama en diferents punts al llarg de la progressió tumoral, des de les primeres mutacions fins a la metastasi del tumor (Preston-Martin *et al.*, 1990).

Així mateix, aquestes hormones porten a terme la seva acció fisiològica mitjançant els receptors d'estrògens, ER, els quals són activats a través de dos mecanismes generals: activació dependent de lligand (via clàssica), en la qual els estrògens s'uneixen al receptor i el complex resultant interacciona directament amb el DNA per a la regulació de la transcripció gènica, i activació independent de lligand, en la qual el receptor ER és activat, en part, prèvia fosforilació pels receptors de factors de creixement o altres molècules amb activitat serina o tirosina cinasa (Boris *et al.*, 2007). Hi ha dos tipus principals d'ER- ER α i ER β - cadascun amb diferents isoformes i variants. Almenys el 70% dels càncers de mama són classificats com a ER positius, de manera que la inhibició del receptor ER mitjançant molècules antiestrogèniques com a

teràpia coadjuvant, juntament amb quimioteràpia i radioteràpia, en el tractament del càncer de mama, ha constituït una de les teràpies amb més èxit fins ara.

Així doncs, s'han fet grans avenços en els darrers anys per tal d'entendre la multitud de vies implicades en el desenvolupament del càncer de mama. Aquests avenços han permès en els últims anys fer teràpies moleculars específiques encarregades d'atacar les molècules clau pel desenvolupament del fenotip tumoral. Aquestes teràpies, per exemple, van enfocades al receptor de factors de creixement epidermal (HER2), amb el trastuzumab i lapatinib com a capdavanters (Baselga i Swain, 2009; Rabindran, 2005 {Di Cosimo, 2008 #1372}).

A més a més, avui en dia s'estan provant noves teràpies contra el receptor de factors de creixement epidermal tipus 2 (HER2), altres tirosines cinases com Src i el receptor de la insulina (IGFR), o teràpies que promouen l'apoptosi o interfereixen en la via PI3 cinasa (PI3K)-Akt-mTOR. La selectivitat que ens aporten aquestes noves teràpies permet reduir els efectes secundaris i permet adequar a cadascun dels individus el tractament pel tipus de càncer que està sofrint (Sanchez-Munoz *et al.*, 2009).

Càncer de pulmó:

La gran majoria dels tipus de càncer de pulmó són carcinomes, és a dir, tumors malignes que neixen de cèl·lules epitelials. Hi ha dues formes addicionals de càncer de pulmó, categoritzats per la mida i aparença de les cèl·lules malignes vistes histopatològicament sota un microscopi: els tumors de cèl·lules no petites (NSCLC) (80,4%) i els de cèl·lules petites (SCLC) (16,8%) (Travis *et al.*, 1995). Aquesta classificació està basada en criteris histològics i té importants implicacions pel tractament i el pronòstic de la malaltia.

Existeixen tres subtipus principals de NSCLC: el carcinoma de cèl·lules escatoses de pulmó, els adenocarcinomes i el carcinoma pulmonar de cèl·lules grans, el pronòstic i tractament dels quals són molt similars.

El càncer de pulmó és una neoplàsia molt agressiva i mortal, la majoria dels pacients moren abans del primer any després del diagnòstic. És el càncer més freqüent en homes de més de 35 països, sobretot països desenvolupats o industrialitzats, inclòs Espanya, sent la primera causa de mort per càncer al món en homes. Més persones moren de càncer del pulmó que de càncer de colòn, de mama i de pròstata junts. Representa el 12,5% de tots els tumors malignes a Espanya i és la primera de mortalitat entre dones als Estats Units.

El nombre de casos ha anat en augment des de principis del segle XX, duplicant-se cada 15 anys. El càncer de pulmó és menys comú en països en via de desenvolupament (www.oms.org) tanmateix, s'espera que la incidència augmenti en els propers anys, notablement a Xina (Liu *et al.*, 1998) i l'Índia (Behera i Balamugesh, 2004).

Les principals causes del càncer de pulmó, així com del càncer en general, inclouen carcinògens tals com al fum del cigarret, radiació ionitzant i infeccions virals. L'exposició a aquests agents causa canvis acumulatius sobre el DNA de les cèl·lules, acumulant-se progressivament alteracions genètiques que transformen l'epiteli que revesteix els bronquis del pulmó. A mesura que el dany és més extens, es desenvolupa un càncer.

La demostració d'una relació positiva entre el tabac i l'aparició del càncer de pulmó està ben establerta, fins al punt que gairebé es considera més que un factor de risc un factor causal i és indiscutible per les dades acumulades estadísticament, clínica i investigativa (Liu *et al.*, 1998).

A més a més, altres factors com serien l'asbest, el radó (Catelinois *et al.*, 2006), així com la contaminació atmosfèrica o virus (Palmarini i Fan, 2001) podrien afavorir el desenvolupament de la malaltia. Per una altra banda, l'ús prolongat de multivitamines redueix el risc de desenvolupar càncer de pulmó i no així la ingesta de β -carotè que sembla ser que enlloc d'actuar com a antioxidant pels radicals lliures, actua com a prooxidant un cop s'ha metabolitzat (Greenwald *et al.*, 2007).

A més, si hi ha antecedents familiars de càncer de pulmó, es té un major risc de contreure un altre càncer de pulmó (Foulkes, 2008). Existeix un component genètic important, de manera que mutacions en el protooncogen *KRas* donen lloc entre el 10–30% dels adenocarcinomes de pulmó (Son *et al.*, 2006; Wenzlaff *et al.*, 2005).

Incrementos en els nivells de l'enzim aril hidrocarboni hidroxilasa (AHH), que és un enzim del metabolisme del benzopirè, converteixen els hidrocarburs policíclics en substàncies altament cancerígenes (Pilarska-Machowicz, 1990).

Diversos polimorfisme genètic estan associats al càncer de pulmó, com en el gen que codifica la interleucina-1 (Engels *et al.*, 2007), el citocrom P450 (Wenzlaff *et al.*, 2005), els promotors de l'apoptosi tals com la caspasa 8 (Son *et al.*, 2006) i molècules reparadores del DNA com la XRCC1 (*x-ray repair cross-complementing group 1*) (Yin *et al.*, 2007). Aquelles persones que continguin aquests polimorfismes estan més predisposades a l'aparició del càncer de pulmó com a conseqüència d'una o repetides exposicions a carcinògens. Altres gens, la mutació o alteració dels quals està relacionat amb el càncer de pulmó són: *c-MET*, *NKX2-1*, *LKB1*, *PIK3CA*, i *BRAF* (Wenzlaff *et al.*, 2005).

Generalment en la quimioteràpia pel càncer de pulmó s'utilitza una combinació de medicaments contra el càncer (poliquimioteràpia). El cisplatí, o el seu similar, el carboplatí, són els agents quimioterapèutics que s'usen amb més freqüència per tractar el càncer del pulmó NSCLC (Murray i Turrisi, 2006). Estudis recents han trobat que la combinació de qualsevol

d'aquests amb medicaments com la gemcitabina, el paclitaxel, el docetaxel, l'etopòsid (VP-16), o la vinorelbina sembla millorar l'eficàcia en el tractament del NSCLC (Clegg *et al.*, 2002). Es continua investigant en estudis clínics la millor manera d'utilitzar aquesta combinació de medicaments.

1.2 Característiques tumorals

Els càncers s'originen a partir d'una cèl·lula que ha patit mutacions. La progressió d'una cèl·lula normal cap a la malignitat normalment no pot produir-se a partir de només una única mutació oncogènica, sinó que calen diferents esdeveniments addicionals tals com la inactivació de gens supressors de tumors que controlin els sistemes de vigilància del cicle cel·lular (*checkpoints*) i els mecanismes de reparació del DNA, així com també alteracions en el programa bioquímic, abans que emergeixi el fenotip maligne. L'augment de la taxa de proliferació i la pèrdua dels controls de divisió fan que a partir d'aquesta cèl·lula s'originin moltes altres que tindran un component genètic diferent, pel que normalment s'observa una heterogeneïtat cel·lular en la majoria de tumors (Alberts *et al.*, 2002).

Les cèl·lules tumorals presenten una sèrie de característiques comunes en la majoria, sinó en tots, els tipus de tumors humans. Les sis propietats distintives que adquireixen els tumors cap a la seva progressió cap a la malignitat són les que s'exposen a la coneguda revisió de Hanahan i Weinberg del 2000: autosuficiència als senyals de creixement, insensibilitat a senyals antiproliferatius, evasió de la mort cel·lular programada o apoptosi, potencial replicatiu il·limitat, capacitat angiogènica i potencial per envair teixits i produir metàstasi (**Figura 1**). A més a més, recentment s'ha identificat la inflamació (Colotta *et al.*, 2009) i adaptacions metabòliques específiques (Tennant *et al.*, 2009) com a setena i vuitena característiques associades a la cèl·lula cancerígena.

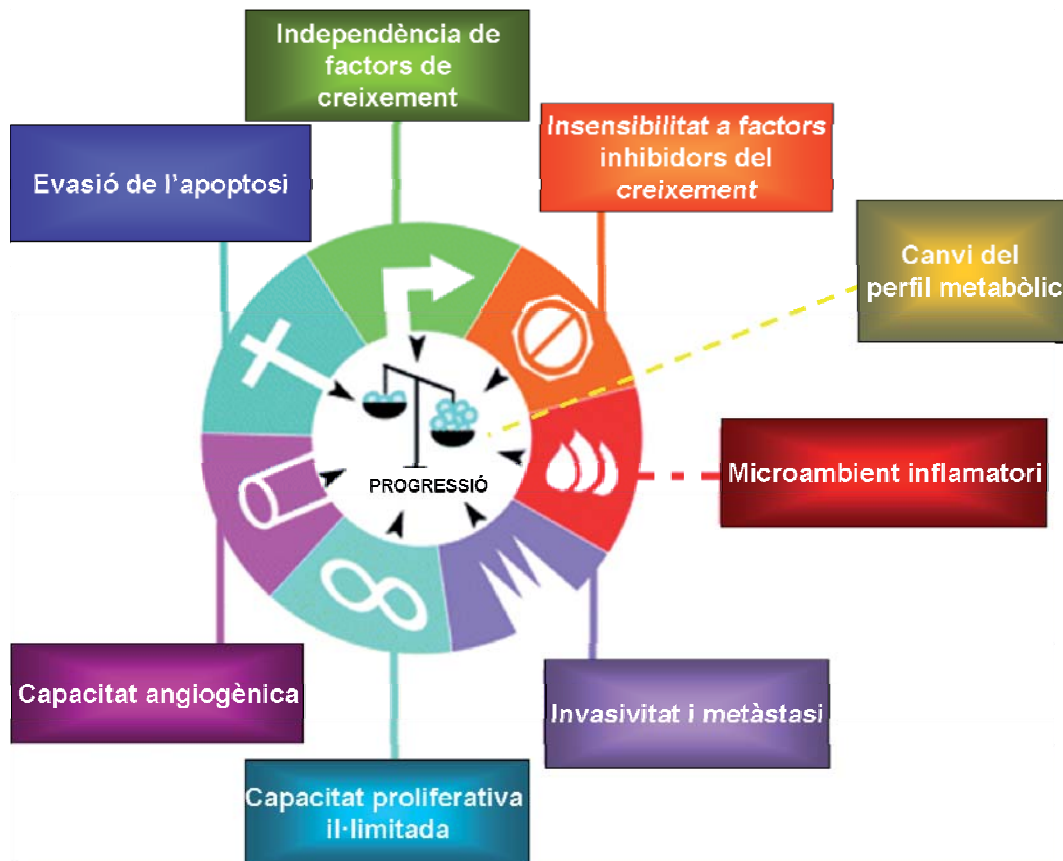


Figura 1. Propietats de les cèl·lules tumorals (adaptada de Hanahan i Weinberg, 2000 i Mantovani, 2002).

Les cèl·lules normals requereixen senyals de creixement per poder abandonar l'estat de quiescència amb l'objectiu d'entrar en estat proliferatiu. Fins al moment no es coneix cap tipus cel·lular capaç de proliferar en absència d'aquests senyals estimuladors. No obstant, les cèl·lules tumorals, encara que els requereixen com qualsevol altra cèl·lula, gràcies als oncògens, poden mimetitzar la senyalització d'un creixement normal reduint la seva dependència a senyals estimuladors procedents del seu entorn. S'han descrit tres estratègies principals per aconseguir aquesta autonomia:

- Adquisició de la capacitat de síntesi de factors de creixement capaços d'autoestimular-se (estimulació autocrina), per exemple, producció de TGF α (*tumor growth factor α*) per part de glioblastomes i sarcomes (Fedi *et al.*, 1997).
- Alteració dels sistemes de transducció de senyals extracel·lulars, tals com la sobreexpressió dels receptors de membrana encarregats de transmetre el senyal a l'interior de la cèl·lula incrementant, així, la resposta a senyals de creixement. Un exemple seria la sobrepressió que es dona del receptor HER2 en carcinoma d'estómac i de mama (Slamon, 1987).

➤ Alteració dels circuits de transducció intracel·lulars de senyals de creixement. Per exemple, en aproximadament el 25% dels càncers la proteïna Ras, un mediador de la senyalització intracel·lular, es troba alterada activant de forma anòmala la via SOS-Ras-Raf-MAPK, que conseqüentment estimula el creixement i la proliferació cel·lular (Medema i Bos, 1993; Schubert *et al.*, 2007). En aquest sentit, la interacció de la proteïna Ras amb la cascada de senyalització PI3K-Akt-mTOR afavoreix l'aparició de nous senyals de supervivència que promouran la proliferació cel·lular (Miller *et al.*, 2009).

En un teixit normal, gran quantitat de senyals antiproliferatius actuen per mantenir l'estat de quiescència i l'homeostasi del teixit. Aquests senyals són capaços de bloquejar la proliferació a través de dos mecanismes principals: obligant a les cèl·lules a parar el cicle cel·lular i entrar en una fase de quiescència o bé poden induint-les a entrar en un estat postmitòtic normalment relacionat amb una adquisició de característiques associades a l'estat diferenciat. A nivell molecular, la majoria dels senyals antiproliferatius són executats a través de la proteïna del retinoblastoma (pRb), la qual, en estat actiu bloqueja la proliferació mitjançant el segrest del factor de transcripció E2F, el qual controla l'expressió del conjunt de gens necessaris per a la progressió de G1 a S. D'aquesta manera, pRb es converteix en un gen supressor de tumors (Hanahan i Weinberg, 2000). Les cèl·lules tumorals solen presentar diferents alteracions en el procés de senyalització que inclouen tant la mutació i la pèrdua de la funció d'aquesta proteïna per l'alteració dels complexos ciclina-CDK que inactiven pRb (Goodrich, 2006), com l'alteració de les diferents vies (regulació negativa de receptor pel factor de creixement tumoral β (TGF β)) que convergeixen en la seva inactivació (Kitisin *et al.*, 2007). En general, les cèl·lules tumorals creen diferents mecanismes per poder evitar els punts de restricció del cicle cel·lular mitjançant la inhibició de gens supressors de tumors i escapant dels senyals antiproliferatius (Christofori, 2006).

La capacitat d'expansió d'una població de cèl·lules tumorals està determinada no només per la seva taxa proliferativa sinó també per la seva taxa de mortalitat. La mort cel·lular programada o apoptosi constitueix el principal procés pel qual es porta a terme la disminució de la població quan els mecanisme de control per evitar la proliferació defectiva fallen, per això, la capacitat de resistència a l'apoptosi és una característica fonamental en tots els tipus de càncer. De manera, que la cèl·lula tumoral és capaç d'activar i inactivar proteïnes implicades en l'apoptosi desencadenant finalment el procés apoptòtic. Per exemple, aproximadament el 50% dels tumors alberguen mutacions en la proteïna p53 (Harris, 1996). Aquesta actua com a gen supressor de tumors induint la cascada apoptòtica una vegada detectats danys en el DNA. En conseqüència, la pèrdua de la seva funció permet a la cèl·lula tumoral proliferar encara que tingui danys importants en el seu genoma.

Les tres capacitats adquirides descrites anteriorment condueixen a un desacoblament del programa de creixement de la cèl·lula respecte als senyals procedents de l'ambient. Tot i això, investigacions recents han demostrat que l'adquisició d'aquestes capacitats no és suficient pel creixement del tumor. Aquest fet és degut a que totes les cèl·lules de mamífer tenen un potencial replicatiu finit i després d'una sèrie de divisions entren en senescència. Aquesta senescència pot ser evitada mitjançant la pèrdua de gens supressors de tumors com pRb o p53 (Fridman i Tainsky, 2008). Així mateix el manteniment dels telòmers per sobre de la longitud crítica, característic de tots els tipus de cèl·lules tumorals malignes, permet la replicació il·limitada d'aquestes cèl·lules, evitant la seva senescència i per tant ajudant a la seva immortalitat (Bryan i Cech, 1999; Denchi, 2009).

L'oxigen i els nutrients facilitats per la xarxa vascular són crucials per a la funció cel·lular i la supervivència, obligant a les cèl·lules a residir a una distància màxima de 100 µm d'un capil·lar sanguini. Així doncs, la neovascularització o angiogènesi dels tumors sòlids és un requisit imprescindible pel seu manteniment i desenvolupament ja que necessiten aportació de nutrients i oxigen (Bertout *et al.*, 2008). Amb l'objectiu de sobrepassar aquesta limitació, les cèl·lules tumorals presenten la capacitat d'induir i mantenir el desenvolupament de nous vasos sanguinis (Serini *et al.*, 2009). Una estratègia és la sobreexpressió de factors inductors d'angiogènesi per part dels tumors, per exemple el VEGF (factor de creixement endotelial vascular), que indueix la proliferació de les cèl·lules endotelials dels capil·lars sanguinis pròxims al tumor. Poc és conegut sobre l'adaptació metabòlica de cèl·lules endotelials activades. Només recentment, s'ha descrit la via de síntesi de glicogen, així com la glicolítica i la de les pentoses fosfat com a fonamentals en l'activació per factors de creixement endotelials de les cèl·lules humanes endotelials de vena de cordó umbilical, de manera que la inhibició d'aquestes vies metabòliques redueix la viabilitat i la migració d'aquestes cèl·lules (Vizan *et al.*, 2009b).

La capacitat per envair i metastitzar, característiques inherents a la progressió tumoral, permet a les cèl·lules tumorals escapar de la massa tumoral primària i colonitzar noves zones de l'organisme on els nutrients i l'espai són limitants. Aquests assentaments coneguts com a metàstasi causen un 90% de les morts per càncer (Leber i Efferth, 2009). Com en la formació de masses tumorals primàries, la invasió i la metàstasi, es troben estretament relacionades a nivell de mecanisme. Depenen de les altres capacitats adquirides. Les alteracions que es poden donar per tal de desenvolupar un fenotip invasiu afecten a la transducció de senyals de proliferació, adhesió cel·lular (pèrdua de la funció de la proteïna E-cadherina) (Makrilia *et al.*, 2009), expressió de gens i mobilitat cel·lular. Gran varietat d'oncògens, gens supressors de tumors i supressors de metàstasi afecten al potencial d'invasió i metàstasi de les cèl·lules tumorals. La sobreexpressió de gens codificants per proteases així com l'elevada activació de

zimògens, enzims que s'activen després de la proteòlisi, donen lloc a estratègies que permeten la degradació de la matriu extracel·lular i l'abandonament de la seva localització inicial, facilitant la metastasi i la invasió. A més a més, aquestes proteases són capaces de formar cascades interconnectades, circuits i xarxes que augmenten el potencial maligne de la cèl·lula tumoral (Flores-Resendiz *et al.*, 2009).

Molts estudis actualment apunten a que a més de les 6 característiques descrites per Hanahan (Hanahan i Weinberg, 2000), d'altres n'ha d'adquirir la cèl·lula tumoral o són conseqüència de les anteriors per tal d'esdevenir completament neoplàsica. De fet, varis autors afirmen que la bioenergètica seria la setena característica (Frezza i Gottlieb, 2009; Garber, 2006), mentre que d'altres afirmen, com s'ha mencionat anteriorment, que ho és el microambient inflamatori o el canvi metabòlic cel·lular robust que acompanya el procés cancerigen i que es descriu a continuació (Kroemer i Pouyssegur, 2008)

1.3 El metabolisme tumoral

Una vegada produïda la transformació de la cèl·lula normal, la cèl·lula tumoral adquirirà un gran potencial maligne que no es manifestarà mentre no es produeixin en ella alteracions metabòliques en el seu metabolisme (transformació metabòlica), per poder així, abastir els requeriments sintètico-bioenergètics necessaris per la proliferació tumoral (Costello i Franklin, 2006).

En els últims anys, el metabolisme tumoral ha despertat un creixent interès entre la comunitat científica en el camp de l'oncologia. Ateses les característiques anteriorment anomenades de la cèl·lula tumoral sembla evident que, per mantenir l'alta taxa de proliferació, les cèl·lules tumorals han de reprogramar el seu metabolisme amb l'objectiu de satisfer l'alta demanda energètica i biosintètica que comporta una replicació descontrolada.

L'adquisició d'un fenotip tumoral complet ha d'estar per tant acompanyada de l'adquisició d'un fenotip metabòlic característic (DeBerardinis *et al.*, 2008a; Deberardinis *et al.*, 2008b; Jin *et al.*, 2007; Kroemer i Pouyssegur, 2008; Pelicano *et al.*, 2006; Samudio *et al.*, 2009; Tennant *et al.*, 2009; Vizán *et al.*, 2008).

El fet que les cèl·lules canceroses mostrin un perfil metabòlic distintiu comparat amb les cèl·lules normals ofereix la possibilitat de dissenyar noves estratègies basades en específicament revertir o bloquejar les adaptacions metabòliques adquirides. Es més, la sobreexpressió d'aquells isoenzims tumorals de les diferents rutes metabòliques també ofereix una nova oportunitat per desenvolupar teràpies antitumorals. De manera que inhibicions específiques d'aquests isoenzims afectaran a la cèl·lula tumoral i no a les no tumorals. L'estudi

del perfil metabòlic característic adquirit per la cèl·lula tumoral, resultat de la integració final de les modificacions a nivell transduccional que ha sofert la cèl·lula, pot arribar a ser una bona diana en teràpies antitumorals.

Per tant, es requereix una millor comprensió de les adaptacions metabòliques que impliquen la hipòxia, la transformació dels oncògens, la diferenciació cel·lular, l'apoptosi i la progressió del cicle cel·lular per tal d'identificar dianes complementaries en el disseny de teràpies combinades antitumorals. De manera que, una millor comprensió del metabolisme tumoral pot obrir nous camins en el descobriment de nous fàrmacs i en el disseny de teràpies combinades que inhibeixin per exemple les proteïnes que controlen el cicle cel·lular i els enzims que controlen les adaptacions metabòliques específiques de la cèl·lula tumoral.

1.3.1 L'efecte Warburg

Una característica comuna als diferents tipus de tumors tant humans com animals, ja descrita per Otto Warburg l'any 1924, és la seva elevada taxa glicolítica en condicions aeròbiques (Warburg, 1956; Warburg *et al.*, 1924). Aquest fenomen, conegut com a efecte Warburg, implica que hi hagi una elevada formació de lactat en condicions aeròbiques. La ineficiència energètica d'aquest procés comparat amb la respiració mitocondrial (només utilitza el 5% de l'energia disponible de la glucosa, 2 ATPs per glicòlisi enfront als 32 que obtindria per fosforilació oxidativa), augmenta el consum de glucosa en cèl·lules tumorals, distintiu que ha estat explotat en la clínica per la detecció de neoplàsies per Tomografia per emissió de positrons (PET) (Gambhir, 2002). Encara que la relació causa-efecte entre l'augment en la glicòlisi aeròbia i el desenvolupament del càncer és polèmica (Zu i Guppy, 2004), una glicòlisi elevada ha estat observada sistemàticament en moltes cèl·lules tumorals de diferents teixits d'origens diversos (Semenza *et al.*, 2001), suggerint que aquesta alteració metabòlica és comú en el càncer.

El mecanisme molecular que suporta aquesta alta capacitat glicolítica ha estat àmpliament estudiat i en l'actualitat s'han identificat alguns dels factors claus (Elstrom *et al.*, 2004; Gatenby i Gillies, 2008; Kim *et al.*, 2006; Kondoh *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2002; Matoba *et al.*, 2006; Plas i Thompson, 2005; Vander Heiden *et al.*, 2009). En un principi, Warburg va suggerir que aquest fenomen era degut a defectes en la cadena respiratòria, però s'ha demostrat que aquests defectes no són comuns en tots els tumors i que la inhibició de la cadena respiratòria no causa una elevada taxa glicolítica (Eigenbrodt *et al.*, 1985). Les causes i els avantatges d'aquest fenomen conegut actualment com a efecte Warburg, que constitueix un segell d'identitat de les cèl·lules tumorals, encara no han estat esclarides (Hsu i Sabatini, 2008). La resposta a la pregunta no és única i en qualsevol cas se l'ha d'integrar dins del conjunt del

fenotip tumoral, vist com una reprogramació metabòlica global (Samudio *et al.*, 2009; Vander Heiden *et al.*, 2009) (**Figura 2**).

Les cèl·lules tumorals han perdut la dependència de senyals externs per a la captació de nutrients i han augmentat la seva capacitat d'absorbir glucosa (Gu, 2006 # 438; Ortega, 2009 # 449). Ja que la glicòlisi aeròbica és molt més ràpida que la fosforilació oxidativa, aquesta podria ser una explicació a l'efecte Warburg. Una altra possible explicació per a l'alta taxa de producció de lactat podria ser conseqüència d'una alteració selectiva per evitar una apoptosi duta a terme per la mitocondria, ja que la cadena respiratòria és la principal generadora d'espècies reactives d'oxigen (ROS) que poden portar a la mort cel·lular programada.

Una altra via de senyalització que cobra importància en càncer és la de PI3K-Akt (Elstrom *et al.*, 2004; Plas i Thompson, 2005). Aquesta via es troba sobreactivada en un gran nombre de tumors, provocant un augment en la captació de glucosa i induint un augment en la via glicolítica. En aquest sentit, recentment s'ha proposat que la proteïna cinasa Akt pugui ser la principal reguladora de les característiques bioquímiques de les cèl·lules tumorals (Robey i Hay, 2009). Sovint, oncògens i gens supressors tumorals guarden una estreta relació, com en el cas del factor induïble per hipòxia-1 (*HIF-1*), *Myc* i *p53* (Yeung *et al.*, 2008), de manera que les seves alteracions sempre estan encaminades al desenvolupament d'un fenotip més robust que permeti a les cèl·lules tumorals proliferar incontroladament. En concret, cal destacar el paper de *HIF-1*, modulats per oncògens com *Ras* or *Her2*, induint l'expressió de múltiples enzims glicolítics (Dang i Samenza, 1999; Gordan *et al.*, 2007; Kikuchi *et al.*, 2009; Laughner *et al.*, 2001) que afavoreixen la progressió tumoral en medis en els que la disponibilitat d'oxigen és limitada, fet que, com ja s'ha apuntat, és freqüent en tumors sòlids no vascularitzats. Tot i aquesta característica on la progressió del tumor és invariablement associada amb la hipòxia, s'ha de tenir en compte que una oxigenació deficient sembla tenir efectes oposats sobre la biologia del càncer: d'una banda, limita la divisió de les cèl·lules tumorals i, d'altra, selecciona les cèl·lules més malignes i indueix una sèrie d'adaptacions cel·lulars per fomentar la invasió tumoral. De fet, hi ha estudis on s'ha demostrat que subministrar oxigen al tumor no només suprimeix la disseminació de la metàstasi, sinó que també promou la diferenciació de la cèl·lula cancerosa. Per tant, aquesta adaptació tumoral s'ha de veure des del punt de vista terapèutic com una dicotomia a resoldre: s'ha de tallar l'aportació d'oxigen, per afavorir l'expansió del càncer o bé s'ha de deixar que el tumor tingui oxigen disponible per tal de prevenir la transformació maligna? (Michieli, 2009).

Per una altra banda, el factor de transcripció oncogènic *Myc* s'ha relacionat amb l'expressió de diversos enzims glicolítics com la lactat deshidrogenasa (Rimpi i Nilsson, 2007). A més a més, la regulació del metabolisme també es pot donar per la via de PI3K-Akt-mTOR (Plas i Thompson, 2005; Rossignol *et al.*, 2004), normalment activada en cèl·lules tumorals. En

aquest sentit, recentment s'ha proposat que la proteïna cinasa Akt pugui ser la principal reguladora de les característiques bioquímiques de les cèl·lules tumorals (Robey i Hay, 2009).

La cèl·lula tumoral, gràcies a un nou perfil d'isoenzims glicolítics (per exemple, hexocinasa i lactat deshidrogenasa), presenta una glicòlisi molt activa que facilita la disponibilitat d'intermediaris glicolítics per tal de redirigir-los als diferents processos biosintètics com la síntesi de nucleòtids de nucleòtids i d'altres proteïnes.

Així, es pot afirmar que les cèl·lules tumorals són altament dependents de la glicòlisi pel que aquesta via podria ser clau pel disseny de noves teràpies antitumorals (Pelicano *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2008).

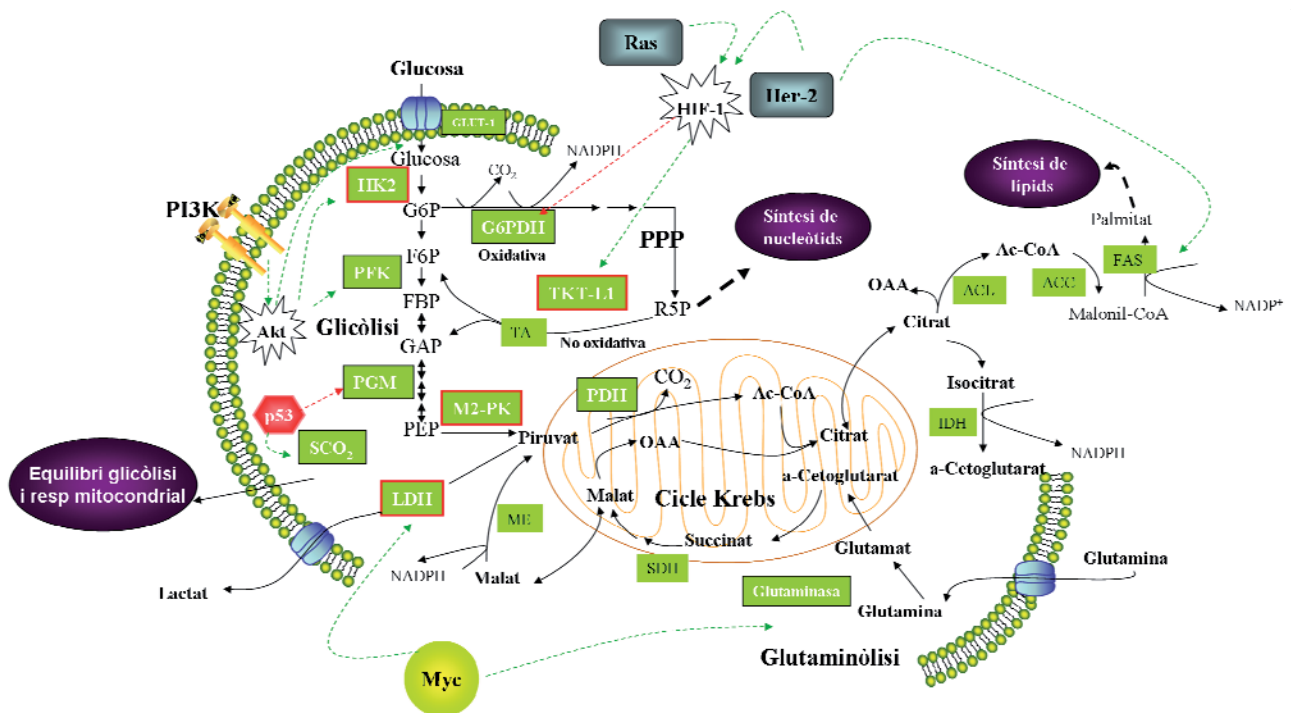


Figura 2. Les vies metabòliques actives en cèl·lules tumorals estan directament controlades per vies de senyalització en les que estan involucrats oncògens, gens supressors de tumors i d'altres proteïnes com Ras, HIF-1, Akt, Her2, Myc i p53; les fletxes sòlides negres indiquen efectes a nivell molecular i las punteades efectes metabòlics globals. Les fletxes discontinues verdes indiquen activació, mentre que les vermelles indiquen inhibició. Els enzims que controlen els passos claus estan en quadres verds emmarcats en vermell. GLUT-1, transportador de glucosa; HK2, hexocinasa tipus 2; PFK, fosfofructocinasa; M2-PK, M2-piruvat cinasa; LDH, lactat deshidrogenasa; ME, enzim màlic (malat deshidrogenasa dependent de NADP⁺); SDH, succinat deshidrogenasa; PDH, piruvat deshidrogenasa; PGM, fosfoglicerat mutasa; IDH, isocitrat deshidrogenasa; ACL, ATP-citrat liasa; ACC, acetil-CoA carboxilasa; FAS, àcid gras sintasa; TKT-L1, transcetolasa *like1*; TA, transaldolasa; G6PDH, glucosa-6-fosfat deshidrogenasa; G6P, glucosa-6-fosfat; F6P, fructosa-6-fosfat; FBP, fructosa-1,6-bisfosfat; GAP, gliceraldehid-3-fosfat; PEP, fosfoenolpiruvat; R5P, ribosa-5-fosfat; SCO₂, proteïna de síntesi de citocrom c oxidasa 2; Ac-CoA, acetil-CoA.

1.3.2 El cicle dels àcids tricarboxílics

El cicle dels àcids tricarboxílics o cicle de Krebs és una via metabòlica que té com a objectiu l'obtenció d'energia en condicions aeròbiques mitjançant la generació de poder reductor que s'utilitza en la cadena de transport d'electrons o fosforilació oxidativa per donar lloc a ATP. Ambdós processos (cicle dels àcids tricarboxílics i cadena respiratòria) tenen lloc al mitocondri. Durant molt de temps es va creure que la disminució en l'oxidació del piruvat en cèl·lules tumorals era deguda a defectes en la cadena respiratòria o en el mateix mitocondri, de manera que la cèl·lula no tenia més alternativa que aconseguir l'energia necessària per a proliferar mitjançant la conversió de piruvat a lactat. En el treball de Fantin i col·laboradors (Fantin *et al.*, 2006) es demostra que, tot i la correlació descrita entre transformació maligna i alteracions fisiològiques en el mitocondri (Frezza i Gottlieb, 2009; Maximo *et al.*, 2009; Wallace, 2005) l'atenuació en l'expressió de la LDH-A estimula la respiració mitocondrial, la qual cosa indicaria que les cèl·lules tumorals encara mantenen la capacitat de produir ATP per fosforilació oxidativa però que no obstant això "decideixen" promoure la glicòlisi anaeròbia.

Fa uns anys, es va identificar SCO2 (proteïna de síntesi de citocrom c oxidasa 2), com un dels gens diana del p53, com el mediador entre l'equilibri entre la utilització de la glicòlisi i la respiració mitocondrial (Matoba *et al.*, 2006) (**Figura 2**). La pèrdua de funció de p53 fa que la respiració mitocondrial no pugui transcórrer correctament, ja que SCO2 és necessària per al correcte acoblament del complex citocrom c oxidasa, necessari per a la fosforilació oxidativa. Així, s'afavoreix la glicòlisi com a font d'energia i s'estableix una relació directa entre la freqüent inactivació de p53 en càncers humans i l'augment de glicòlisi aeròbica.

En les cèl·lules tumorals el cicle dels àcids tricarboxílics està truncat a causa d'una inactivació selectiva de l'enzim aconitasa per acció de ROS (Kim *et al.*, 2001). En aquestes condicions l'enzim α -cetoglutarat deshidrogenasa cobra una especial rellevància ja que és l'encarregat de generar el poder reductor necessari per fer funcionar la cadena de transport d'electrons (Tretter i Adam-Vizi, 2005). En aquesta visió truncada del cicle de Krebs són necessàries altres vies anapleròtiques que siguin capaces de proveir al cicle amb els seus metabòlits. En les cèl·lules tumorals aquesta funció és portada a terme en gran mesura per la glutaminòlisi com s'explica a continuació (Seyfried i Shelton).

1.3.3 La glutaminòlisi

La major part de la investigació sobre el metabolisme de les cèl·lules tumorals s'ha centrat en la utilització de glucosa, i proves consistents afirmen que les cèl·lules tumorals presenten un alt consum de glucosa, com s'ha dit anteriorment. No obstant això, una important

controvèrsia envolta la dependència de les cèl·lules de càncer de la glicòlisi anaeròbica ja que la glucosa no és l'única font de carboni i energia. Des de mitjans dels anys 50 s'ha constatat que els tumors consumeixen una elevada quantitat de glutamina, transformant-la en lactat a través d'algunes reaccions del cicle de Krebs en el procés conegut com glutaminòlisi i usant la llançadora malat-aspartat (**Figura 2**). La sobreactivació d'aquesta ruta metabòlica constitueix un altre dels segells d'identitat del metabolisme tumoral. A més a més, el lactat pot ser produït per serinòlisi (Mazurek *et al.*, 2001; McKeehan, 1982) (<http://www.metabolic-database.com>).

Quan la glucosa ja no està disponible, com s'espera en els tumors sòlids, les cèl·lules tumorals es veuen obligades a catabolitzar substrats alternatius com la glutamina. El catabolisme de la glutamina representa una font valuosa d'energia i proporciona a les cèl·lules glutamat i aspartat (i altre aminoàcids, mitjançant reaccions de transaminació), que són precursors dels àcids nucleics i la síntesi de serina. Aquesta alta glutaminòlisi s'ha associat amb la transformació neoplàsica (DeBerardinis *et al.*, 2007) i la seva inhibició ha demostrat que disminueix la proliferació de cèl·lules tumorals i es correlaciona amb la diferenciació fenotípica i funcional d'aquestes cèl·lules (Lobo *et al.*, 2000; Spittler *et al.*, 1997).

En cèl·lules en les quals l'activitat glicolítica es troba altament incrementada i on la majoria de glucosa consumida és transformada a lactat i posteriorment excretat, hi ha un cert risc de depleció dels metabòlits intermediaris del cicle de Krebs, els quals són imprescindibles per a la síntesi d'aminoàcids i altres intermediaris de rutes biosintètiques. De fet, durant la proliferació cel·lular, la majoria de carboni que entra al cicle de Krebs s'utilitza en rutes biosintètiques que consumeixen ATP en lloc de produir-ne, fet que resulta en una contínua sortida d'intermediaris donant lloc a un fenomen conegut com cataplerosi. En aquest sentit, la glutaminòlisi juga un paper altament rellevant: d'una banda constitueix, juntament amb la ruta catalitzada per la piruvat carboxilasa, la principal ruta anapleròtica del cicle de Krebs, de l'altra contribueix a la síntesi de NADPH mantenint els nivells de malat, ja que la transformació a piruvat per l'enzim màlic comporta la producció d'aquest coenzim reduït. La conseqüència d'una activació de la glutaminòlisi és la reprogramació del metabolisme mitocondrial, de manera que depèn més del consum i catabolisme de la glutamina per mantenir la viabilitat cel·lular i l'anaplerosi del cicle de Krebs.

La via PI3K és important per mantenir el consum elevat de glucosa. Recentment s'ha publicat un treball en el qual es descriu que l'expressió de l'oncogen *Myc* és capaç de coordinar l'expressió dels gens que regulen la captació de glutamina requerida per a la biosíntesi d'àcids nucleics i proteïnes (Wise *et al.*, 2008). D'altra banda, no està clar si hi ha un fenotip adequat únic per al metabolisme energètic en les cèl·lules tumorals (Zu i Guppy, 2004) ja que per exemple diferents mutacions específiques en *KRas* donen lloc a diferents fenotips metabòlics en fibroblasts de ratolí NIH-3T3 (Vizan *et al.*, 2005).

1.3.4 L'activació de rutes biosintètiques

Les cèl·lules proliferants, com són les tumorals, necessiten gran quantitat d'intermediaris glicolítics com a precursors de les molècules bioessencials. En aquest sentit, moltes rutes anabòliques estan regulades d'un mode diferencial en les cèl·lules tumorals per tal de suportar l'elevada taxa de proliferació (Eigenbrodt *et al.*, 1985; Tong *et al.*, 2009; Vander Heiden *et al.*, 2009), com per exemple la síntesi de lípids (Swinnen *et al.*, 2006) i la ruta de les pentoses fosfat (Boros *et al.*, 1998; Cascante *et al.*, 2000). Aquesta activació de les rutes biosintètiques és una adaptació metabòlica de la cèl·lula tumoral.

L'activació de la ruta de les pentoses fosfat, que genera ribosa-5-fosfat, és necessària per a la biosíntesi de nucleòtids i de poder reductor en forma de NADPH, necessari per a la síntesi lipídica i el manteniment del glutatió reduït (Rimpi i Nilsson, 2007; Tong *et al.*, 2009). Així, les cèl·lules tumorals mostren un metabolisme dels nucleòtids alterat en comparació a les cèl·lules no tumorals que es manifesta augmentant l'activitat de les rutes anabòliques i disminuint la de les catabòliques (Tong *et al.*, 2009).

Donat que les reserves de nucleòtids no són suficients per suportar la duplicació cel·lular, el cicle de les vies biosintètiques està incrementat durant el cicle cel·lular. Així, s'ha demostrat la importància de la via de les pentoses fosfat (PPP) en diverses línies tumorals (Boros *et al.*, 1998; Cascante *et al.*, 2000), i s'han identificat els dos enzims clau de la via, la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH) i la transcetolasa (TKT), com a possibles dianes en la teràpia antitumoral (Boren *et al.*, 2002; Boros *et al.*, 1997; Comin-Anduix *et al.*, 2001; Rais *et al.*, 1999; Ramos-Montoya *et al.*, 2006). Aquests dos enzims pertanyen, respectivament, a les branques oxidatives i no oxidatives de la PPP (vegeu la **Figura 2**).

La ribosa-5-fosfat pot ser sintetitzada a partir de glucosa-6-fosfat (G6P) a través de la branca oxidativa de la ruta de les pentoses fosfat així com a partir de fructosa-6-fosfat (F6P) i gliceraldehid-3-fosfat (G3P) per la branca no oxidativa. La branca oxidativa està catalitzada per la G6PDH i la 6-fosfat-gluconat deshidrogenasa mentre que la branca no oxidativa d'aquesta via està catalitzada per la transcetolasa (TKT) i la transaldolasa (TA). L'equilibri entre aquestes dues branques és un requisit per mantenir l'eficiència metabòlica de les cèl·lules tumorals per al creixement i proliferació. De fet, l'alteració d'aquest equilibri mitjançant una estratègia de combinació de drogues acaba donant lloc a una ineficiència metabòlica i mort cel·lular (Boros *et al.*, 1997; Rais *et al.*, 1999; Ramos-Montoya *et al.*, 2006). Recentment, s'han relacionat les activitats dels enzims G6PDH i TKT, amb un increment de la relació pentosa monofosfat en front hexosa monofosfat a la part final de la fase G1 i a la fase S del cicle cel·lular, suggerint una regulació d'aquests enzims clau durant la progressió del cicle cel·lular (Vizan *et al.*, 2009a). Aquesta modulació distintiva d'aquests enzims pot representar una nova estratègia terapèutica

per tal d'inhibir la proliferació tumoral. També ha estat descrita la capacitat tumorogènica de la G6PDH a partir de la seva sobreexpressió en fibroblasts de ratolí NIH-3T3 i la seva posterior inoculació en ratolins atímics (Kuo *et al.*, 2005). A més, la inducció del factor de creixement de cèl·lules endotelials (un pas comú en l'angiogènesi) es pot reduir mitjançant la inhibició directa d'enzims claus del metabolisme del glicogen i de la via de les pentoses fosfat (Vizan *et al.*, 2009b).

La lipogènesi, o síntesi *de novo* d'àcids grassos, és una altra ruta biosintètica clau per al desenvolupament tumoral (Mashima *et al.*, 2009) donat que la majoria dels grups acil de les cèl·lules tumorals provenen de la síntesi *de novo* en lloc de la captació de lípids del medi extracel·lular (**Figura 2**). En relació a aquest fet, les cèl·lules tumorals expressen alts nivells dels enzims lipogènics ATP citrat liasa (ACL), acetilCoA carboxilasa (ACC) i àcid gras sintasa (FAS) (Swinnen *et al.*, 2006).

A més a més, relacionat amb les vies de transducció de senyal oncogèniques, s'ha vist com moltes d'elles incrementen l'expressió de FAS. D'altra banda, la inhibició de FAS en càncer d'ovari i mama ha donat una baixada en l'activitat Akt i HER2 (Menendez *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2007), suggerint així dos camins d'interacció entre FAS i les vies Akt-HER 2.

Per tant, per tal de dissenyar estratègies antitumorals, s'han postulat que enzims com FAS (Knowles *et al.*, 2008; Menendez *et al.*, 2004), relacionada amb el metabolisme tumoral, o l'ACC i l'ACL (Migita *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009) poden ser bones dianes antitumorals i són àmpliament estudiades per establir relacions entre expressió gènica i metabolisme (Rathmell i Newgard, 2009; Wellen *et al.*, 2009).

1.3.5 L'expressió d'isoenzims i ROS

Finalment, una altra via d'adaptació per part de la cèl·lula tumoral, a nivell proteòmic, seria l'expressió de diferents isoformes. Els isoenzims són enzims que difereixen en la seqüència aminoacídica però que catalitzen la mateixa reacció. Aquests acostumen a mostrar diferents paràmetres cinètics o bé, diferències en les propietats reguladores. L'aparició d'isoformes de diferents enzims clau del metabolisme central del carboni com serien la hexocinasa i la piruvat cinasa, durant el procés tumoral, degut a l'especificitat d'aquestes, ofereix dianes terapèutiques de gran interès.

En el cas de la piruvat cinasa (PK), per exemple, s'han descrit quatre isoenzims (L-PK, R-PK, M1-PK and M2-PK) amb característiques diferents (Mazurek, 2007). L'M2-PK és l'isoenzim que predomina en cèl·lules proliferants (Christofk, 2008 # 274) i pot variar la seva afinitat pel seu substrat (el fosfoenolpiruvat, PEP) canviant de forma dimèrica a tetramèrica

depenent de les necessitats energètiques o biosintètiques del moment (Mazurek *et al.*, 2005) (Mazurek i Eigenbrodt, 2003) (**Figura 2**). La forma dimèrica, que es genera per interacció directa del isoenzim amb oncoproteïnes (Mazurek *et al.*, 2005), presenta menor afinitat pel PEP i provoca una acumulació dels intermediaris glicolítics que poden ser derivats cap a vies anabòliques com la PPP, síntesi de fosfolípids i aminoàcids, amb el detriment de la producció d'ATP. La reactivació de la glicòlisi es dona a l'acumular la fructosa-1,6-bisfosfat, que activa la formació de la forma tetramèrica, més activa, de la M2-PK. fructosa-1,6-bisfosfat s'uneix a M2-PK i tetrameritza

Recentment, s'ha demostrat que la M2-PK és una proteïna regulable per pèptids amb fosfotirosines i aquesta regulació és la responsable de l'alliberament de la fructosa-1,6-bisfosfat unida a la forma tetramèrica de la M2-PK, permetent la formació de la forma dimèrica. Així, permet desviar els metabòlits de la glicòlisi cap a processos anabòlics quan les cèl·lules són estimulades per certes senyals de creixement (Christofk *et al.*, 2008). D'altra banda, s'ha descrit també que la inducció de la migració al nucli de la M2-PK és capaç d'induir apoptosi en cèl·lules tumorals demostrant que la M2-PK pot jugar un paper important en la mort cel·lular programada, i es pot considerar una bona diana en el desenvolupament de teràpies anticancerígenes (Stetak *et al.*, 2007).

A més de la M2-PK hi ha altres exemples d'expressió diferencial d'isoformes enzimàtiques durant l'adquisició del fenotip metabòlic tumoral. L'hexocinasa (HK), l'enzim que catalitza el primer pas de la glicòlisi, pot presentar-se en forma citosòlica o associada a la membrana del mitocondri (HK1 o HK2), sent aquesta última la que presenta una major activitat fosforilant la glucosa (Robey i Hay, 2005) (**Figura 2**). La isoforma que s'expressa majoritàriament en cèl·lules tumorals és la HK2, que és capaç d'unir-se a la membrana mitocondrial i a més no presenta inhibició per producte (glucosa-6-fosfat) (Mathupala *et al.*, 2009; Pedersen, 2007). L'expressió de la HK2 també confereix a la cèl·lula tumoral altres avantatges, com resistència a l'apoptosi. En aquest sentit, recentment s'ha descrit que la modificació covalent de la HK2 per acció del 3-bromopiruvat és capaç de promoure l'alliberament del factor inductor d'apoptosi (AIF) des del mitocondri al citosol i provocar la mort cel·lular (Chen *et al.*, 2009).

En els últims anys, el descobriment d'una isoforma de la transcetolasa, un dels enzims clau de la PPP, anomenada TKTL1 (transketolase like-1) ha aportat una nova visió de la glicòlisi i de la PPP (**Figura 2**). Aquest isoenzim és capaç de catalitzar la reacció monosubstrat de la transcetolasa a partir de xilulosa-5-fosfat, de manera que es produeix gliceradehid-3-fosfat, que podria seguir la via glicolítica, alhora que acetat, el qual podria ser utilitzat per a la síntesi d'àcids grassos (Coy *et al.*, 2005). S'ha proposat que aquesta isoforma pot estar contribuint a l'efecte Warburg a la vegada que permet que rutes biosintètiques com la síntesi de ribosa i àcids

grassos es vegin afavorides (Langbein *et al.*, 2006). Arran d'aquests descobriments, més recentment s'ha trobat que els nivells de mRNA de la TKTL1 estan augmentats en diversos tumors, com d'ovari, de còlon, gàstrics o ureterals (Hu *et al.*, 2007; Kohrenhagen *et al.*, 2008; Langbein *et al.*, 2006; Staiger *et al.*, 2006; Volker *et al.*, 2008; Zerilli *et al.*, 2008) i que la presència d'aquest isoenzim està relacionada amb la progressió tumoral (Krockenberger *et al.*, 2007; Langbein *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

Tot i que hi ha una clara evidència de que la sobreexpressió d'enzims glicolítics està associada a la reprogramació de les cèl·lules tumorals, el paper del mitocondri en aquesta reorganització metabòlica és més confús, com s'ha comentat anteriorment a l'apartat 1.3.2. S'ha descrit en tumors que existeix una reducció del contingut dels mitocondris i que existeixen diferències en la seva activitat (Rossignol *et al.*, 2004). Certament, el metabolisme mitocondrial està estretament relacionat amb la progressió tumoral, no només a nivell energètic, sinó també a través de la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS). El paper de les ROS en la progressió del tumor és controvertit. D'una banda, s'ha descrit en cèl·lules canceroses un mal funcionament mitocondrial i la consegüent producció de ROS (Pelicano *et al.*, 2004). Aquest augment en la producció de ROS podria augmentar la taxa de mutagènesi, agreujant així la malignitat (Pelicano *et al.*, 2004; Wallace, 2005). D'altra banda, la generació de ROS s'ha proposat per al tractament del càncer (Engel i Evens, 2006), arran de l'observació de que la generació d'estrès oxidatiu condueix a l'apoptosi (Vrablic *et al.*, 2001).

2. El cicle cel·lular i el càncer

El cicle cel·lular és el període de creixement i divisió cel·lulars, que té lloc durant el cicle vital d'una cèl·lula. Els cicles cel·lulars en eucariotes es produeixen sota els mateixos principis. Així, les proteïnes clau que el regulen han estat ben conservades durant l'evolució. (Murray i Darvell, 1993). Encara que en realitat el cicle cel·lular està compost per una sèrie continua d'esdeveniments, per conveniència s'ha dividit en dues etapes: divisió i interfase.

Divisió (M) (30-60 minuts) En aquesta etapa, cada cèl·lula es divideix en dues o més cèl·lules filles. La divisió consta, a la vegada de dos processos fonamentals: mitosi i citocinesi.

Interfase: Es denomina així al període que es dona entre dos divisions successives. Es compon de diverses fases:

- Fase G₁: és el període de temps comprès entre el final de la divisió anterior i la síntesi de DNA (fase S), durant el qual la cèl·lula duu a terme processos biosintètics, fonamentalment síntesi de proteïnes i reparació del DNA. Algunes cèl·lules es mantenen en estat de repòs i no es divideixen (en aquest cas es

denomina fase G_0 , que equivaldria a una fase G_1 permanent). El període de transició entre les fases G_1 i S rep el nom de punt de restricció R.

- Fase S: etapa en que té lloc la duplicació del DNA.
- Fase G_2 : la darrera etapa de preparació per a la divisió cel·lular. Al final d'aquesta etapa, el DNA comença a condensar-se i els cromosomes es fan visibles.

Després d'un nombre limitat de divisions, les cèl·lules moren per mantenir el bon funcionament de l'organisme; és el que es denomina mort cel·lular programada.

Així, les cèl·lules a la fase G_1 tenen un contingut diploide de DNA ($2n$), mentre que les cèl·lules en la G_2 el tenen $4n$. Les cèl·lules a la fase S es troben duplicant activament el seu material genètic, pel que els seu contingut de DNA se situa entre $2n$ i $4n$. Degut als senyals mitogènics apropiats, les cèl·lules poden sortir reversiblement del cicle cel·lular al final de la fase M i entrar en un estat de repòs (fase G_0) on hi poden estar fins i tots anys, o bé, poden sortir de forma quasi irreversible del cicle, com succeeix durant la senescència o durant la diferenciació terminal.(Alberts *et al.*, 2002; Hunter i Pines, 1994) (**Figura 3**).

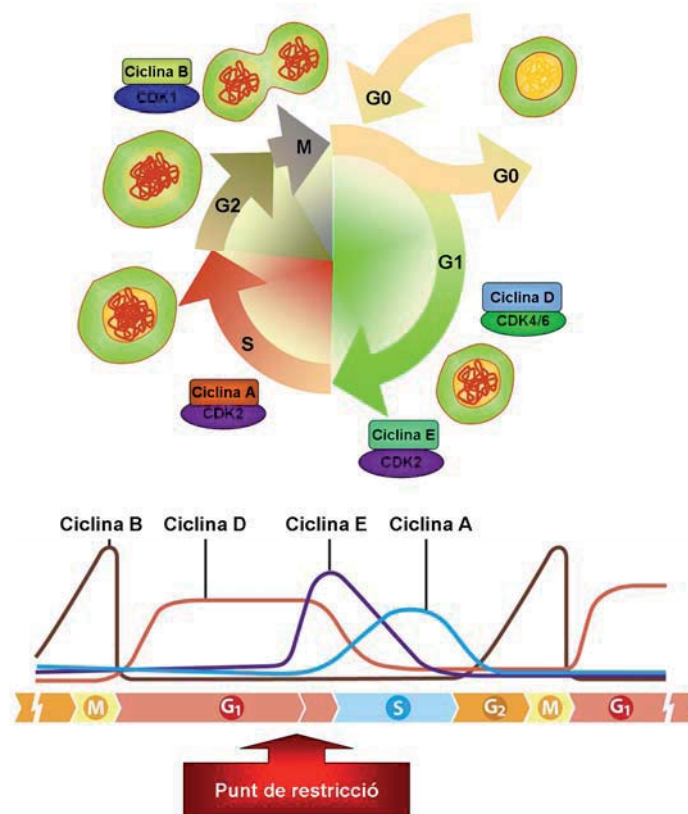


Figura 3. Esquema simplificat del cicle cel·lular, de les seves fases i dels principals enzims implicats en la seva progressió. Els complexos ciclina-CDK són els principals reguladors del cicle cel·lular. L'activació d'aquests complexos depèn de la subunitat reguladora anomenada ciclina que és sintetitzada i degradada durant les diferents fases del cicle cel·lular.

Els components principals que constitueixen la maquinària del cicle cel·lular són les cinases dependents de ciclins (CDKs), i tal com el seu nom indica, mai poden actuar per elles mateixes sinó que sempre depenen d'una subunitat reguladora, les ciclins. Les CDKs són serintreonina cinases heterodimèriques. La funció de les ciclins associades a les CDKs és regular l'activitat catalítica de les mateixes. Diversos parells de ciclina-CDK són actius durant cada fase del cicle cel·lular (Hunter i Pines, 1994). La família de les CDKs humanes compren 20 proteïnes de les quals 10, CDK1 fins CDK9 i CDK11, s'ha vist que s'uneixen a una subunitat reguladora per exercir la seva acció y són serintreonina cinases. De totes aquestes, només 5 (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 i CDK6) s'uneixen a les ciclins corresponents (n'existeixen més de dotze famílies) que són sintetitzades i degradades d'un mode cíclic durant la divisió cel·lular. Per tant, degut a que els nivells de CDK són constants, són els nivells de ciclins els que regulen l'activitat de les CDKs i la seva especificitat al substrat d'unió (Malumbres, 2005) (**Figura 3**).

La caracterització funcional d'aquestes cinases heterodimèriques ha identificat el paper d'aquestes en la progressió del cicle cel·lular (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 i CDK6), regulació del cicle (CDK7), transcripció (CDK7, CDK8, CDK9 i CK11) i diferenciació neuronal (CDK5) (Malumbres i Barbacid, 2005).

Durant la fase G_1 actuen dues CDKs semblants, CDK4 i 6, que són actives al trobar-se unides a la família de ciclins tipus D (D1, D2 i D3). El complex ciclina D-CDK4 i CDK6 col·labora amb el complex ciclina E-CDK2 per a conduir la cèl·lula cap a la fase S a través del punt de restricció R (Planas-Silva i Weinberg, 1997). Aquesta transició requereix no només d'una perfecta coordinació en la formació de múltiples complexos ciclina-CDK sinó també una adaptació metabòlica adequada per satisfer l'alta demanda energètica i anabòlica que la progressió del cicle cel·lular comporta. La importància d'aquest punt de restricció queda palesa en observar que diversos gens supressors de tumors, com per exemple pRb o p16^{INK4a}, juguen un paper important en la seva regulació (Voorhoeve i Agami, 2004).

Per la seva banda, la CDK2 és activada seqüencialment per les ciclins E (E1 i E2), durant la transició entre les fases G_1 i S, i per les ciclins A (A1 i A2) durant la fase S. Perquè es doni aquesta activació després de que la cèl·lula rebi estímuls mitogènics, aquests han de suprimir la transcripció, translocació, estabilitat i localització nuclear de p27^{KIP1}, que es duu a terme per l'acció d'HER2 entre d'altres molècules (Massague, 2004). El complex ciclina A-CDK2 promou la finalització de la fase S. Finalment, l'associació de CDK1 amb ciclins A i B controlen la progressió a través de la fase G_2 i la segregació del DNA i citocinesi de la fase M (mitosi), la qual engloba profase, metafase, anafase i telofase.

La regulació de l'activitat d'aquestes cinases requereix de l'activació per fosforilació per part d'altres cinases activadores (CAK), així com la unió a ciclines i la no inhibició per part dels seus inhibidors naturals (CKI). Concretament, és necessari desfosforilar els residus de treonina 172 i 177 de les CDKs per membres de la família Cdc25, normalment sobreexpressats en gran varietat de càncers (Bockstaele *et al.*, 2006). L'expressió de Cdc25A es necessària per entrar en fase S i és induïda en G1 per myc i per E2F (Foster *et al.*, 2001).

Es requereixen mecanismes de vigilància que controlin cada pas en la progressió del cicle per tal que la cèl·lula procedeixi a la següent fase només en el cas de que l'etapa prèvia s'hagi completat amb èxit. Aquests mecanismes de control s'anomenen *checkpoints* (punts de control). El primer *checkpoint* assegura que la cèl·lula no pugui avançar des de la fase G₁ a la S si fa falta reparar el genoma. Un altre actua a la fase S, reduint la velocitat o parant la replicació del DNA quan es detecten danys en aquest. Així, en el cas de que hi hagi dany al DNA, es dona un arrest del cicle cel·lular gràcies a l'activació de les cinases ATM i ATR així com dels seus efectors CHK1 i CHK2, donant així temps a la cèl·lula per que el repari.

Un tercer *checkpoint* impedeix que la cèl·lula passi de la fase G₂ a la fase M abans que la replicació de DNA a la fase S estigui acabada. A més a més, durant la fase M, existeixen eficients *checkpoints* que bloquegen l'anafase si les cromàtides no estan ben col·locades en el fus mitòtic (Kastan i Bartek, 2004). En molts tipus de càncer, la cèl·lula tumoral presenta una inactivació d'un o més punts de control, adquirint així la capacitat d'acumular ràpidament mutacions en el genoma que afavoriran la proliferació tumoral (Malumbres i Barbacid, 2001, 2009).

D'altra banda, cinases com Aurora A o *polo like* cinases estan involucrades en la regulació dels centrosomes del cicle i APC-C (complex promotor de l'anafase) s'encarrega de proteolitzar CDK1 per a completar la divisió cel·lular (Lapenna i Giordano, 2009).

Així doncs, els mecanismes que controlen el cicle cel·lular són una diana freqüent d'alteracions genètiques en el càncer, ja que la desregulació del mateix pot provocar una excessiva i inapropiada divisió cel·lular. Per això, a més de totes les característiques tumorals descrites anteriorment, el càncer pot ser considerat també com una alteració del cicle cel·lular, el que implica que cada tumor és defectiu en un o més aspectes relacionats amb el control del cicle cel·lular (**Figura 4**).

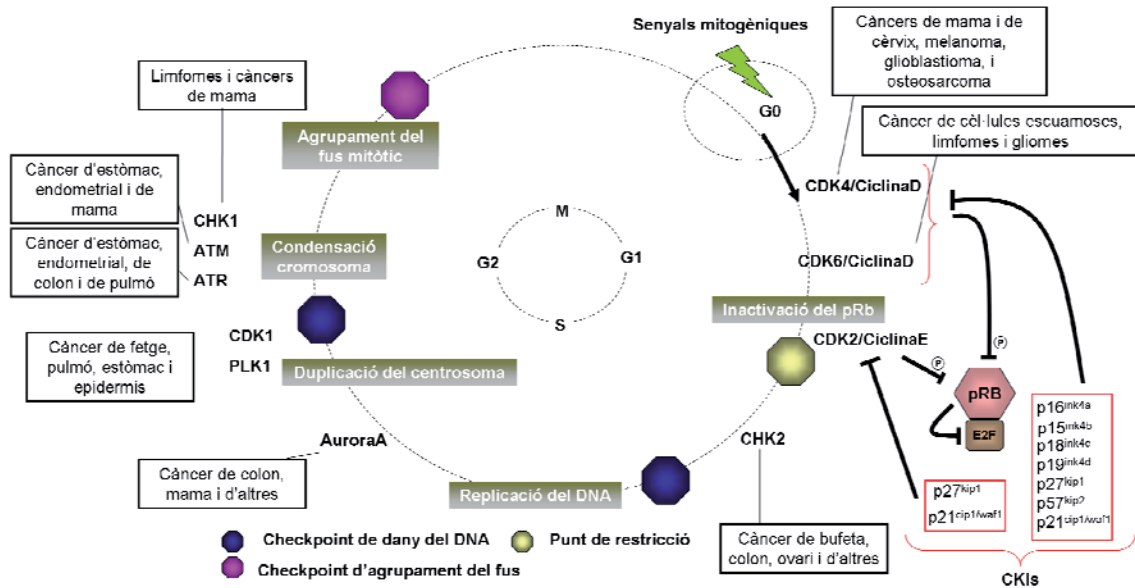


Figura 4. Principals molècules implicades en la correcta progressió del cicle cel·lular. Les molècules implicades en les diferents fases del cicle cel·lular estan mutades en molts càncers. La transició de la fase G1/S i el pas a través del punt de restricció són dues etapes fonamentals en el cicle cel·lular i així mateix les molècules que les controlen (CDK4, CDK6 i CDK2) i els seus inhibidors (família INK4a i KIP/CIP) són fonamentals per la progressió del cicle. CHKs, Cinases de control del dany cel·lular (*DNA-damage checkpoint kinases*); PLK1, cinasa *polo-like 1* (*polo-like kinase 1*); ATM, proteïna mutada en ataxia telangiectasia (*ataxia telangiectasia mutated*); ATR, proteïna relacionada amb ataxia telangiectasia i RAD3 (*ataxia telangiectasia and RAD3-related protein*); pRB, membres de la família de proteïnes del retinoblastoma. Adaptada de Lapenna i Giordano, 2009.

2.1 Cicle cel·lular i apoptosi com a dianes de teràpia antitumoral

El fet que la desregulació del cicle cel·lular sigui una alteració comú en diferents tipus de càncers a motivat que s'hagin desenvolupat nombrosos estudis basats principalment en la inhibició de la maquinària que fa possible la progressió del cicle cel·lular com a estratègia antitumoral (Malumbres i Barbacid, 2009; Shapiro, 2006) (Schwartz i Shah, 2005). Donada la importància del metabolisme tumoral, no és estrany que el cicle cel·lular sigui també dependent d'ell. En aquest sentit la disponibilitat dels substrats energètics és necessària per a la progressió del cicle cel·lular. Com ja ha quedat patent, la PPP ofereix a la cèl·lula els sucres fosfat necessaris per a la síntesi *de novo* dels nucleòtids, sent un punt crucial per al correcte desenvolupament de la síntesi de DNA. En aquest sentit, recentment s'ha demostrat que la progressió del cicle cel·lular va acompanyada de l'augment d'activitat de les branques oxidativa i no oxidativa de la PPP (Vizan *et al.*, 2009a) i també s'ha descrit que l'oncogen *c-Myc* és capaç d'activar la xarxa metabòlica per generar substrats que permetin aquesta progressió del cicle cel·lular (Morrish *et al.*, 2009).

Per una altra banda, els reguladors de la progressió del cicle cel·lular acostumen a estar desregulats en diferents tipus de càncers. Així, l'activació aberrant de CDK1 s'ha observat amb més freqüència en una sèrie de tumors primaris (per exemple, de mama, de còlon, de pròstata, oral, de pulmó i carcinomes d'esòfag), a causa de la sobreexpressió de la ciclina B1, correlacionant-se en molts casos amb mal pronòstic (Perez de Castro *et al.*, 2007). L'enzim CDK2 està desregulat en diverses neoplàsies, incloent el carcinoma de pulmó (ciclina A-CDK2), melanoma, osteosarcoma, càncer d'ovari (ciclina E-CDK2), neoplàsia de pàncrees i sarcomes, amb més freqüència a causa de la sobreexpressió de la ciclina E i/o ciclina A, o inactivació dels inhibidors CIP/KIP (Malumbres i Barbacid, 2009). La cinasa transcripcional CDK9 s'expressa en excés en el mieloma, el càncer de pròstata i el càncer de pulmó (Romano i Giordano, 2008), el que suggereix que aquesta cinasa podria ser un blanc potencial pel tractament del càncer. CDK11 és un regulador addicional de la transcripció, i evidències recents també indiquen que té un paper en l'estabilització dels microtúbuls i en el control de la cohesió de les cromàtides germanes (Yokoyama *et al.*, 2008). El gen *CDK11* (*CDC2L*) s'assigna a una regió de la banda cromosòmica (1p36), que amb freqüència es suprimeix en els càncers humans, i la pèrdua d'un al·lel de *Cdc2l* facilita la carcinogènesi de pell en ratolins (Chandramouli *et al.*, 2007).

Tot i que les subunitats catalítiques dels complexos ciclina-CDK, que regulen el cicle, no acostumen a estar mutades en càncer, existeixen excepcions, ja que s'han descrit mutacions de CDK4 i CDK6 en diferents subgrups de melanoma (CDK4) i altres tumors (CDK4 i CDK6) (Lapenna i Giordano, 2009). En canvi són més freqüents en tumors humans els augments dels nivells de les subunitats reguladores de les CDK i les ciclines, i les mutacions dels inhibidors endògens de CDK. Per exemple, la sobreexpressió de la ciclina D1 es dona en diversos tumors, com l'adenoma paratiroïdal, la leucèmia, els limfomes i el mieloma múltiple, el càncer de còlon, d'estómac, d'esòfag, de pulmó, de ronyó i càncer de mama, com a resultat de l'amplificació del gen, la seva reorganització o translocació (Ortega *et al.*, 2002). A més a més, l'activitat d'aquesta ciclina també pot augmentar per altres mecanismes, com la inactivació de p16^{INK4a} ja sigui per l'eliminació del gen, mutacions puntuals o silenciament transcripcional per metilació (Ortega *et al.*, 2002).

Així doncs, tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior, multitud de famílies de proteïnes orquestran la progressió del cicle cel·lular, i en molts tumors aquestes semblen alterades a nivell genètic o epigenètic de manera que els processos que regulen queden afectats. És per això que inhibidors selectius d'aquestes molècules del cicle cel·lular haurien de limitar la progressió del tumor a través del cicle cel·lular i haurien de facilitar la inducció d'apoptosi (Lapenna i Giordano, 2009). En aquesta Tesi Doctoral s'han cercat inhibidors selectius del complex ciclinaD-CDK4 i CDK6, àmpliament desregulat en diferents tipus de càncer. Aquesta cerca ens

ha permès identificar un ventall de productes potencialment útils coma a fàrmacs antitumorals que permetran tractar aquells càncers on la regulació de la transició G1/S, on adquireixen especial importància els complexos ciclinaD-CDK4 i CDK6, està alterada.

L'apoptosi o mort cel·lular programada és un mecanisme clau que utilitza l'organisme per eliminar cèl·lules innecessàries en un lloc determinat, ja sigui perquè estiguin en excés, danyades o siguin potencialment perilloses, o per eliminar els limfòcits autorreactius que reconeixen antígens propis (Hengartner, 2000). Aquest procés finalitza amb el desmantellament complet de les principals estructures cel·lulars de forma controlada, de manera que l'eliminació cel·lular no provoca efectes nocius o inflamatoris en els teixits contigus. L'apoptosi es distingeix per característiques morfològiques i bioquímiques com la condensació de la cromatina, el “*flip-flop*” de la membrana plasmàtica (**Figura 5**), la fragmentació del DNA i el trencament de les cèl·lules en una sèrie de trossos de citoplasma rodejats de membrana, anomenats cossos apoptòtics, que són englobats i digerits per altres cèl·lules, tipus macròfags o similars, sense que es produeixi alliberament de material cel·lular al medi i, per tant, sense reacció antiinflamatòria. Aquests esdeveniments estan associats amb l'activació de determinades proteases, anomenades caspases, i la pèrdua d'asimetria a la membrana plasmàtica (Pop i Salvesen, 2009). En aquest sentit, l'apoptosi es diferencia de la necrosi perquè aquesta última representa una mort més agressiva que es caracteritza per una dissolució dels òrgans cel·lulars i una pèrdua del control de la permeabilitat de la membrana amb la consegüent entrada de fluids que causen expulsió del contingut intracel·lular per la ruptura de la membrana, alliberant hidrolases que afecten als teixits contigus i es genera inflamació (Elliot i Elliot, 2005).

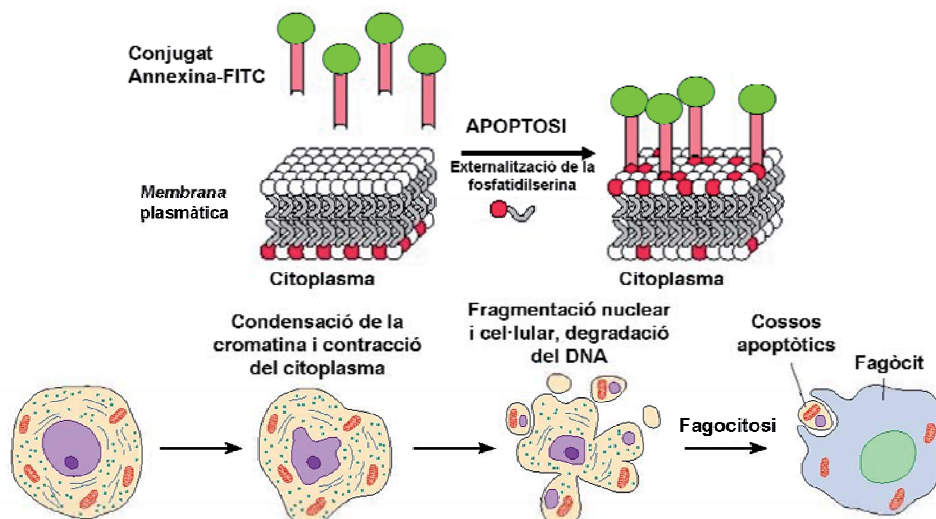


Figura 5. Canvis moleculars i fisiològics de la cèl·lula que esdevé apoptòtica. La cèl·lula quan entra en apoptosi experimenta un procés anomenat “*flip-flop*” de la membrana plasmàtica que deixa en la part externa la fosfatidilserina, de manera que l’annexina-FITC s’hi uneix. La cèl·lula apoptòtica pateix tota una sèrie de canvis fisiològics fins que finalment és fagocitada.

L'apoptosi es pot iniciar a partir de diversos estímuls, com el canvi en la disponibilitat de factors de creixement i/o arrest del cicle cel·lular en G1, l'estrès oxidatiu, la radiació o l'efecte d'agents quimioterapèutics. S'han descrit dues vies a través de les quals aquests estímuls poden desencadenar la mort cel·lular programada: la via extrínseca i la intrínseca. La via extrínseca està lligada a receptors de mort que mitjançant activació per lligand activen la procaspasa 8, que al seu torn activa la caspasa3 i desencadena la cascada proteolítica provocant la degradació cel·lular apoptòtica.

La via intrínseca o mitocondrial es caracteritza per una permeabilització d'aquest orgànul que condueix a l'alliberament de proteïnes apoptogèniques com el citocrom c, causant la formació d'un complex anomenat apoptosoma que és capaç de desencadenar també la cascada proteolítica apoptòtica (Hengartner, 2000). El procés apoptòtic, desencadenat per qualsevol de les dues vies, està altament regulat per una complexa xarxa de mediadors bioquímics. Entre ells es troben els membres de la família Bcl-2, dins la qual hi ha membres que promouen l'apoptosi, ajudant a l'alliberament de proteïnes mitocondrials apoptogèniques (com Bax, Bad o Bak), o antiapoptòtiques, que ajuden a mantenir la integritat de la membrana mitocondrial (Bcl-2 o Bcl-XL). A més, a la mateixa família hi ha proteïnes com Bid que poden connectar els mecanismes extrínsec i intrínsec (Adams i Cory, 1998).

Com ja s'ha comentat, un dels trets característics de les cèl·lules tumorals és l'evasió de l'apoptosi (Hanahan i Weinberg, 2000). S'ha vist que les vies apoptòtiques es troben alterades amb freqüència en la progressió tumoral i en processos de metàstasi. Encara que el coneixement del procés de mort cel·lular programada i els seus mecanismes de regulació poden oferir noves dianes terapèutiques explotables en la lluita contra el càncer, els mateixos defectes en la maquinària apoptòtica sovint provoquen fenòmens de resistència a fàrmacs antitumorals basats en forçar l'apoptosi de les cèl·lules tumorals (Ghavami *et al.*, 2009). Per això conèixer en profunditat el metabolisme tumoral pot aportar claus per a noves teràpies en les quals s'indueixi apoptosi atacant la reprogramació metabòlica de la cèl·lula cancerígena. Per exemple, el tractament amb àcids grassos omega 3 sembla ser una manera efectiva d'induir apoptosi via de PI3K (Engelbrecht *et al.*, 2008).

2.2 La transició G1/S en la desregulació del cicle cel·lular i la proliferació tumoral

En la desregulació del cicle cel·lular en càncer, una de les etapes que adquireix major protagonisme és la transició de les fases G1/S. De fet, en més del 80% de les neoplàsies humanes s'han descrit alteracions de via CiclinaD-CDK4/6-INK4-pRb-E2F (Fischer i Gianella-Borradori, 2005). Comparat amb la replicació del DNA i la mitosi, les quals segueixen uns passos molt establerts i que varien molt poc d'una cèl·lula a una altra, els passos que controlen

l'entrada i la progressió en la fase G₁ són molt dependents del tipus i context cel·lular (Massague, 2004). Finalment, per entrar en la fase S, els requeriments per cadascun dels tipus cel·lulars és el mateix: activar les cinases dependents de ciclina.

Molts components cel·lulars que actuen en aquesta fase del cicle estan relacionats amb càncer. Així la sobreexpressió de ciclina D1 es freqüent en el 50% dels càncers de mama. En ratolins, aquesta sobreexpressió es necessària per a la formació del tumor mamari a través de l'activació de la via de Ras. Per una altra banda, com veurem a continuació, el pRb que té un paper crucial en aquesta transició es troba mutat en gran nombre de càncers i els baixos nivells de p27^{KIP1} (Blain *et al.*, 2003) o p16^{INK4a} (Bockstaele *et al.*, 2006) estan relacionats amb un mal pronòstic en molts tipus de carcinomes, tumors de cervell i limfomes.

La cèl·lula pren la decisió crítica entre el creixement o la senescència en la fase G₁. La presència de senyals externs, siguin estimuladors o inhibidors, només poden influenciar en aquesta decisió en la fase G₁ primerenca; ja que, una vegada passat el punt de restricció (R) no hi ha possibilitat de tornar enrere, la cèl·lula ha de completar el cicle cel·lular.

Els complexos ciclines-CDKs a més de dirigir les fases que constitueixen el cicle cel·lular, també tenen una funció reguladora important sobre aquest. La regulació es produeix a través de la variació dels nivells i disponibilitat de les ciclines. Normalment, les fluctuacions dels nivells de ciclines disponibles es troben ben programades al llarg del cicle cel·lular. La ciclina B, per exemple, es manté constant mentre que al final de la fase M augmenta considerablement. En ocasions, però, els nivells de ciclines estan regulats per senyals extracel·lulars, tal com succeeix amb la ciclina D. L'augment en els nivells de ciclina D es produeix degut a l'augment o disponibilitat de factors de creixement. Aquests, a través de l'activació de receptors tirosina cinasa, estimulen les vies de Ras i MAP cinases, conduint a una acumulació de ciclina D, que activa les CDK4 i CDK6 (Hunter i Pines, 1994). Així doncs, diversos senyals extracel·lulars regulen les activitats de CDK4 i CDK6 i, a través dels complexos ciclina D-CDK4 i CDK6, indueixen a la cèl·lula a entrar en la fase G₁ del cicle cel·lular i a passar el punt de restricció R.

Existeixen altres vies de control que modulen l'activitat dels complexos ciclina-CDK, bàsicament en la fase G₁ del cicle cel·lular. Els més importants són un conjunt de proteïnes que genèricament s'anomenen inhibidors de CDK (CKI). Aquests inhibidors són induïts en la majoria de casos per senyals antiproliferatius (TGFβ). Existeixen dos grans famílies de CKI, la INK4 (inhibidors de CDK4 i CDK6), que inclou, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} i p19^{INK4d}, i la CIP/KIP o WAF/KIP (*CDK interacting protein/kinase inhibitory protein/wild-type p53-activated fragment*), que agrupa a p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} i p57^{KIP2} (**Figura 4**).

Mentre que els inhibidors de la família INK4 s'uneixen específicament al monòmer CDK4 o CDK6 per impedir la seva activació per ciclina D, els membres de la família CIP/KIP s'uneixen i inactiven els complexos ciclina-CDK2.

Els complexos CDK-ciclina-CKI es veuen afectats per la regulació transcripcional, la localització subcel·lular i la degradació per ubiquïtinització, les quals afecten en últim terme a la progressió del cicle cel·lular (Berthet *et al.*, 2003).

Cal destacar que el paper d'aquests inhibidors és crucial en la transició de G1 a S en el cicle cel·lular, però el seu paper regulant els complexos CDK4, CDK6 i CDK2 ha estat últimament qüestionat. Particularment, el fet de que p27^{KIP1} sigui o no inhibidor del complex CDK4 i CDK6 ha estat posat en dubte (Bockstaele *et al.*, 2006). Estudis recents demostren que p27^{KIP1} pot exercir els dos papers depenent de l'estat de creixement de la cèl·lula. p27^{KIP1} està constitutivament expressat durant el cicle cel·lular i la majoria de p27^{KIP1}, en cèl·lules proliferants, està unit a CDK4 i/o CDK6 formant un complex actiu (James *et al.*, 2008). Per tant els complexos Ciclina D -CDK4 i CDK6 sembla que tinguin dos papers en la cèl·lula: per una banda, el paper catalític on fosforilen proteïnes com pRB, p107 o p130 i per una altra banda el paper no catalític que consisteix en allunyar p27^{KIP1} i p21^{CIP1/WAF1} de CDK2, assegurant així que es doni la progressió total cap a la fase S (Landis *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006a). Per tant el moviment de p27^{KIP1} establirà el balanç entre proliferació (associat amb CDK4) o arrest del cicle cel·lular (associat amb CDK2). En aquest sentit i obrint pas a l'apartat d'inhibició de les CDKs, queda clar, que al inhibir el complex ciclina D-CDK4 i CDK6 i desplaçant p27^{KIP1}, la cèl·lula serà capaç d'inhibir les dues cinases que orquestrin la fase G1 del cicle cel·lular (Blain, 2008) (**Figura 6**).

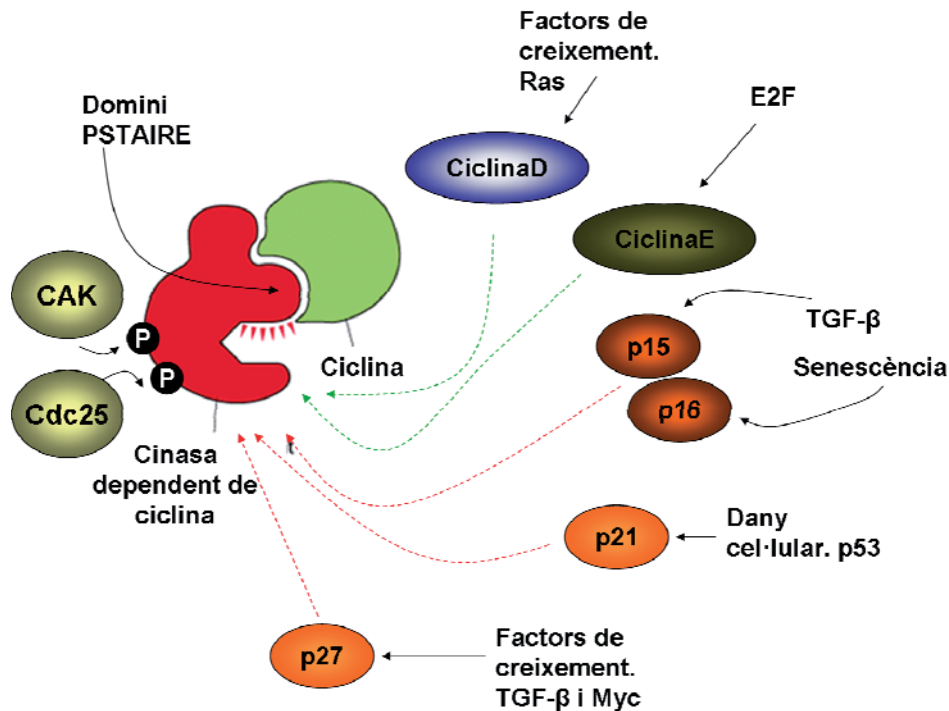


Figura 6. Els complexos ciclina –CDK s’activen gràcies a l’acció de cinases activadores i de fosfatases i estan regulats per una ampla quantitat de proteïnes implicades en diferents processos cel·lulars. CAK, cinasa activadora de ciclina-CDK; TGF- β , factor de creixement tumoral β .

2.3 La proteïna del retinoblastoma en la transició G1/S

El producte del gen supressor tumoral del retinoblastoma, la proteïna del retinoblastoma (pRb), és un regulador negatiu de la progressió a través del punt de restricció (R) de la fase G_1 del cicle cel·lular. Els membres de la família de proteïnes del retinoblastoma són: RB1 (p105-RB, el més inactivat en tumors), *retinoblastoma-like protein 1* (RBL1 o p107) i RBL2 (p130), les quals guarden certa homologia entre elles (Lapenna i Giordano, 2009). El pRb s’uneix a factors de transcripció tals com E2F, i a proteïnes que tenen els motius LXCXE com per exemple la família de les ciclines D, histones deacetilases (HDAC) o oncoproteïnes virals (Lapenna i Giordano, 2009). Aquests factors de transcripció estan involucrats en l’expressió de gens implicats en les subseqüents etapes del cicle cel·lular i comparteixen un domini d’unió al DNA que els hi permet unir-se a molts promotors de gens (Wu i Yu, 2009).

pRb existeix en tres formes generals: pRb no fosforilat, que està present en cèl·lules en fase G_0 o quan el pRb es sintetitza *de novo*; pRb hipofosforilat present en cèl·lules inhibides per contacte i en la fase primerenca de G_1 ; pRb hiperfosforilat que és inactiu i es troba en la fase tardana de G_1 , en S i en G2 (Ezhevsky *et al.*, 2001). S’ha de puntualitzar que encara que guardin certa homologia els membres de la família pRb, la seva funció no és del tot redundants i

així els nivells d'expressió de cadascun dels membres depèn de la fase del cicle cel·lular i del tipus cel·lular. De la mateixa manera, cada membre interacciona amb diferents factors de transcripció E2F, encara que el resultat final sigui el mateix: un arrest en la fase G1.

Durant la fase primerenca de G₁, la pRb és fosforilada, com s'ha dit anteriorment, per part dels complexos ciclina D-CDK4 i CDK6 i alliberant-se així els factors de transcripció de la família E2F del bloqueig de pRb. Aquesta alliberació es dona perquè la fosforilació en la part C-terminal de pRb causa una nova conformació que desfà la interacció pRb-E2F (van den Heuvel i Dyson, 2008). Els membres de la família INK4, com el supressor de tumors p16^{INK4a}, inhibeixen la funció cinasa de CDK4 i CDK6 unint-se a aquestes proteïnes i distorsionant el centre d'unió de l'ATP. Aquesta inhibició manté el pRb hipofosforilat i la cèl·lula no traspasa el punt de restricció R ja que es manté segregat el factor de transcripció E2F.

Però, quan es dóna un augment dels factors de creixement extracel·lulars, es produeix un increment de l'expressió de ciclina D que activa els complexos CDK4 i CDK6, produint-se la fosforilació del pRb que permetrà l'alliberament d'E2F i la conseqüent transcripció de gens com el de la ciclina E, que és necessària per activar CDK2 en la fase tardana de G1; d'aquesta manera, es crea un *feed-back* positiu que antagonitza els inhibidors Kip-Cip, marcant-los perquè siguin proteolitzats i s'acaba d'hiperfosforilar el pRb, traspasant-se així R. Superar aquest punt de no retorn implica en primer lloc, la síntesi de ciclina E i seguidament l'activació de la CDK2, que finalitza la hiperfosforilació de pRb, marcant l'entrada a la fase S. Una altra manera que tenen els complexos ciclina D-CDK d'activar la CDK2 és desfent la unió del pRb a histona deacetilases, permetent així que el gen de la ciclina E pugui ser desreprimat i així aquesta activi la CDK2 (Ho i Dowdy, 2002).

Així doncs, el supressor de tumors pRb, així com la família de factors de transducció que regula, E2F, tenen un paper crucial en les primeres fases del cicle cel·lular. A més a més, estudis en mamífers han posat de manifest que pRb interacciona amb moltes de les proteïnes E2F creant diferents complexos que activen (complexos activadors) o inhibeixen (complexos repressors) la transcripció. Així doncs, els complexos repressors suprimeixen la transcripció de diverses dianes en cèl·lules quiescents, diferenciades o durant la primera part de la fase G1, mentre que quan les cèl·lules prossegueixen el cicle cel·lular aquests complexos repressors són substituïts per complexos activadors que promouran la transcripció de gens. L'habilitat que té la família pRb per inhibir la transcripció es controlada per les cinases dependents de ciclins (van den Heuvel i Dyson, 2008).

2.4. La inhibició dels enzims que controlen la progressió del cicle cel·lular com estratègia antitumoral

Degut a l'ampli espectre de molècules que regulen el cicle cel·lular i els estudis que s'han fet del paper de les mateixes en càncer, actualment existeixen un gran nombre de teràpies vinculades a la inhibició de les diferents molècules que regulen el cicle cel·lular. Així doncs, actualment fosfatases com Cdc25A que estan sobreexpressades en gran quantitat de tumors i que es relacionen amb un mal pronòstic dels mateixos estan essent diana de nous tractaments antitumorals (Lavecchia *et al.*, 2010). En aquest sentit, també s'estan desenvolupant noves teràpies basades en la inhibició d'Aurora A, la cinasa que regula la mitosi i que també està sobreexpressada en gran varietat de tumors (Dhanasekaran *et al.*, 2010). El mateix està succeint amb altres reguladors del cicle, com són les *polo like* cinases o els inhibidors *kinespodin* (Perez Fidalgo *et al.*, 2009). De la mateixa manera i degut al paper central que juguen en el cicle cel·lular, les cinases dependents de ciclins han atret l'atenció com a potencials dianes terapèutiques degut al seu paper clau en el control de la proliferació cel·lular (Garrett i Fattaey, 1999). Els inhibidors de CDKs han estat objecte d'un ampli estudi degut al seu valor potencial en el tractament del càncer. Tres característiques fan que els inhibidors de CDKs siguin atractius com a potencials agents antitumorals:

- Són potents agents antiproliferatius, aturant les cèl·lules a la fase G₁ (Soni *et al.*, 2001) o G₂/M del cicle cel·lular (Damiens *et al.*, 2001).
- desencadenen l'apoptosi, sols o en combinació amb d'altres tractaments (Edamatsu *et al.*, 2000).
- En alguns casos la inhibició de CDKs contribueix a la diferenciació cel·lular (Matushansky *et al.*, 2000).

La primera CDK candidata com a diana antitumoral va ser la CDK2. Encara que la fosforilació inicial de pRb és dirigida per ciclina D-CDK4 i/o ciclina D-CDK6, la inactivació irreversible d'aquesta proteïna s'ha atribuït al complex ciclina E-CDK2. És per aquest motiu que es va considerar la CDK2 una potencial diana en el tractament del càncer i durant els últims anys s'han invertit grans esforços en dissenyar inhibidors de CDK2. No obstant, en recents treballs es posa de manifest que línies cel·lulars de càncer de còlon proliferen normalment després de la depleció de CDK2 (Berthet *et al.*, 2003) i que CDK2 no és necessària per la divisió cel·lular, ja que ratolins mancats d'aquesta proteïna sobreviuen dos anys sense defectes obvis (Malumbres i Barbacid, 2005; Ortega *et al.*, 2003).

Degut a aquestes troballes, la idoneïtat de CDK2 com a diana per inhibir la transició a través de la fase G₁ del cicle cel·lular està essent cada vegada més qüestionada.

S'han estudiat inhibidors sintètics específics de CDK1, 2 i 4 *in vitro*, amb l'objectiu d'identificar molècules d'estructura petita inhibidores selectives de CDK susceptibles de ser avaluades, posteriorment, en models *in vivo*. Els inhibidors de CDK més avançats en l'avaluació preclínica i clínica, com el CYC-202 (Seliciclib o roscovitina) i BMS-387032, han estat ben caracteritzats com a inhibidors de CDK2 (Malumbres i Barbacid, 2009). AT-7519, P276-00 que estan en la fase 2 d'assajos clínics inhibeixen entre d'altres la CDK1 (veure (Malumbres i Barbacid, 2009)).

Per veure, una revisió completa de cadascuna de les fases a nivell clínic en que es troben els inhibidors de les diferents cinases, així com la seva estructura o el seu mode d'acció consultar (Lapenna i Giordano, 2009).

Degut a la complexitat i la robustesa de la xarxa de processos encadenats del cicle cel·lular, resulta difícil trobar el millor punt on incidir. A més, degut als efectes compensatoris entre les diferents CDKs (Massague, 2004) i degut als fenotips de ratolins en els quals se'ls hi ha mutat gens de CDKs i/o ciclins (Sherr i Roberts, 2004) (Malumbres i Barbacid, 2005) s'ha de vigilar a l'hora de dissenyar les diferents teràpies antitumorals i així triar la diana més adient en cadascun dels casos. Tot i això, els últims estudis indiquen que el desenvolupament d'inhibidors específics de CDK4 i CDK6 per interferir en el cicle cel·lular és una estratègia farmacològica possible per a la creació de nous agents antineoplàstics. A més, el fet que l'oncosupressor p16^{INK4a} i/o els protooncògens ciclina D1, CDK4 i CDK6 es trobin mutats en la majoria de càncers humans, i que CDK4 i CDK6 estiguin amplificats i sobreexpresats en una gran varietat de tumors (DelSal *et al.*, 1996; Hall i Peters, 1996; Hartwell i Kastan, 1994; Millard i Koff, 1998; Sherr, 1996) suggereix a que la inhibició de CDK4 i CDK6 podria ser una bona estratègia antitumoral per alguns tipus de càncer.

A més, cada vegada es tenen més evidències genètiques que la inhibició dels complexos ciclina D-CDK4 podria ser una important diana pel tractament del càncer, tal com posa de manifest un treball recent (Yu *et al.*, 2006a), on es confirma que el *knockout* de CDK4 en cèl·lules de tumors de mama impedeix la formació del tumor. Malgrat això, deixant de banda aquestes sòlides evidències, en l'actualitat només existeix un inhibidor de CDK4 i CDK6 (PD 0332991) que estigui essent objecte de proves a nivell clínic (Malumbres *et al.*, 2008; McInnes, 2008; Toogood *et al.*, 2005; VanderWel *et al.*, 2005).

Vistos molts estudis que s'han fet en els últims anys en ratolins *knockout* en una o diverses CDKs, tot sembla indicar que els inhibidors no estan essent testats el tipus de tumor apropiat i que tot i el paper compensatori de les diferents CDKs, el context cel·lular de la cèl·lula atacada per un inhibidor influirà notablement en la resposta al tractament (Malumbres i Barbacid, 2009). Així doncs, models de tumors de ratolí sense ciclina D prevenien càncer de

mama quan aquest era conseqüència dels oncògens *ErbB2* o *HRas*, però no quan aquest depenia de les vies de senyalització Wnt i Myc (Yu *et al.*, 2001). Per una altra banda, la inhibició de CDK4 és efectiva en càncers de pell induïts per la via de myc (Miliani de Marval *et al.*, 2004), suggerint així que la dependència o no de CDK4 ve dictaminada per la naturalesa de les mutacions responsables de creixement tumoral així com el context cel·lular en el qual es donen aquestes mutacions. Per tant, existeix la possibilitat de que diferents tipus de tumors, depenent del seu espectre de mutacions, tinguin una sensibilitat distintiva en front a la inhibició de CDKs (Yu *et al.*, 2001). Així doncs, tenint en consideració les evidències científiques al respecte, la meta actual, és identificar potents inhibidors del complex ciclinaD-CDK4 que posseïxin suficient selectivitat en comparació amb altres CDKs i poder comprovar la seva efectivitat en la inhibició del creixement tumoral (Toogood *et al.*, 2005). Per tant, en aquesta Tesi Doctoral s'han estudiat a nivell molecular l'efecte de nous inhibidors selectius de CDK4 i CDK6 per tal de dissenyar noves teràpies combinades que permetin en últim terme contraatacar la desregulació de la transició G1/S que pateixen alguns tipus de tumors. Un objectiu clar, ha estat cercar la selectivitat dels nostres compostos, ja que les teràpies actuals no acaben de tenir resultats prometedors deguts als efectes secundaris induïts a l'afectar parcialment altres molècules o cinases implicades en el cicle cel·lular o en altres vies de senyalització molecular.

Per últim, però no menys important, el fet de triar la millor diana en una xarxa de processos encadenats com és el cicle cel·lular requereix una aproximació integrada del sistema com les que ofereix, en el marc de la Biologia de Sistemes, el formalisme de l'Anàlisi del Control Metabòlic (MCA) — veure Fell 1997 o Cascante 2002 per a una revisió (Cascante *et al.*, 2002; Fell, 1997). Aquest formalisme ha posat de manifest, per exemple, que el control recau principalment en la primera etapa d'una cadena de processos quan no hi ha regulació feedback, per tant la seva aplicació a una cadena de processos com el cicle cel·lular mostraria que CDK4 i CDK6 són bons candidats a exercir un important paper en el control i la regulació de la transició G1/S.

3. Rutes de senyalització molecular

El creixement i divisió que les cèl·lules experimenten després d'haver estat exposades a mitògens comporta una regulació complexa que involucra l'acció coordinada de milers de proteïnes cel·lulars diferents.

Processos com la proliferació, la migració o la mort d'aquestes cèl·lules requereixen la transferència d'informació des de sistemes de detecció —receptors— a tot un seguit de molècules intermediàries dins la cèl·lula, per a causar canvis en l'expressió de gens i en l'activitat

d'enzims, és a dir, la maquinària especialitzada en desenvolupar totes i cadascuna de les funcions cel·lulars.

Les vies de senyalització cel·lular comencen amb les proteïnes receptores que actuen com a sensors per a detectar qualsevol canvi en l'entorn cel·lular. Els receptors normalment es troben a la superfície cel·lular, on poden unir-se a molècules extracel·lulars que no poden travessar la membrana.

Aquests receptors transmembrana consten d'una part que es troba a l'exterior cel·lular – el domini extracel·lular –, d'una part central que travessa la membrana plasmàtica i una altra part a l'interior de la cèl·lula –domini intracel·lular-. El domini extracel·lular és aquell on s'uneix el lligand. Com a resultat de la unió d'aquests receptors als seus lligands, es transfereix un senyal a través de la membrana plasmàtica. La unió del lligand provoca un canvi conformacional al receptor. Moltes vegades aquesta interacció provoca la formació de dímers de molècules de receptor. Dins la cèl·lula, el canvi de conformació del receptor pot comportar l'estimulació d'una activitat intrínseca. Una d'aquestes activitats és l'activitat cinasa, que catalitza la transferència d'un grup fosfat a substrats proteics. Els primers residus fosforilats per aquesta activitat cinasa poden ser residus aminoacídics situats en el domini intracel·lular del propi receptor.

Aquesta autofosforilació inicia una cascada de senyals, en la qual, de manera seqüencial, la modificació de la conformació d'una proteïna indueix a la vegada modificacions en la conformació d'altres proteïnes.

Un clar exemple de receptor transmembrana estudiat en aquesta Tesi Doctoral és el receptor HER2 que pertany a la família dels receptors tirosina cinasa ErbB, la sobreactivació per factors de creixement s'ha vist en molts tipus de càncers. Aquesta família de receptors té 4 membres: Receptor de factors de creixement epidermal (EGFR, també anomenat HER1 o Erb1), HER2 (neu, ErbB2), HER3 (ErbB3) i HER4 (ErbB4) (Olayioye *et al.*, 2000; Yarden i Sliwkowski, 2001). Quan un lligand s'uneix a algun d'aquests receptors (excepte HER2), el lligand dimeritza amb un altre receptor de la família o amb altres receptors d'altres famílies i fosforila molts dels residus tirosincinases (Reese i Slamon, 1997) (**Figura 7**). Aquests residus serviran per reclutar molècules implicades en processos de transducció de senyal. Per tant, es modularà en últim terme l'activitat de moltes de les proteïnes que tenen un control crític de les funcions cel·lulars com la proliferació, la supervivència, la diferenciació i la mobilitat (Hung i Lau, 1999; Reese i Slamon, 1997). Així doncs, l'activació d'aquests receptors representa un circuit regulatori complex que genera un elevat nombre de senyals de transducció. L'activació d'HER2 succeeix principalment per la seva sobreexpressió en càncers d'ovari, de mama, de pulmó, de pròstata i orals (Agus *et al.*, 2000; Calvo *et al.*, 2003; Hirsch *et al.*, 2002; Koeppen *et*

al., 2001; Osman *et al.*, 2001; Slamon *et al.*, 1989), permetent així l'homodimerització espontània del mateix i l'activació de senyals de transducció d'un mode independent de lligand (Allen *et al.*, 2002) (**Figura 7**). El paper d'HER2 ha estat àmpliament estudiat en càncer de mama, on està sobreexpressat en el 30% dels casos i relacionat amb un mal pronòstic (Hynes i Stern, 1994; Ross i Fletcher, 1998; Ross *et al.*, 2003; Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989).

L'estudi d'aquests receptor i la seva implicació en càncer ha donat lloc a diferents aproximacions per tal d'inhibir els receptors EGFR: inhibició per unió directa d'anticossos, inhibició de la dimerització del receptor, atac amb anticossos del receptor per tal d'internalitzar fàrmacs antitumorals, atac de la cèl·lula maligna amb anticossos bi o triespecífics units a cèl·lules efectores citotòxiques, inhibidors de l'activitat tirosina cinasa intracel·lular per tal d'afavorir l'ubiquïtinització i degradació proteosomal del receptor (Baselga i Swain, 2009) (**Figura 7**).

Actualment, l'agent aprovat per tractar càncers de mama HER2 positius és el trastuzumab (Herceptin®) que ataca el domini extracel·lular d'HER2 (Morrow *et al.*, 2009). (Goldenberg, 1999; Shepard *et al.*, 1991; Sliwkowski *et al.*, 1999).

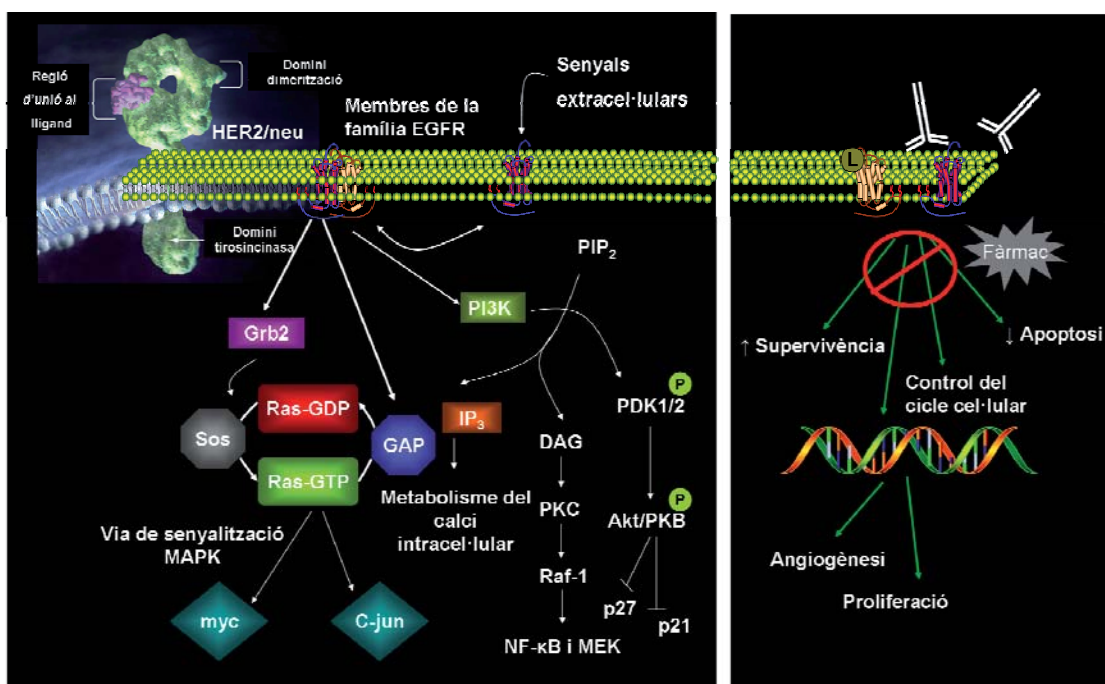


Figura 7. Via de senyalització de HER2. El receptor Her2/neu consta de diferents parts: el domini d'unió al lligand, el domini transmembrana i el domini de dimerització. L'activació del receptor HER2 afecta a dues vies de transducció de senyal: Ras i PI3cinasa. PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfat; IP₃, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat; DAG, Diacilglicerol; PKC, proteïna cinasa C; PKB, proteïna cinasa B. Adaptada de www.researchherpathways.com.

Així mateix, s'ha vist que la combinació d'aquestes teràpies amb d'altres provoca una millor resposta de la cèl·lula tumoral i els efectes secundaris de cadascun dels tractaments minva. Concretament, usant les tècniques de *microarrays* es va demostrar que les línies tumorals de mama amb HER2 sobreexpressat presenten una major sensibilitat a la inhibició de CDK4 i CDK6 (Finn *et al.*, 2009). De fet, l'activitat de CDK4 és crucial per mantenir el fenotip tumorigènic dels càncers de mama amb HER2 sobreexpressat (Reddy *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006b). En aquest sentit teràpies on es combina el trastuzumab amb inhibidors de CDK4 i CDK6 (PD0332991) presenten sinèrgia en tumors on es sobreexpressa HER2 degut a la major sensibilitat de la línia que porta la sobreexpressió (Finn *et al.*, 2009). Així mateix, PD0332991 combinat amb tamoxifè pot ser útil en càncers de mama resistents a tractaments hormonals (Sutherland i Musgrove, 2009).

Finalment, la cascada de transducció de senyals que desencadena l'activació de qualsevol via de transducció de senyal condueix a la modificació d'activadors i repressors de la transcripció, i per tant, a canvis en l'expressió de molts gens de la cèl·lula i com a conseqüència en l'activitat de varis enzims implicats en el metabolisme energètic (Nelson DL, 2004).

A continuació es descriuen dues de les proteïnes clau en les principals vies de transducció de senyal i les seves implicacions en la desregulació metabòlica que acompanyen.

3.1 Via de transducció de senyal PI3K i factors de transcripció FOXO

Moltes cascades de transducció de senyal on hi són implicades proteïnes cinases han estat estudiades degut a que estan involucrades en la progressió tumoral, apoptosi i altres efectes cel·lulars (Dhanasekaran i Premkumar Reddy, 1998). La via de transducció de senyal PI3K és conjuntament amb la de Ras una de les vies més importants de transducció de senyal que es troben alterades en càncer.

La via PI3K es activa quan una subunitat adaptadora anomenada p85 activa la subunitat catalítica p110 que fosforila el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP2) per generar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (IP3) (Vanhaesebroeck i Alessi, 2000) el qual s'acumula en la membrana creant lloc d'unió de cinases com PDK1 i Akt. Akt esdevé activa com a resultat de la seva localització a nivell de membrana i la seva fosforilació en Thr308 i Ser473 gràcies a la PDK. Un cop activada, Akt pot exercir moltes funcions cel·lulars, entre elles la inactivació dels factors de transcripció FOXO (Datta *et al.*, 1997) (del Peso *et al.*, 1997) (Cardone *et al.*, 1998) (Brunet *et al.*, 1999).

Les proteïnes de mamífer FOXO pertanyen a la classe O de factors de transcripció *forkhead*, els quals tenen un domini d'unió al DNA anomenat *forkhead* d'uns 110 aminoàcids

(Weigelt *et al.*, 2001) situat a la part central de la molècula. Els membres que pertanyen a les diferents subclasses de FOXO són: FOXO1, FOXO3A, FOXO4 i FOXO6. La llista de promotors de gens que contenen llocs d'unió per aquests factors de transcripció està en expansió i conté gens involucrats en apoptosi, resistència a l'estrès oxidatiu i inhibició del cicle cel·lular. Gens com la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) (Nakae *et al.*, 2001; Schmoll *et al.*, 2000; Yeagley *et al.*, 2001), la fosfoenolpiruvat carboxicinas (PEPCK) (Puigserver *et al.*, 2003), lligand a FAS (FasL) (Brunet *et al.*, 1999), p27^{KIP1} (Medema *et al.*, 2000) i d'altres estan regulats per aquests factors de transcripció.

Els factors de transcripció FOXOs són considerats supressors tumorals i en la majoria de tumors es troben inactivats degut a la sobreexpressió de la via PI3-cinasa (Brunet *et al.*, 1999; Dansen i Burgering, 2008; Greer i Brunet, 2005; Myatt i Lam, 2007) que provoca la fosforilació de FOXOs induint la sortida d'aquests del nucli de manera que no poden executar la seva funció transcripcional. L'estrès cel·lular o la inactivació de la via PI3-cinasa promouen la translocació de FOXO al nucli on pot tornar a actuar.

L'activitat de FOXO està regulada per una xarxa de senyalització que integra la informació provinent de la via PI3K-Akt i dianes de senyalització d'estrès, el que resulta en un patró de modificacions postransduccionals com poden ser fosforilació, acetilació i ubiquitinització, que afecten a les proteïnes a nivell de localització subcel·lular, estabilitat i activitat transcripcional (Aoki *et al.*, 2004; Biggs *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 2004; Frescas *et al.*, 2005; Kitamura *et al.*, 2005; Kops i Burgering, 1999; Matsuzaki *et al.*, 2003; Nakae *et al.*, 1999; Plas i Thompson, 2003; Rena *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999).

Els gens FOXO tenen un paper important en càncer i són considerats supressors de tumors degut als seus efectes antiproliferatius i proapoptòtics (Greer i Brunet, 2005). Els factors FOXO estan implicats en molts dels processos cel·lulars fonamentals, a través de la regulació d'un ampli conjunt de gens diana (**Figura 8**). La integració dels diversos estímuls extracel·lulars i intracel·lulars es reflexa en modificacions posttransduccionals que ocorren en les proteïnes FOXO, donant lloc al "codi FOXO", que pot ser interpretat per altres proteïnes, determinant el nivell, la intensitat, duració i activitat dels factors de transcripció FOXO (Calnan i Brunet, 2008).

Entre els processos que es veu implicat FOXO tenim:

- La apoptosi o mort cel·lular programada. Mutants nuclears de FOXO activen l'apoptosi (Brunet *et al.*, 1999; Dijkers *et al.*, 2002; Gilley *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2000). A més, Akt allunya FOXO dels promotors de gens involucrats en l'apoptosi com Bim, per tal de sobreviure (Dijkers *et al.*, 2000).

- El cicle cel·lular. L'expressió de formes constitutivament actives de FOXO indueixen para del cicle cel·lular en G1/S (Medema *et al.*, 2000). Els gens implicats en aquesta parada són p27^{KIP1} (Medema *et al.*, 2000) i p130 de la família de la proteïna del retinoblastoma (Kops *et al.*, 2002). Altres mecanismes d'acció de FOXO per parar el cicle són la repressió de l'expressió de ciclina D1 i D2 (Ramaswamy *et al.*, 2002), (Real *et al.*, 2005).
- Resistència a l'estrès, reparació del DNA i desintoxicació. Concordant amb l'aturada de cicle en G1/S y en G2/M (Tran *et al.*, 2002), FOXO sobreexpressa gens implicats en la reparació del DNA (Ramaswamy *et al.*, 2002), (Tran *et al.*, 2002) i a més promou la desintoxicació de ROS sobreexpressant enzims captadors de radicals lliures com la catalasa o la superòxid dismutasa de manganès (Kops *et al.*, 2002; Nemoto i Finkel, 2002; Ramaswamy *et al.*, 2002) (Tran *et al.*, 2002). Així FOXO controla dos aspectes claus de la resistència cel·lular a estrès: reparació del dany al DNA causat per ROS i desintoxicació de ROS (Greer i Brunet, 2005). A més a més, una de les funcions més interessants de FOXO és la seva capacitat d'augmentar la longevitat (Kenyon, 2005).
- Metabolisme. FOXO desenvolupa un paper clau en el metabolisme sobreexpressant gens que controlen el metabolisme de la glucosa (Greer i Brunet, 2005). Desencadena gluconeogènesi per sobreexpressió de la glucosa-6-fosfatasa i la fosfoenolpiruvat carboxicinas (Nakae *et al.*, 2001; Puigserver *et al.*, 2003; Schmoll *et al.*, 2000; Yeagley *et al.*, 2001).

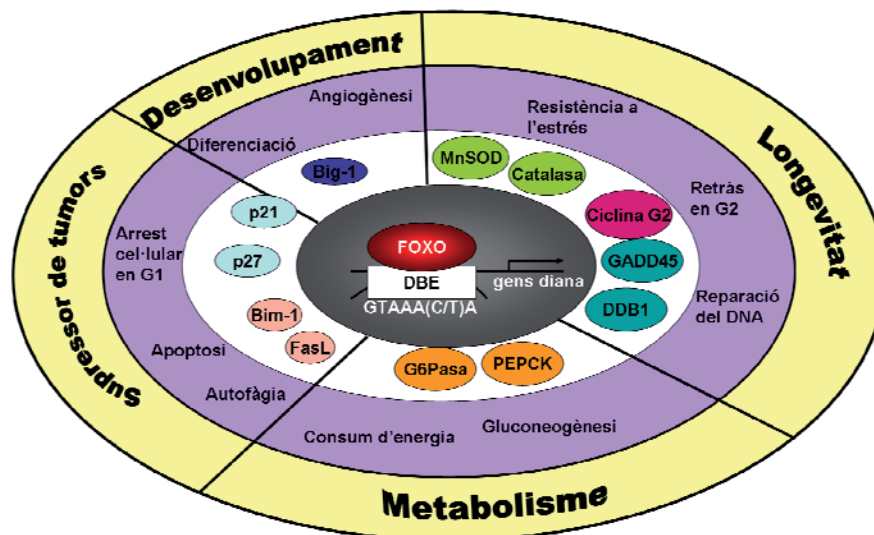


Figura 8. Principals funcions dels factors de transducció FOXO. Les molècules diana dels factors de transcripció FOXO estan situades a la rotllana blanca i les funcions que es veuen afectades estan escrites en la rotllana lila, mentre que les funcions generals dels factors de transcripció estan en la circumferència externa. MnSOD, superòxid dismutasa de manganès; G6Pasa, glucosa-6-fosfatasa; PEPCCK, fosfoenolpiruvat carboxicinas; FasL, lligand de FAS. Adaptada de Calnan i Brunet, 2008.

A nivell de metabolisme, cal destacar que la via de la PI3K així com alguns dels seus efectors, proteïna Akt, mTORC1 i FOXO augmenten el flux glicolític per múltiples mecanismes. Primerament, incrementen el consum de glucosa gràcies a la sobreexpressió dels transportadors de glucosa (GLUT1, GLUT2 i GLUT4), i en alguns casos, promovent la translocació dels mateixos a la membrana plasmàtica. En segon lloc, afavoreixen el flux glicolític degut a un augment de l'acoblament entre la fosforilació oxidativa i la glicòlisis. En tercer lloc, Akt hiperactiva pot activar mTORC1, el qual promou l'acumulació de HIF1 α en condicions de normòxia i incrementa l'abundància de GLUT1, hexocinasa-2, i lactat deshidrogenasa. Finalment, Akt fosforila i activa la fosfofructocinasa 2 (PFK2), que permet l'activació alostèrica de la fosfofructocinasa 1 (PFK1) gràcies a la fructosa-2,6-bisfosfat (Robey i Hay, 2009).

Així doncs, la reactivació de FOXO pot ser una estratègia prometedora per la teràpia contra el càncer. Aquesta reactivació seria fàcil, ja que la inactivació dels factors de transcripció és deguda a modificacions posttransduccionals i no a mutacions i per tant la proteïna encara és present (Dansen i Burgering, 2008). Teràpies per la seva reactivació ja s'ha portat en assajos clínics en combinació amb d'altres com el trastuzumab (Reid *et al.*, 2007) i d'altres. Només el coneixement complert de com reprogramar el codi FOXO permetrà el desenvolupament de teràpies més eficients contra el càncer, que aprofitin les característiques supressores de tumors de FOXO i al mateix temps evitaran que aparegui resistència (Maiese *et al.*, 2009).

En aquesta Tesi doctoral s'ha estudiat la relació de FOXO amb el metabolisme i s'ha identificat a l'àcid metilselenínic com a un potent inductor de la translocació de FOXO al nucli, permetent així un ampli ventall d'efectes a nivell molecular i metabòlic.

3.2 La transformació oncogènica: els oncògens *Ras*

L'anomenada transformació oncogènica, o simplement transformació, es defineix com la conversió d'una cèl·lula normal en una altra amb propietats similars a les canceroses (Lodish *et al.* 2003). Un dels causants principals d'aquesta transformació són els oncògens, que són gens els productes dels quals intervenen en la transformació de cèl·lules en cultiu o en la inducció de càncer en animals i que van ser descoberts originàriament en virus causants de tumors (**Figura 9**). Més tard es va descobrir que aquests oncògens corresponien a formes mutants de gens normals, anomenats protooncògens, que participen del control de la proliferació cel·lular. Els protooncògens es poden convertir en oncògens sense necessitat d'un intermediari víric. Reordenaments cromosòmics, agents químics i radiació són, entre altres, factors que poden produir mutacions oncogèniques (Nelson DL, 2004).

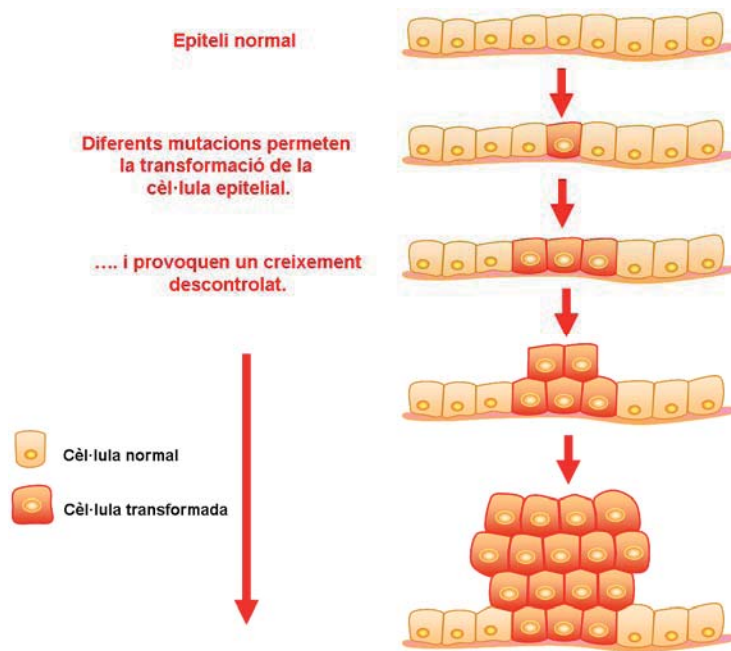


Figura 9. Procés de transformació cel·lular.

Entre els oncògens coneguts, destaquen especialment els de la família *Ras* (Malumbres i Barbacid, 2003), que està formada per diferents membres com *Ras* (H, K, M, N i R), *Rap* i *Ral*. Aquesta família s'agrupa dins de les anomenades proteïnes G monomèriques i actuen com un interruptor cel·lular, transmetent senyals extracel·lulars des de la membrana citoplasmàtica fins a l'interior de la cèl·lula activant la ruta de les MAPK (Ruta de les cinases activades per mitògens) (Adjei, 2001; Friday i Adjei, 2005). A més a més, la ruta de la PI3K així com els factors intercanviadors de nucleòtids tenen gran importància en induir transformació a través de Ras (Boettner i Van Aelst, 2002) (Malumbres i Barbacid, 2003). La importància d'aquesta família d'oncògens resideix en la gran quantitat de tumors humans que presenten mutacions en els mateixos. Dels tres principals gens *Ras* (H, N i K) que hi ha en humans, la forma que es troba principalment afectada en tumors es *KRas* (60-90% dels càncers de pàncrees) (Rodríguez-Viciana *et al.*, 2005) i 50% en els càncers colorectals (Janssen *et al.*, 2005). En canvi, la mutació en *HRas* és molt freqüent en tumors de bufeta i en el 85% dels síndromes de Costello i la de *NRas* en leucèmies agudes (Bos, 1989). Un cop traduït, Ras és transloca a la membrana després d'un procés de prenilació (Adjei, 2001), on bascula entre la seva forma activa (unida a GTP) i la seva forma inactiva (unida a GDP). En condicions normals, les cèl·lules quiescents presenten tan sols un 5% de la proteïna Ras total en forma activa, mentre que després d'una activació mitogènica, aquesta arriba al 50% (Osterop *et al.*, 1993).

El mecanisme d'activació de Ras comença com a resposta a la unió d'un lligand extern, com a factors de creixement o citoquines, al seu receptor, el qual és dimeritzat i activa la seva

capacitat tirosina cinasa intrínseca. Els receptors tirosina cinasa tenen la capacitat d'autofosforilar-se en residus específics de la seva fracció intracel·lular, creant un domini reconegut per proteïnes adaptadores, que s'uneixen a ells. Aquestes proteïnes adaptadores recluten factors intercanviadors de nucleòtids de guanosina (GNEFs – factors intercanviadors de nucleòtids amb guanosina) cap a la membrana: un exemple paradigmàtic és la proteïna SOS, que s'uneix llavors a Ras causant-li un canvi conformacional i provocant la dissociació de GDP i la unió de GTP. Tot i que les proteïnes Ras tenen una moderada activitat GTPasa intrínseca que els permet tornar al seu estat inactiu, aquesta activitat està estimulada per diferents proteïnes activadores de l'activitat GTPasa (GAPS – proteïnes activadores de l'activitat GTPasa). És molt important destacar que totes les mutacions puntuals que s'han descrit en proteïnes Ras, i que es limiten a un petit nombre de codons específics (12, 13, 59 i 61), suprimeixen aquesta hidròlisi de GTP induïda per les GAP (Adjei, 2001; Janssen, 2003).

Els efectors que les proteïnes Ras són capaços d'activar són variats. Entre ells destaquen les cinases serina treonina de la família Raf i les seves conseqüents cascades d'activació mitogèniques dutes a terme per cinases de la MAPK, les GTPases Rac, Rho o la PI3 cinasa. Aquestes vies de senyalització poden, en molts casos, coexistir, provocant efectes sinèrgics (Rodríguez-Viciano *et al.*, 2005). Els processos cel·lulars que Ras controla són, per tant, variats, des de la regulació del cicle cel·lular (Downward, 1997) fins a la diferenciació o l'angiogènesi (Adjei, 2001; Campbell i Der, 2004) o fins i tot efectes en el metabolisme via Akt o el factor induïble per hipòxia HIF-1 (Kikuchi *et al.*, 2009; Majewski *et al.*, 2004; Whiteman *et al.*, 2002), afectant diversos factors de transcripció com AP-1, NF- κ B i Myc, donant així una idea de la importància i de les implicacions que mutacions en *Ras* comporten. Els efectes a nivell de metabolisme de les diferents isoformes dependrà dels efectors de les vies de transducció de senyal en que la isoforma de Ras participi (**Figura 10**).

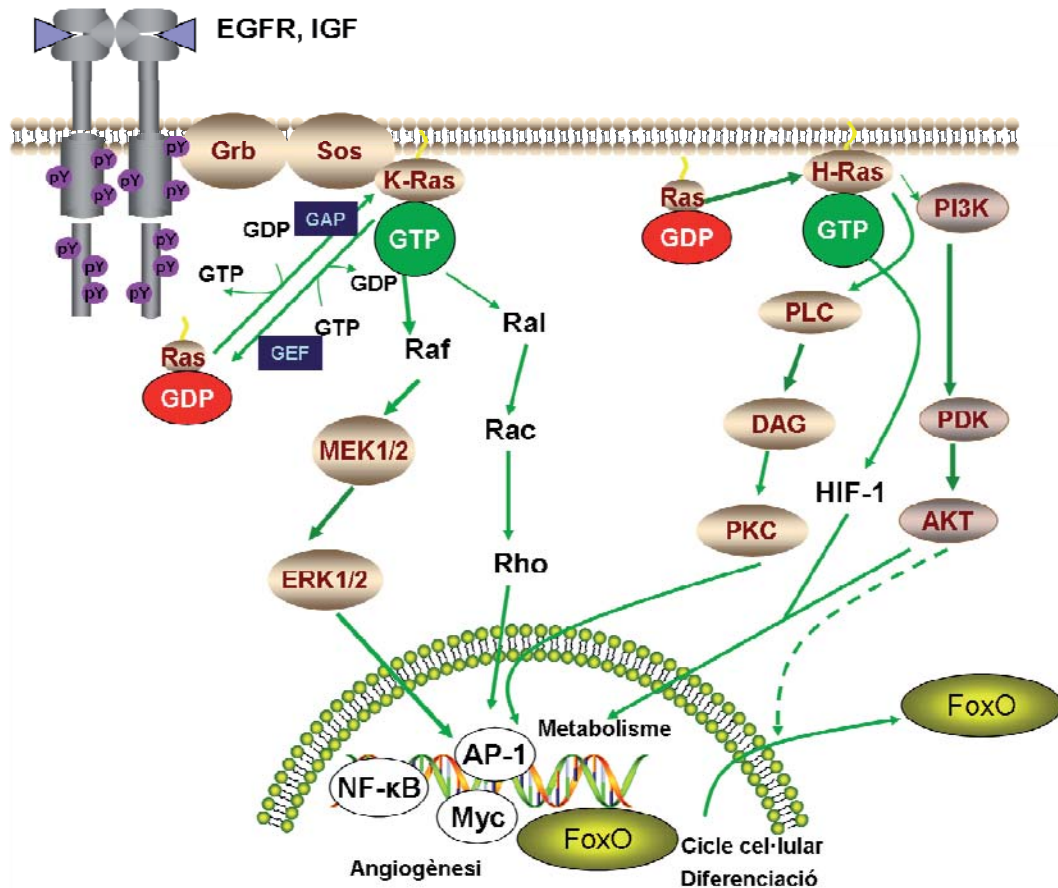


Figura 10. Via de senyalització de Ras. Les fletxes discontinues verdes indiquen activació, mentre que les vermelles indiquen inhibició. GAP, proteïna activadora de l'activitat GTPasa; GEF, factors intercanviadors de nucleòtids de guanina; PKC, proteïna cinasa C.

Tot i que sembla que les isoformes comparteixen moltes de les seves accions, els mutants en *KRas* activen preferencialment la via ERK1/2 mentre que els mutants *HRas* prefereixen la via PI3K, controlant en últim terme el creixement i la supervivència cel·lular (Yan *et al.*, 1998). A més a més dels seus diferents papers a l'hora de senyalitzar, els diferents enzims tenen una localització diferencial, de manera que mentre la majoria de HRas i KRas estan en la superfície cel·lular, NRas en troba en gran nombre de càncers en les endomembranes. Aquesta característica per tant, també canviarà una mica el perfil trasduccional que esdevé de l'activació de cadascuna de les isoformes. De totes maneres, està demostrat que KRas es l'inductor més potent del fenotip transformat (Keller *et al.*, 2007). De la mateixa manera, encara que les tres isoformes són capaces de sostenir la proliferació cel·lular, KRas provoca una resposta mitogènica més robusta que les altres isoformes, al menys en MEFs (Fibroblats Embriònics de Ratolí) (Drosten *et al.*).

Estudis recents s'han focalitzat en esbrinar la funció específica de cadascuna de les isoformes, ja que tot i que guarden molta homologia, sembla ser que difereixen en la senyalització intracel·lular que desencadenen i en la seva regulació. Un factor clau per aquestes diferències entre les isoformes són les modificacions postransduccionals i la compartimentalització de la senyalització cel·lular (Omerovic *et al.*, 2007).

A més, s'ha de tenir en compte que les diferents isoformes són necessàries per promoure diferents tipus de càncer, i així la mutació *HRas* G12V es necessita per mantenir els melanomes en ratolins deficients en *INK4*, mentre que *KRas* G12V o G12D es troba principalment en càncer de pulmó i d'altres adenocarcinomes. Es més, ja no és que cadascuna de les isoformes presenti una ruta de senyalització distintiva (Quinlan i Settleman, 2009) o una compartimentalització característica sinó que mutacions diferents en cadascuna de les isoformes o en diferents codons de la mateixa isoforma poden donar perfils fenotípics i metabòlics distintius (Vizan *et al.*, 2005). Aquest és el cas de les cèl·lules NIH-3T3 transfectades establement amb *KRas* mutat en el codó 12 (K12) o al codó 13 (K13). Aquestes diferències donen lloc a una marcada glicòlisi anaeròbia (K12) o una marcada activitat de la piruvat deshidrogenasa i la branca oxidativa de la via de les pentoses fosfat (K13) que es relaciona amb les diferents estratègies de proliferació, associades a una major resistència a l'apoptosi (K12) o a una major capacitat mitòtica (K13) (Vizan *et al.*, 2005).

Per una altra banda, donada la importància del perfil metabòlic adoptat per les diferents mutacions en les isoformes de Ras, es pot afirmar que aquestes adaptacions metabòliques induïdes per les diferents mutacions serien bones dianes antitumorals per teràpies combinades que tinguessin com objectiu restaurar la funcionalitat de la via de les MAPcinases. A més, s'ha de tenir en compte, que fins al moment la majoria dels estudis, almenys a nivell metabòlic, s'han focalitzat en *KRas* i han descrit com mutacions en aquesta isoforma presenten una elevada dependència a la glicòlisi, una fosforilació oxidativa reduïda i feblesa front a la deprivació de glucosa (Chiaradonna *et al.*, 2006). Pel que en aquesta Tesi Doctoral ens hem proposat estudiar les conseqüències metabòliques d'una mutació puntual en *HRas* per tal de dissenyar teràpies més personalitzades i complementàries a les existents que anirien no només a inhibir la via de *HRas* sinó també la reorganització metabòlica que la mutació en aquesta isoforma comporta.

El fet de que existeixi una elevada freqüència de mutacions presents a *Ras* ha donat lloc a múltiples estratègies terapèutiques que condueixen a la interrupció d'aquesta via de senyalització. Aquestes estratègies s'han centrat tant en la inhibició de l'expressió de *Ras* com en la prevenció de la seva localització membranosa, així com també en la inhibició dels seus efectors (Friday i Adjei, 2005). De fet, les noves patents de drogues que inhibeixen aquesta via de senyalització són més selectives i milloren la resposta terapèutica i minven els efectes tòxics en comparació amb els inhibidors universals d'aquesta via (Dangle *et al.*, 2009).

4. El *crosstalk* en càncer

Les diferents vies de senyalització descrites en l'apartat anterior i el cicle cel·lular estan anormalment regulats en càncer. Així receptors tirosina cinasa, com el EGFR, inicien la senyalització mitjançant la creació de centres de reclutament de les proteïnes efectores a la membrana (Pawson, 2004) (**Figura 11**). Els residus fosforilats de tirosina en dominis citoplasmàtics de receptors com HER2 creen llocs que són reconeguts per dominis d'unió a fosfotirosina de les proteïnes adaptadores. Aquestes després atrauen als efectors. Els tres membres de la família Ras, HRas, KRas i NRas, s'activen d'aquesta manera mitjançant els adaptadors Grb2 i SHC (Coleman *et al.*, 2004; Downward, 2003). Quan Ras està unit a GTP modula una complexa xarxa d'efectors (Sears i Nevins, 2002) (Coleman *et al.*, 2004; Downward, 2003). Entre aquests, la cascada de cinases Ras-MEK-ERK té un paper clau en la promoció de l'activació de CDK. ERK fosforila i estabilitza c-Myc, un factor de transcripció que indueix l'expressió de la ciclina D1 i suprimeix la d'inhibidors de CDK (Sears i Nevins, 2002) (**Figura 11**). És més, estudis recents demostren que l'activació d'ERK1/2 a través de Ras és una estratègia utilitzada per molts càncers colorectals per tal de sobrepassar el fre que imposa p27^{KIP1} en el cicle cel·lular, ja que la fosforilen i permeten la seva destrucció proteosomal (Kress *et al.*). Per una altra banda, les subunitats p85 i p110 de la ruta de PI3K, s'uneixen als residus fosforilats de receptors activats com el d'insulina a través de dominis. PI3K també es mou cap a la membrana cel·lular mitjançant Ras. A la membrana, PI3K genera fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfat (IP3). Llocs de la membrana rics en IP3 atreuen la proteïna cinasa Akt, també coneguda com proteïna cinasa B (PKB) que després s'activa per la cinasa PDK. Akt ajuda a activar CDK alleujant dues restriccions (**Figura 11**): (1) Inhibint la glicogen sintasa cinasa 3 β (GSK3- β), prevenint així la fosforilació i desestabilització de la ciclina D (Sears i Nevins, 2002), (2) Akt també inhibeix els factors de transcripció FOXO, extraient-los del nucli i, per tant, allunyant-los dels gens diana que inclouen p27^{KIP1} i p21^{CIP1/WAF1} (Vivanco i Sawyers, 2002). Tot això dona conseqüències a nivell metabòlic que conformen un metaboloma tumoral que ha de ser estudiat amb diverses eines de la metabolòmica i que serà molt útil per tal de dissenyar estratègies terapèutiques dirigides a inhibir tant les vies de senyalització que estan correlacionades entre sí com l'adaptació metabòlica que l'activació d'aquests vies comporta.

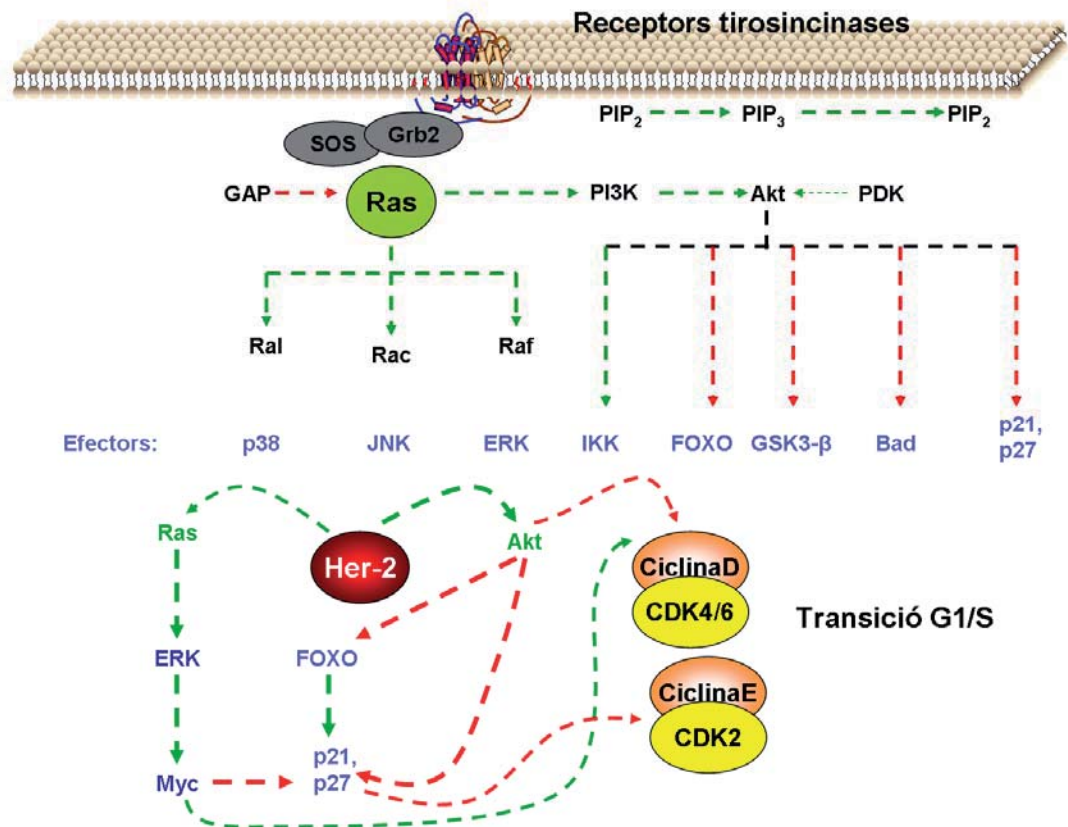


Figura 11. El *crossstalk* entre les diferents vies de senyalització i transducció de senyal. GAP, proteïnes activadores de l'activitat GTPasa; PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat; IP₃, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat. Adaptada de Massague, 2004.

5. La metabolòmica

La metabolòmica és definida com una disciplina dedicada a la identificació i la quantificació dels metabòlits d'un sistema biològic (Oliver *et al.*, 1998), i es troba estretament relacionada amb la Biologia de Sistemes, atès que per l'estudi del metaboloma i el seu funcionament dinàmic, són necessaris freqüentment l'ús d'eines i conceptes propis d'aquesta última, com ara els models computacionals que permeten entendre i predir el comportament de les xarxes metabòliques.

L'objectiu de la metabolòmica és identificar i quantificar tots els metabòlits sintetitzats endògenament (Fiehn, 2002). Aquest conjunt de molècules constitueix el perfil bioquímic d'un organisme o teixit determinat, el qual ens permet detectar i analitzar d'una manera molt sensible la naturalesa de qualsevol canvi en la fisiologia cel·lular o tissular. Aquest objectiu tan ambiciós presenta moltes limitacions degut a la gran heterogeneïtat dels metabòlits presents en un organisme. El gran nombre de metabòlits diferents, les diferències entre les seves concentracions relatives, i la variabilitat en les seves propietats físico-químiques (polaritat,

hidrofobicitat, pes molecular o l'estabilitat química) exigeixen l'aplicació d'una varietat de tecnologies i una àmplia gamma de diferents condicions experimentals. Així, metodologies específiques estan sent desenvolupades per als diferents grups de metabòlits, com els lípids (lipidòmica) o sucres (glucòmica). Curiosament, tots aquests mètodes podrien ser útils per a estudiar el metaboloma i la seva importància en el desenvolupament i progressió de tumors (Vizán *et al.*, 2008).

L'ús de plataformes analítiques com la cromatografia de gasos o de líquids acoblada a espectrometria de masses (GC/MS i LC/MS) i la ressonància magnètica nuclear (RMN) ha ajudat a la consecució d'aquest objectiu i a obtenir un millor coneixement del metabolisme cel·lular (Vizan *et al.*, 2007).

Una aproximació particularment útil, i que s'ha utilitzat en aquesta tesi doctoral, per a la determinació del perfil metabòlic consisteix en l'ús de l'espectrometria de masses i molècules marcades amb un isòtop estable i no radioactiu (^{13}C) com a font de carboni. Concretament l'ús de $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -D-glucosa com a marcador glicolític permet revelar la contribució de les principals rutes del metabolisme del carboni a partir de l'anàlisi de metabòlits intermediaris. S'observa, que el canvi de patró en la distribució del ^{13}C procedents de la $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -D-glucosa en els intermediaris metabòlics intracel·lulars proporciona informació simultània sobre el flux de carboni a través de la ruta de les pentoses fosfat, la glicòlisi, el cicle dels àcids tricarbòxilics (TCA) i la síntesi d'àcids grassos. Aquest traçador permet per tant avaluar la contribució de les principals rutes del metabolisme central del carboni a la degradació de la glucosa i la síntesi d'altres metabòlits intermediaris, gràcies a que la seva marca es distribueix de diferent manera en funció de les rutes metabòliques per les quals es processa el traçador (Boros *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 2003).

A diferència de la transcriptòmica i la proteòmica, que ofereixen una imatge instantània de la funció d'una cèl·lula o un organisme, la metabolòmica brinda una oportunitat molt més directa d'observar les relacions entre el genotip i el fenotip i com estan influenciats per l'entorn. No obstant, el metaboloma és quelcom dinàmic que experimenta canvis constants i una única mesura només representa igualment una imatge congelada de la fisiologia d'una cèl·lula o un organisme. Per obtenir una caracterització funcional més específica de la cèl·lula i de la regulació de les diferents vies metabòliques, cal estimar la producció i degradació dinàmica dels metabòlits que estan finament regulats i que formen part de l'entramat metabòlic. Així, per a la caracterització de les xarxes metabòliques i el seu estat funcional, cal conèixer els fluxos metabòlics intracel·lulars, pel que en els darrers anys, diverses eines computacionals han estat desenvolupades per a l'estimació quantitativa dels fluxos en les xarxes metabòliques de les distribucions isotopomèriques (Sauer, 2006; Selivanov *et al.*, 2006)(vegeu Sauer 2006, Selivanov et al 2006, i les seves referències). És per això que neix la fluxòmica com una

sotsdisciplina de la metabolòmica. Així, la finalitat de la fluxòmica és no només estudiar els metabòlits presents en la cèl·lula, sinó també la dinàmica de la distribució de fluxos metabòlics a través de les vies de síntesi de macromolècules i de producció d'energia.

Cal tenir en compte que aquesta variant de l'anàlisi metabolòmica, en què s'analitza el patró de marcatge dels metabòlits (MIDA, anàlisi de distribució isotopomèrica de massa), i que comença a ser coneguda com *tracer-based metabolomics* (metabolòmica obtinguda a partir de l'ús de traçadors) (Lee, 2006), requereix un coneixement previ de les possibles distribucions que el traçador utilitzat pot experimentar dins de l'entramat metabòlic. En aquest sentit, la gran majoria d'anàlisi del fluxoma es limiten a la distribució de fluxos inclosos dins de les vies centrals del metabolisme del carboni. Aquest tipus de mesures utilitzant precursors metabòlics estables, i que mostren la incorporació de marca isotòpica en els metabòlits, poden ser analitzades mitjançant paquets informàtics adequats.

Tot i la importància del metabolisme en el desenvolupament i progressió de tumors, hi ha pocs estudis que considerin el metaboloma i les xarxes metabòliques del càncer des d'un punt de vista sistèmic. El perfil metabòlic d'una determinada cèl·lula representa el nivell on s'integren molts dels senyals que controlen el creixement, modulant la base genètica d'aquesta. Com a resultat, l'anàlisi del perfil metabòlic consisteix en la valoració simultània dels fluxos intracel·lulars en les principals rutes de la xarxa metabòlica, tant de síntesi de macromolècules com de producció d'energia, sota diferents estats fisiològics (Boros *et al.*, 2002).

Així, últimament s'ha mostrat que l'estudi del perfil metabòlic com a resposta a agents transformants o factors de creixement tumorals, permet establir una connexió entre les xarxes de senyalització mitogèniques i els processos metabòlics, així com fins a quin punt l'estat metabòlic afecta el creixement cel·lular (Vizan *et al.*, 2005; Vizan *et al.*, 2009b). Les determinacions realitzades amb [1,2-¹³C₂]-D-glucosa com a traçador han permès caracteritzar metabòlicament el comportament fisiològic de les cèl·lules en diferents estats i en resposta a malalties com el càncer (**Figura 12**), presentant-se com una alternativa per a la identificació de dianes antitumorals i el disseny i avaluació de teràpies (Marin *et al.*, 2004; Ramos-Montoya *et al.*, 2006; Vizan *et al.*, 2005; Vizan *et al.*, 2009b).

dirigits, així com per assajar l'efecte metabòlic de potencials compostos antitumorals. El perfil metabòlic s'utilitza per exposar de manera detallada les modificacions causades en els fluxos de substrats com a resposta a processos patològics, a noves teràpies antitumorals o l'adquisició de fenotips resistents a certs tractaments.

En aquest sentit, eines com l'Anàlisi de Control Metabòlic donarà una oportunitat per analitzar sistemàticament la distribució del control de fluxos entre els diferents enzims de la xarxa metabòlica, permetent així als investigadors identificar aquells enzims, la inhibició dels quals provoqui una marcada mort de les cèl·lules tumorals i no de les no tumorals. Aquests enzims, així com la sobreexpressió d'isoenzims tumorals, serien dianes de tractaments quimioterapèutics donat que és d'esperar que la seva inhibició tingui un fort efecte sobre el metabolisme. Així mateix el coneixement del perfil metabòlic associat a alteracions genètiques pot ser una bona diana per ser explotada. Per tant, el enteniment de la naturalesa multifactorial de les adaptacions metabòliques en càncer ens pot subministrar les claus que obren les portes al disseny de noves teràpies antitumorals combinades.

En aquesta Tesi Doctoral, s'ha fet ús de les eines que ens proporciona la metabolòmica per tal de descriure i caracteritzar diferents perfils metabòlics adoptats per cèl·lules transformades gràcies a una mutació i per tal de descriure l'efecte a nivell metabòlic de la inhibició de la transició G1/S del cicle cel·lular. Per tal de fer aquests estudis s'ha fet ús de plataformes analítiques com la cromatografia de gasos o de líquids acoblada a espectrometria de masses (GC/MS i LC/MS) i s'ha determinat la contribució de les principals rutes del metabolisme del carboni a partir de l'anàlisi de metabòlits intermediaris gràcies a l'ús del traçador [1,2-¹³C₂]-D-glucosa. Així doncs, hem pogut caracteritzar metabòlicament el comportament fisiològic de les cèl·lules esmentades per tal d'identificar dianes antitumorals i així dissenyar teràpies coadjuvants pel tractament dels diferents estats patològics estudiats.



OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta Tesi Doctoral es profunditzar en el comportament a nivell metabòlic de la transformació i progressió tumoral i analitzar els efectes induïts per nous compostos sobre cèl·lules tumorals per tal de validar-los com a potencials productes antitumorals. Per abordar aquest objectiu global, en aquesta Tesi doctoral s'han emprat, entre d'altres, tècniques pròpies de la metabolòmica, basades en l'ús de traçadors, i de la biologia molecular per tal d'estudiar el metabolisme central del carboni i el paper que juguen alguns dels seus enzims en altres processos relacionats amb la progressió tumoral. Dins d'aquest objectiu general, s'engloben diferents qüestions que conformen el cos de la Tesi Doctoral. D'un mode detallat, els objectius concrets es defineixen com:

1. Validació de la calceïna com a potent inhibidor selectiu de CDK4 i CDK6 i ús dels fibroblastos embriogènics de ratolí *Knockout* en CDK4, CDK6 i CDK3 per tal de determinar els canvis metabòlics associats a la inhibició de CDK4 i CDK6.
2. Millora dels inhibidors de CDK4 i CDK6 testats per incrementar la seva unió amb el farmacòfor mitjançant modificacions estructurals.
3. Disseny i caracterització a nivell molecular de nous inhibidors específics dels enzims CDK4/6.
4. Estudi del mecanisme d'acció de l'àcid metilselenínic.
5. Caracterització de les adaptacions metabòliques associades a la mutació V12 en l'oncogen *HRas*.

La consecució d'aquests objectius ens permetrà profunditzar en el coneixement del metabolisme transformant i tumoral, així com en la resposta de la cèl·lula tumoral en front de nous compostos potencialment útils com antitumorals. Aquest coneixement podrà ésser utilitzat pel desenvolupament de noves estratègies que, basant-se en intervencions a nivell metabòlic o molecular, complementin les teràpies antitumorals existents.



INFORME DELS
DIRECTORS

INFORME DEL DIRECTOR DEL FACTOR D'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS

Marta Cascante Serratosa, catedràtica del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona, i Antonio F. Ramos Montoya, investigador post-doctoral del Departament d'Oncologia de la Universitat de Cambridge (Regne Unit), com a directors de la tesi titulada "Caracterització metabòlica de la transformació i la progressió tumoral i anàlisi de l'efecte de nous compostos amb potencial terapèutic" que presenta Miriam Zanuy Porquet, fan constar que:

Aquesta Tesi Doctoral es presenta com a "Compendi de Publicacions", vertebrant-se en 5 capítols, dels quals la doctoranda es primera autora en tots, essent n'Antonio F. Ramos Montoya coautor en el capítol 1. Els resultats presentats en el capítol 1 volen ser publicats a la revista *Metabolomics* amb un índex d'impacte de **3,254**. Els resultats del capítol 3 volen ser publicats en la revista *Journal of Medicinal Chemistry* amb un índex d'impacte **4,898**, després de que es resolgui la sol·licitud de protecció sota patent que està essent tramitada per l'AVCRI (Agència de Valorització i Comercialització dels Resultats de la Investigació). Per una altra banda, els resultats del capítol 5 volen ser publicats a la revista *Cancer Research* amb un índex d'impacte **7,514** després d'implementar-los amb dades teòriques de models informàtics. Els resultats del capítol 2 no seran publicats fins que l'AVCRI protegeixi la propietat intel·lectual dels resultats que s'exposen. Finalment, els resultats presentats en el capítol 4 volen ser publicats a la revista *Molecular Cancer Therapeutics* amb un factor d'impacte de **5,003**.

Pel que respecta a la contribució de la doctoranda a cadascun dels capítols, Miriam Zanuy Porquet va ser l'encarregada de portar el gruix de la investigació, des de la planificació i desenvolupament dels experiments, fins l'anàlisi i posterior escriptura, exceptuant el capítol 2 on la síntesis química dels compostos va esser realitzada en el Departament de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona així com l'escriptura d'aquesta part dels resultats. Per una altra banda, els experiments de *docking* dels capítols 1 i 2 van ser realitzats al Departament de Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona. Finalment, les figures 1, 2, 3, 7, 8 i 9 del capítol 1 van ser incloses en la Tesi doctoral del Dr. Antonio F. Ramos Montoya (coautor del treball).

Dra. Marta Cascante Serratosa
Catedràtica del Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular.

Dr. Antonio F. Ramos Montoya
Investigador post-doctoral del Departament
d'Oncologia de la Universitat de Cambridge (Regne
Unit).



RESUM
GLOBAL:
RESULTATS,
DISCUSSIÓ
I CONCLUSIONS

RESULTATS

La Tesi Doctoral que es presenta profunditza en el coneixement del metabolisme cel·lular, concretament en el metabolisme central del carboni de cèl·lules no tumorals transfectades amb un oncogen (*HRas*) amb una mutació puntual (G12V), de cèl·lules no tumorals amb unes delecions puntuals en proteïnes clau que controlen el cicle cel·lular o de cèl·lules tumorals tractades amb un agent antitumoral. El metabolisme tumoral, vist com a punt final on convergeixen diferents vies de transducció de senyals, pot servir no sols per entendre com es produeixen alteracions que comporten l'adquisició d'un fenotip tumoral maligne, sinó que també pot oferir una sèrie de dianes terapèutiques basades en impedir l'adaptació específica de la cèl·lula tumoral durant l'adquisició de malignitat o front a tractament antitumorals. És per això que a més en aquesta Tesi Doctoral se li ha donat molta importància a la síntesi i desenvolupament de nous compostos amb potencial antitumoral, dels quals s'ha fet un estudi molecular i metabòlic detallat per tal de veure la resposta de la cèl·lula tumoral front a les pertorbacions provocades. Un coneixement detallat dels efectes a nivell molecular i metabòlic de potencials fàrmacs és d'esperar que sigui de gran utilitat a l'hora de dissenyar teràpies combinades per tal de potenciar sinèrgies entre fàrmacs i evitar-ne efectes secundaris no desitjats. Finalment, en tot moment s'ha considerat la cèl·lula com un *tot* capaç d'integrar efectes a nivell molecular i metabòlic, pel que els resultats que es mostren sempre estan correlacionats en aquests dos nivells per tal d'aprofundir també en les interrelacions entre metabolisme i senyalització.

Amb aquesta finalitat, s'han utilitzat models *in vitro* i s'han estudiat les seves alteracions a nivell molecular i metabòlic: en el primer capítol s'ha posat de manifest que els canvis metabòlics que acompanyen la parada del cicle cel·lular en G1 induïda pel tractament amb calceïna en cèl·lules de càncer de colon són deguts principalment a l'acció de la calceïna com inhibidor de les cinases dependents de ciclins 4 i 6. A més a més, s'ha caracteritzat molecularment la calceïna com un inhibidor d'aquests cinases (CDK4 i CDK6) i s'han estudiat els canvis que produeixen a nivell metabòlic. En el segon capítol, donada l'importància de la transició de la fase G1/S en les cèl·lules tumorals, s'ha fet ús de tècniques bioinformàtiques i programes de modelització per tal de trobar altres compostos capaços d'inhibir els enzims més importants en aquesta transició del cicle cel·lular (CDK4 i CDK6). A més a més, s'han estudiat els efectes a nivell molecular d'aquells compostos més prometedors en diferents línies tumorals i s'han validat com a bons inhibidors de les dianes d'interès. El tercer capítol està dedicat a la cerca de modificacions estructurals de la calceïna que s'ajustin millor al farmacòfor identificat per tal d'inhibir CDK4 i CDK6. En el quart capítol, s'ha aprofundit en el paper de l'àcid metilselenínic en processos cel·lulars com el cicle cel·lular, l'apoptosi i la producció d'espècies

reactives d'oxigen i s'ha identificat la translocació de FOXO provocada pel producte com un esdeveniment primerenc que dona lloc a la resta d'efectes moleculars i metabòlics que expliquen les propietats antitumorals del compost. Finalment, en el cinquè i últim capítol s'ha analitzat el fenotip metabòlic de fibroblasts de ratolí amb la mutació puntual G12V en el codó 12 de la isoforma oncogènica *HRas* i s'han desentranat les vies del metabolisme central del carboni principalment afectades per aquesta mutació puntual.

A continuació s'exposen, de forma resumida, els resultats obtinguts en els diferents capítols d'aquest estudi, seguits d'una discussió general dels mateixos i una enumeració de les diferents conclusions a les que s'ha arribat en aquesta Tesi Doctoral.

1. La inhibició de CDK4 i CDK6 afecta a la progressió tumoral i pertorba el robust perfil metabòlic tumoral

Els enzims CDK4 i CDK6 són claus en la progressió del cicle cel·lular (Malumbres, 2005). De la seva correcta expressió i regulació, així com de la dels seus reguladors, depèn que la cèl·lula pugui passar de la fase G1 a la fase S i que el cicle cel·lular pugui progressar adequadament. Per això, en aquest capítol ens vam proposar valorar el perfil metabòlic resultant de la inhibició dels enzims CDK4 i CDK6.

En la primera part de l'estudi vam caracteritzar molecularment l'efecte de la calceïna sobre cèl·lules tumorals. Aquesta molècula va ser triada gràcies a programes de modelització desenvolupats al grup del Dr. Jaime Rubio de la Facultat de Química, amb els que es va fer una cerca de molècules potencialment útils com a inhibidors de CDK4 i CDK6. El primer pas d'aquest procés va ser trobar el farmacòfor d'unió als enzims CDK4 i CDK6. Un cop definit, es va fer una cerca en diferents bases de dades per tal de trobar diferents estructures que s'ajustaven adequadament el farmacòfor d'interès. D'entre elles, la calceïna va ser el producte que va mostrar més activitat sobre cèl·lules tumorals. Concretament, mitjançant l'ús de substrats marcats radioactivament (^{32}P -ATP) es va veure com la calceïna era capaç d'inhibir un 50% de l'activitat *in vitro* de la CDK4 i CDK6 a 75 μM . A més a més, assajos cinasa contra CDK1 i CDK2 van mostrar que la calceïna no disminuïa la activitat d'aquests dos enzims a concentracions molt majors d'aquelles que inhibien el 50% de l'activitat de les CDK4 i CDK6, fet que va posar de manifest que la calceïna podria ser, com s'estava buscant, un compost amb activitat selectiva contra CDK4 i CDK6.

A continuació, es van fer assajos directament sobre cèl·lules d'adenocarcinoma de còlon HCT116. En aquests estudis es va veure que la calceïna era citotòxica per aquestes cèl·lules tumorals i que a una concentració de 400 μM provocava una inhibició del 50% de la viabilitat cel·lular respecte als controls no tractats. Aquesta concentració ens va semblar massa elevada per poder ser d'utilitat en un futur com a part d'alguna teràpia antitumoral. Així, i donat que se sap que la calceïna és molt polar, es van fer assajos de viabilitat cel·lular amb dos èsters de la calceïna (terbutoximetil-calceïna i acetoximetil-calceïna) per tal de veure si d'aquesta manera es facilitava l'entrada del compost actiu a dins la cèl·lula. Les IC_{50} obtingudes per aquests èsters (80 μM per terbutoximetil-calceïna i 0,6 μM per acetoximetil-calceïna) varen ser entre 1 i 3 ordres de magnitud inferiors a la de la calceïna.

Un cop millorada la seva biodisponibilitat, per tal de certificar el mecanisme d'acció de la calceïna es va testar l'efecte del seu ester amb la IC_{50} més baixa (acetoximetil-calceïna o calceïna/AM) a nivell de cicle cel·lular. Els resultats obtinguts mostren que la calceïna/AM parava el cicle cel·lular en la fase G1 i provocava que les cèl·lules HCT116 esdevinguessin apoptòtiques a les 24 hores del tractament i finalment morissin. A més a més, assajos de western blot van mostrar com amb el tractament amb calceïna/AM disminuïa la quantitat de proteïna del retinoblastoma fosforilada en la seva serina 780. Així, a mesura que s'augmentaven els nivells de calceïna/AM, els nivells de pRb fosforilat disminuïen, fet característic d'una parada del cicle cel·lular en la fase G1. Finalment, per acabar d'arrodonir el mecanisme d'acció, es va comprovar que l'inhibidor natural dels complexos ciclina-CDK4 i CDK6, p16^{INK4a}, era desplaçat de la seva unió al complex per la calceïna. Aquest resultat corroborava que el lloc d'unió de la calceïna al complex, per tal d'exercir la seva funció inhibidòria, era el mateix al que s'uneix p16^{INK4a}. Tots aquests resultats van permetre concloure que la calceïna era un inhibidor selectiu de CDK4 i CDK6 que no només parava la divisió cel·lular, sinó que a més a més matava les cèl·lules tumorals.

Donat que la calceïna acomplia les característiques d'un inhibidor selectiu dels complexos ciclina D-CDK4 i CDK6, es va analitzar quin efecte metabòlic s'induïa quan es perturbava la transició G1/S degut a la inhibició d'aquests enzims per aquest compost. La calceïna va provocar unes adaptacions metabòliques en les cèl·lules tumorals HCT116 que suposaven principalment una reversió del desbalanç de les branques oxidativa i no oxidativa de la ruta de les pentoses fosfat, així com una disminució de la síntesi *de novo* de ribosa i una disminució del consum de glucosa i producció de lactat dosi-dependent.

Per tal d'associar aquests canvis metabòlics induïts per la calceïna/AM a la inhibició que aquesta provoca sobre els enzims CDK4 i CDK6 es van caracteritzar simultàniament fibroblasts embriogènics de ratolí *knockout* per CDK4, CDK6 i CDK2. Aquests fibroblasts presentaren una taxa de proliferació menor respecte als seus controls i el seu consum de glucosa i la producció

del lactat eren menors que els dels fibroblasts embriogènics sense les delecions. Aquests fets coincidien amb el perfil glicolític de les cèl·lules HCT116 tractades amb calceïna/AM. És d'especial interès recordar que recentment s'ha posat de manifest que la pertorbació del desbalanç entre les branques oxidativa i no oxidativa de la via de les pentoses fosfat podria ser una bona diana terapèutica per tractaments quimioterapèutics. És per això que a continuació es va estudiar el perfil metabòlic de la via de les pentoses fosfat en els models cel·lulars mencionats anteriorment. La deleció dels enzims CDK4, CDK6 i CDK2 va fer a les cèl·lules menys dependents de la branca oxidativa de la ruta de les pentoses fosfat i, de fet, la taxa de síntesi de nucleòtids d'aquestes cèl·lules *triple knockout* es va veure disminuïda respecte a la de la línia cel·lular control. Tots aquests resultats van descriure una alteració a nivell del metabolisme central del carboni en la cèl·lula, la qual es feia patent en una disminució dels nivells dels sucres fosfat, mesurats per LC/MS, en els moments en que la cèl·lula no podia progressar a través de la transició G1/S.

Així doncs, aquest capítol descriu com la calceïna és un bon inhibidor selectiu de la CDK4 i CDK6 i com la inhibició d'aquests enzims a més a més de provocar efectes moleculars antitumorals provoca efectes metabòlics que destorben tota la robusta adaptació metabòlica aconseguida per les cèl·lules tumorals, revertint el desbalanç entre les branques oxidativa i no oxidativa de la via de les penstoses fosfat. Aquests efectes metabòlics són, a més a més, coincidents amb els canvis metabòlics induïts per la deleció de CDK4, CDK6 i CDK2 en fibroblasts embriogènics de ratolí (MEF). Per tant, es proposen els enzims CDK4 i CDK6 com a bones dianes antitumorals per tractaments quimioterapèutics que ataquen al tumor alhora des d'una vessant molecular i una altra metabòlica.

2. Nova estratègia per inhibir CDK4 i CDK6 mimetitzant el mecanisme d'acció de p16^{INK4a}

Els enzims CDK4 i CDK6, tal i com s'ha vist en el capítol anterior, són considerats bones dianes terapèutiques no només per la parada en la progressió cel·lular que implica la seva inhibició, sinó pels efectes metabòlics que aquesta inhibició comporta. Durant dècades s'han estat avaluant i cercant nous inhibidors de CDK4 i CDK6 per a la pràctica clínica i encara a hores d'ara no hi ha molts resultats prometedors. La inespecificitat de la majoria dels compostos i la gran quantitat d'efectes secundaris que se'n deriven provoquen que la majoria dels tractaments amb aquests inhibidors no tinguin gaire èxit (Toogood *et al.*, 2005). Per tant en aquest capítol ens vam proposar trobar nous inhibidors sintètics pels enzims CDK4 i CDK6 que poguessin millorar els ja existents fins al moment, i que es poguessin emprar com a teràpies coadjuvants en tractaments antitumorals segons el transfons genètic i metabòlic tumoral i la dependència de la línia tumoral vers aquests enzims.

En la primera estratègia utilitzada es van aprofitar les dades obtingudes dels models de dinàmiques moleculars desenvolupats al grup d'investigació del Dr. Jaime Rubio per tal de trobar altres candidats l'estructura dels quals s'ajusti millor al farmacòfor identificat per tal d'inhibir els complexos ciclina D–CDK4 i CDK6. Entre els candidats trobats, es van escollir una bateria de 8 compostos que diferien en la seva estructura principal, els quals van ser testats mitjançant assajos cinasa per tal de veure quins d'ells presentaven millors característiques com a possibles inhibidors de l'activitat cinasa de la CDK4 i CDK6. Per tal de dur a terme els estudis d'inhibició de CDK4 i CDK6 amb assajos cinasa, es van utilitzar enzims immunoprecipitats de cèl·lules HCT116 i, fent servir com a reactiu ATP radioactiu, el grau d'inhibició va ser valorat posteriorment per autoradiografia.

Amb un *screening* a altes concentracions (1 mM) es van escollir tres compostos (D, F i J) com els millors inhibidors de CDK6 i va ser amb aquests compostos amb els que es va seguir tot l'estudi molecular.

Per tal d'estudiar els efectes moleculars dels inhibidors seleccionats es van fer estudis de selectivitat d'acció contra les diferents cinases encarregades de regular el cicle cel·lular. Els tres inhibidors seleccionats, D, F i J presentaren activitat inhibidora de la CDK6 *in vitro* en assajos cinasa a 25, 10 i 10 µM. A més, a aquestes concentracions també s'inhibia significativament l'activitat de CDK4 en assajos cinasa. Aquesta inhibició tampoc semblava dependent del tipus de ciclina associada a CDK4 o CDK6, ja que quan les immunoprecipitacions es van efectuar amb anticossos per les diferents ciclins D, els compostos van presentar els mateixos nivells d'inhibició sobre aquestes cinases. A més a més i de forma addicional, a aquestes mateixes concentracions els tres compostos no van exercir una inhibició significativa sobre l'activitat de CDK1 i CDK2.

A continuació, i un cop descrita l'activitat inhibidora contra CDK4 i CDK6 en assajos cinasa es van portar a terme assajos de proliferació cel·lular. Per aquesta tasca es va utilitzar una sèrie de diferents línies cel·lulars valorant-ne la viabilitat front a tractaments dels tres compostos d'interès a diferents temps. Els criteris utilitzats per triar les diferents línies cel·lulars van ser diversos: la línia d'adenocarcinoma de colon HCT116 perquè posseeix un pRb inalterat i no és sensible a l'acció de l'inhibidor natural p16^{INK4a}, la línia de colonòcits humans no tumorals NCM460 per tal de testar la selectivitat dels compostos vers a les cèl·lules tumorals; dues línies de adenocarcinoma de mama, MCF-7 i SKBR-3 degut a que expressen diferents nivells del gen Her2 i aquest tret les podria fer més o menys sensibles a inhibidors de CDK4 i CDK6; i la línia de ronyó de mico COS-1 perquè té el pRb inactiu i s'hauria de mostrar menys sensible a inhibicions dels enzims CDK4 i CDK6.

Les IC_{50} dels tres productes assajats es van establir en el rang de milimolar per totes les línies cel·lulars. No obstant, sembla que aquests compostos podrien tenir certa selectivitat vers les línies tumorals, ja que els efectes sobre les cèl·lules HCT116 van ser superiors als efectes sobre la seva línia control no tumoral, els colonòcits humans NCM460. A més a més, els productes van mostrar una activitat citotòxica major en la línia tumoral de mama SKBR3, que presenta alts nivells de HER2, que en la línia tumoral de mama MCF-7, on els nivells d'HER2 són menors (IC_{50} = 750 vs. 900, 1100 vs. 1480 i 850 vs. 1080 μ M en SKBR-3 i MCF-7, respectivament i pels productes D, F i J). Finalment, els resultats sobre la línia cel·lular COS-1 (amb un pRb constitutivament inactiu) van corroborar que l'acció d'aquests productes succeeix via pRb i ens van permetre descriure els compostos D, F i J com a útils vers cèl·lules on el pRb es manté inalterat.

Degut als alts valors de l' IC_{50} en les diferents línies tumorals es va sintetitzar un èster del producte F per tal de millorar l'entrada del producte a través de la membrana plasmàtica. Amb aquesta modificació, la seva IC_{50} va disminuir a 100 μ M respecte als 1320 μ M del seu derivat actiu en HCT116. Això va suggerir que la síntesi de derivats més lipòfils dels productes D, F i J milloraria la seva eficàcia en cèl·lules en cultiu.

A continuació, i tal com es va fer al capítol 1, es va estudiar l'estat de fosforilació del pRb. Amb aquests experiments es pretenia discernir si aquests compostos, tot i a aquestes dosis tan elevades, serien capaços d'exercir la funció suggerida als assajos cinasa un cop arribaven a la seva diana. Només en aquest cas, en un futur proper es plantejaria la síntesi de derivats més lipòfils per millorar la seva entrada a la cèl·lula. Afortunadament, els resultats van fer evident que els tres compostos disminuïen la fosforilació de pRb de manera significativa.

La caracterització d'aquests nous inhibidors ens obre noves portes en la recerca de modificacions químiques estructurals que permetin mantenir l'esquelet de compostos amb potencial inhibidor i els punts d'unió essencials per la unió amb les molècules d'interès (caps de grup), per així trobar noves famílies de compostos més lipòfils, amb una activitat inhibidora de CDK6 i CDK4 que permetin pertorbar el cicle cel·lular i així interrompre la progressió tumoral.

3. Disseny, síntesi i propietats antitumorals de nous inhibidors de CDKs

La progressió del cicle cel·lular és un dels punts clau de la biologia les cèl·lules tumorals, ja que moltes de les molècules que el regulen es troben alterades i així es permet que les cèl·lules puguin proliferar d'un mode incontrolat (Malumbres i Barbacid, 2009). En condicions normals, el cicle cel·lular està eficaçment regulat per complexos ciclina-CDK i els seus inhibidors que permeten que la cèl·lula progressi només quan sigui necessària la seva replicació. En el cas de les cèl·lules tumorals, la desregulació d'aquests complexos i dels seus inhibidors

permeten una progressió descontrolada que acaba formant la massa tumoral. Per tant, en aquests casos és necessari restablir la funcionalitat dels inhibidors o bé inhibir l'activitat dels enzims per tal de retornar a la situació controlada.

Per a abordar aquest objectiu i seguint les estratègies seguides en els dos capítols anteriors es van sintetitzar i descriure estructuralment tota una sèrie d'anàlegs de la calceïna dissenyats per a la recerca d'un nou farmacòfor que presenti activitat antitumoral per unió a CDK4 i CDK6. Amb aquest mecanisme d'acció, unint-se en el lloc d'unió a p16^{INK4a}, s'espera trobar un efecte citotòxic notori i selectivitat enfront a les diferents CDKs. Degut a que la calceïna presentava *a priori* moltes de les característiques per ser un bon inhibidor dels enzims CDK4 i CDK6, es va emprar com a cap de sèrie pel disseny de nous compostos amb una millor capacitat d'unió a la diana. La família de lactones disubstituïdes que es descriuen en aquest capítol són estructures inèdites fins al moment com antitumorals. De fet, aquesta sèrie de compostos està en procés de consideració de redacció de patent per part de l'Agència de Valorització i Comercialització dels Resultats de la Inverstigació (AVCRI).

Les modificacions estructurals que es van realitzar sobre els anells centrals de la calceïna van ser fonamentalment: modificacions dels substituents, biosisterime i apertura de cicle de l'estructura principal. La síntesi es va dur a terme en el Laboratori de Química Farmacèutica per Bernat Auqué, sota la direcció de la Dra. Maria Dolors Pujol. Els productes es varen preparar a partir de productes de partida comercials segons les tècniques convencionals d'un laboratori de síntesi de compostos orgànics. Posteriorment, l'estructura química dels compostos es va confirmar per IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, EM i l'anàlisi elemental. La puresa dels compostos finals va excedir el 98%.

Un cop sintetitzats i aïllats tots els compostos es va procedir a avaluar l'activitat antitumoral *in vitro* en cèl·lules d'adenocarcinoma de còlon HCT116, obtenint-se així els valors d'IC₅₀ per a cadascun dels compostos de la sèrie. Aquest assaig ja ens va permetre descartar aquelles estructures que contenien anells tancats pel seu baix grau de citotoxicitat. A més a més, es va emprar la línia de colonòcits humans NCM460 per a veure com aquests compostos mostraven una major selectivitat per les cèl·lules tumorals que per les no tumorals. De totes maneres, cal tenir en compte que la línia de colonòcits humans és proliferant, pel que qualsevol producte amb activitat inhibidora del cicle cel·lular les afectarà en certa mesura.

També es van realitzar assajos de citometria de flux per tal de determinar si la inhibició provocada pels productes sintetitzats generava la corresponent parada de cicle i apoptosi. Es va veure que tots els compostos, excepte el **5**, provocaven una aturada del cicle en major o menor grau, essent els productes **7** i **8** els que provocaven una aturada més significativa. La determinació d'apoptosi utilitzant annexina V unida al fluorocrom FITC va mostrar com les

cèl·lules tumorals esdevenien apoptòtiques i experimentaven el procés de *flip-flop* de la membrana amb els diferents tractaments, essent aquest procés molt més accentuat pel cas dels productes **2**, **7** i **8**. Aquest efecte correlaciona amb la parada del cicle que aquests compostos provocaven en aquesta mateixa línia cel·lular durant el temps d'estudi (48 i 72h). Finalment, estudis de *western blot* contra la proteïna pRb fosforilada en la seva Ser780, diana dels enzims CDK4 i CDK6, van mostrar com els productes, especialment **1**, **5**, **6** i **8** inhibeixen la fosforilació d'aquesta proteïna en aquest lloc específic, suggerint que la diana dels productes eren els enzims d'interès. Per a confirmar que la diana que estaven inhibint els productes era evidentment la diana per la que havien estat dissenyats, es va estudiar l'efecte inhibitori de diferents estructures sobre CDK4 *in vitro* a través de les plataformes analítiques que disposa l'empresa Cerep a França. Els resultats no van ser gaire prometedors, ja que la inhibició que donen els productes a una dosi de 100 µM no arriba més enllà del 31% pel millor inhibidor (**8**). Aquests mateixos productes s'estan tornant a assajar donat que les condicions amb les que va transcorre l'experiment per part de l'empresa no van ser les òptimes. Per tant, en aquest capítol es presenta tota una família d'inhibidors de CDKs amb unes característiques estructurals comunes que els fa potencialment útils com a productes antitumorals i que, a dia d'avui, estan essent valorats per l'AVCRI de la Universitat de Barcelona per tal de protegir-los sota patent, en un futur pròxim. A partir de les relacions estructura-activitat específiques ha estat possible extreure conclusions importants de les característiques dels grups funcionals més adients per l'activitat antitumoral. Aquestes característiques estructurals permetran descriure un nou farmacòfor, que de ben segur, ens conduirà al disseny racional i a la preparació de nous compostos que haurien de permetre optimitzar l'activitat biològica i la selectivitat.

4. FOXO3a intervé en els efectes antitumorals de l'àcid metilselenínic

El seleni i els seus derivats són àmpliament coneguts per les seves propietats nutritives, tòxiques i antitumorals (Ganther, 1999; Schrauzer, 2009). Recentment molts estudis han centrat la seva atenció en esbrinar quin és el mecanisme d'acció del seleni o dels seus derivats per tal de ser usats com agent antitumorals.

En aquest capítol, per tal d'estudiar l'efecte del àcid metilselenínic (derivat del seleni) i esbrinar el mecanisme d'acció pel qual exerceix la seva funció antitumoral, es van estudiar molecularment els efectes del compost sobre cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó A-549 i es van relacionar els efectes a nivell molecular amb els efectes a nivell metabolòmic, prèviament estudiats pel grup de la Dra. Teresa Fan a la Universitat de Louisville (Estats Units d'Amèrica).

Per tal d'abordar aquest objectiu es van tractar cèl·lules A-549 amb diferents concentracions del MSeA per tal de valorar la seva capacitat citotòxica a diferents hores. El

MSeA va demostrar ser un producte altament citotòxic, inhibint un 50% de la viabilitat cel·lular respecte al control a la concentració de 0,65 μ M. A més a més, el producte induïa canvis morfològics clarament observables a 24h i la producció de ROS minvava a les 24 i 48h de tractament amb MSeA detoxificant així el tumor. Quan es van estudiar els efectes del MSeA a nivell de cicle cel·lular es va observar que el producte induïa una forta parada en la fase G1 del cicle cel·lular que era dosi dependent. Paral·lelament es va veure que el MSeA era capaç d'induir apoptosi en la línia cel·lular A-549 després de 24h de tractament, però que aquest efecte era molt més accentuat després de 72h, quan es podien observar una subpoblació apoptòtica i la formació de cossos apoptòtics.

Per una altra banda, estudis moleculars amb altres línies cel·lular i estudis metabòlics de l'efecte de MSeA sobre aquesta mateixa línia tumoral indicaven que la via de la PI3K estava implicada en l'acció del compost i que Akt estava jugant un paper molt important. Així mateix, el grup de la Dra. Fan va descriure com metabòlicament el MSeA disminuïa la glicòlisi, el cicle TCA i la PPP, efectes contraris a la sobreactivació de la via PI3K. Per aquest motiu es va estudiar l'efecte del MSeA sobre un dels efectors finals de la via PI3K, els factors de transcripció FOXO.

Els resultats obtinguts mostren que el MSeA era capaç de translocar FOXO al nucli després d'1,5h de tractament i que FOXO es mantenia en el nucli al cap de les 24h de durada del experiment. Aquest fet i les propietats exercides per aquests factors de transcripció podien explicar els efectes observats en tractaments més llargs amb el producte.

Aquestes conseqüències moleculars induïdes pel MSeA han permès catalogar el producte com a un fort inductor de la translocació de FOXO al nucli. Aquesta translocació de FOXO al nucli es tractaria d'un dels processos inicials en la cadena d'esdeveniments desembocats en provocar en les cèl·lules tumorals una parada del cicle cel·lular, detoxificació de radicals lliures i, possiblement, apoptosi. Per tant, els resultats obren noves portes al desenvolupament de teràpies combinades de MSeA amb compostos citotòxics utilitzats actualment en teràpia del càncer, com és el cas del cisplatí.

5. Perfil metabòlic associat a la mutació V12 en el gen *HRas* en fibroblasts de ratolí

El perfil metabòlic representa el punt final on s'integren multitud de senyals cel·lulars. Les cèl·lules tumorals, així com les transformades presenten un metabolisme extremadament actiu i distintiu que ha suscitat interès als científics en els últims anys degut a la seva robustesa que pot portar associades fragilitats front a pertorbacions (Kroemer i Pouyssegur, 2008; Vizán *et al.*, 2008). El coneixement de les adaptacions metabòliques de cèl·lules transformades i les seves diferències respecte a cèl·lules no tumorals ofereix la possibilitat de dissenyar teràpies

combinades dirigides contra els fluxos metabòlics que es troben augmentats en aquestes cèl·lules transformades degut a una mutació altament present en tumors. Per aconseguir aquest propòsit és necessari l'ús de tècniques que permetin estimar no sols els canvis en els metabòlits, sinó també en els fluxos que els connecten, com la metabolòmica basada en l'ús de traçadors (*tracer-based metabolomics*).

En aquest capítol ens vam proposar caracteritzar el perfil metabòlic de la línia de fibroblasts de ratolí transfectats amb l'isoforma oncogènica *HRas* mutada (G12V) en el codó 12. Es va fer ús de la [1,2-¹³C₂]-D-glucosa i de l'anàlisi de la distribució d'isotòpomers de massa (MIDA) per tal de comparar la línia transfectada amb el seu control no transfectat. D'aquesta manera, demostrem que les cèl·lules transfectades *HRas*-V12 presenten diferències significatives en relació al metabolisme central del carboni respecte a les cèl·lules control. Concretament, es va observar que les cèl·lules transfectades amb *HRas* mutat (G12V), tot i que consumien i produïen més o menys la mateixa quantitat de glucosa i lactat respectivament, presentaven canvis notables en altres vies del metabolisme del carboni. Així, les cèl·lules que presentaven la mutació *HRas*-V12 mostraven un clar desbalanç en la via de les pentoses fosfat, afavorint la branca oxidativa enfront de la no oxidativa. Aquest desbalanç en l'ús de les branques de la PPP és una característica metabòlica de les cèl·lules tumorals que els permet ésser metabòlicament més eficients per tal de mantenir l'alta taxa de proliferació i a més a més els hi permet generar gran quantitat de poder reductor (NADPH) per tal d'utilitzar-lo en processos anabòlics com la síntesi d'àcids grassos, la qual també es veu més augmentada en el cas de les cèl·lules *HRas*-V12. L'anàlisi de la incorporació de marca en la ribosa provinent del RNA va posar de manifest que la síntesi d'aquest metabòlit era més o menys igual en la línia mutada que en el seu control el que estava en concordança amb una taxa de proliferació similar.

L'activitat piruvat cinasa (PK) es va veure augmentada en les cèl·lules *HRas*-V12 degut a que en aquestes cèl·lules mutades predominaria principalment la forma tetramèrica. Aquest resultat és consistent amb el fet que l'augment de l'activitat PK resultaria en una disminució en els nivells dels intermediaris de la part alta de la glicòlisi provocant una menor activitat dels enzims de la via no oxidativa de la PPP (transcetolasa i la transaldolasa) i donant lloc a un menor reciclatge de pentoses fosfat.

Finalment, tot i que ambdues línies presentaven una elevada activitat a través del cicle dels àcids tricarbòxics, les cèl·lules mutades requerien consumir més glutamina del medi per tal d'abastir les rutes anabòliques amb quantitats d'amoni extra. L'ús del cicle dels àcids tricarbòxics, va ser estudiat seguint dues aproximacions. En la primera aproximació, varem observar que les cèl·lules transfectades amb *HRas*-V12 presentaven un consum de glutamina major que les no transfectades, característica que ha estat àmpliament relacionada amb les cèl·lules tumorals. La segona aproximació es va dur a terme mitjançant l'anàlisi isotopomèric o

incorporació de marca en aquest mateix glutamat acumulat de les cèl·lules transfectades HRas-V12. Així, varem observar que l'entrada de piruvat al cicle de Krebs es dona per acció de la piruvat deshidrogenasa (PDH) i no la piruvat carboxilasa (PC), posant de manifest que les cèl·lules tumorals necessiten consumir més glutamina per tal de reemplenar d'esquelets de carboni el cicle de Krebs i així subministrar prou oxalacetat que reaccioni amb l'increment d'acetil-CoA que s'està generant dins del mitocondri per l'acció de la PDH generant citrat, que està sortint contínuament del cicle per sintetitzar àcids grassos.

Totes aquests diferències, que inclouen un perfil altament biosintètic en particular un increment de la via oxidativa de la via de les pentoses fosfat i semblant al d'altres muntants en oncògens de la família Ras en el mateix codó 12 defineixen el perfil metabòlic de les cèl·lules HRas-V12 (Vizan *et al.*, 2005).

Els resultats permeten concloure que malgrat la mutació en HRas-V12 no altera el fenotip d'aquestes cèl·lules que segueixen essent molt similars a les controls pel que fa a la taxa de proliferació i consum de glucosa i producció de lactat, s'indueix una reorganització a nivell de la via de les pentoses fosfat augmentant la via oxidativa que és una de les característiques del metaboloma tumoral.

DISCUSSIÓ

El càncer és una malaltia multifactorial que progressa des d'una cèl·lula que perd la regulació de la seva proliferació cap a la malignitat, adquirint en aquest procés una sèrie de característiques que li aporten avantatges per sobreviure i envair nous teixits. Una part important d'aquesta sèrie de característiques adquirides són els canvis metabòlics que acompanyen la transformació i la progressió tumoral, l'estudi dels quals és altament complex ja que són diversos els processos que tenen lloc durant aquesta progressió i molts els tipus cel·lulars que juguen un paper en la mateixa. Per una altra banda, el perfil metabòlic és el punt final on s'integren multitud de senyals cel·lulars i és necessària una visió global de la xarxa metabòlica per poder entendre el comportament cel·lular, ja que aquesta presenta un gran nombre de connexions que li atorguen una gran plasticitat i això dificulta en major mesura el seu estudi.

La present Tesi Doctoral pretén aportar nova informació sobre com es reorganitza la xarxa metabòlica tumoral quan la cèl·lula pateix algunes perturbacions a nivell gènic i transcripcional. Per aconseguir aquest objectiu en els tres primers capítols i en l'últim s'ha fet ús de la metabolòmica, és a dir, s'ha intentat caracteritzar quin és el metabolisme de les cèl·lules en

les condicions d'estudi mitjançant anàlisis dels fluxos metabòlics o fluxòmica i dels nivells de diferents metabòlits.

En els tres primers capítols s'ha estudiat la importància dels enzims CDK4 i CDK6 en la progressió del cicle cel·lular a nivell molecular i metabòlic i un cop detallat el paper que juguen aquests enzims en la cèl·lula tumoral s'han fet esforços per sintetitzar i caracteritzar nous inhibidors específics d'aquestes dianes d'interès.

Més enllà de l'obvi concepte de metabolisme que ens fa pensar que tant els organismes complexos com les cèl·lules requereixen la conversió d'aliment en energia, cada vegada hi ha més evidència de l'existència d'una connexió directa entre el metabolisme i els programes de divisió o mort cel·lular. Els experiments de genòmica i proteòmica realitzats utilitzant diferents línies tumorals han revelat que la proliferació cel·lular està associada a l'alteració de múltiples xarxes metabòliques, incloent la del metabolisme de carbohidrats, aminoàcids i lípids (Pelicano *et al.*, 2006). La integració dels resultats obtinguts a partir d'aquestes *-òmiques* també ha portat a la conclusió de que la proliferació tumoral pot ser considerat-se com un sistema robust i, com a tal, pot arribar a ser extremadament fràgil davant pertorbacions inesperades (Kitano, 2004), el que proporciona noves estratègies per al desenvolupament de teràpies multidiana basades en inhibir simultàniament els punts febles que tot sistema robust presenta. En aquest sistema robust coexisteixen una desregulació del cicle cel·lular i una sòlida adaptació metabòlica capaç de sostenir els alts requeriments energètics i metabòlics necessaris per perpetuar una situació de descontrol proliferatiu i que, com a tal, pot arribar a ser extremadament fràgil davant la inhibició simultània dels complexos ciclina-CDKs i l'adaptació metabòlica. Així, els capítols 1, 2 i 3 d'aquesta memòria es van centrar en l'estudi de nous inhibidors específics per CDK4 i CDK6 i dels seus efectes a nivell metabòlic en cèl·lules tumorals, utilitzant cèl·lules HCT116 d'adenocarcinoma de còlon humà i un model de fibroblasts embriogènics de ratolí *knockout* per CDK4, CDK6 i CDK2. Aquest últim model cel·lular es va emprar per tal de relacionar els efectes metabòlics que estava induint un inhibidor dels enzims CDK4 i CDK6 (calceïna/AM) sobre les cèl·lules tumorals HCT116 amb les adaptacions metabòliques d'una línia cel·lular que té deletionats aquests enzims imprescindibles per tal de realitzar la transició G1/S.

Estudis recents indiquen que el desenvolupament d'inhibidors específics de CDK4 i CDK6 per desregular el cicle cel·lular és una estratègia farmacològica plausible per a la creació de nous agents antitumorals (Malumbres i Barbacid, 2006; Yu *et al.*, 2006). En el primer capítol es demostra que la calceïna, un petit compost no peptídic utilitzat com a marcador fluorescent en la investigació de la biologia cel·lular, s'uneix a CDK4 i CDK6 i inhibeix la seva activitat *in vitro* de forma selectiva en cèl·lules HCT116 amb una IC_{50} de 75 μ M o inferior per ambdues cinases. Per contra, la calceïna no inhibeix les activitats CDK1 o CDK2 a les concentracions assajades de fins a 500 μ M. Aplicada directament sobre cultius cel·lulars de cèl·lules HCT116,

la calceïna va provocar la inhibició de la fosforilació de pRb en la serina 780, una diana específica de fosforilació per CDK4 (Ezhevsky *et al.*, 2001) i va aturar les cèl·lules en la fase G1 del cicle cel·lular, provocant la seva apoptosi. La calceïna és un compost hidròfil que no pot creuar fàcilment la membrana plasmàtica, pel que es van haver de sintetitzar èsters de la molècula que poguessin travessar sense dificultat la membrana plasmàtica (acetoximetil-calceïna/AM i terbutoximetil-calceïna) i es va aconseguir amb ells una inhibició de la proliferació cel·lular a dosis molt més baixes (0,6 µM per la calceïna/AM). Tots aquests resultats demostren que la calceïna és un inhibidor específic de CDK4 i CDK6 i el seu descobriment podria ser important pel desenvolupament de noves teràpies antitumorals en aquells càncers que conservin el pRb inalterat. A més a més, s'ha demostrat que la calceïna és capaç de aturar la divisió cel·lular i matar les cèl·lules tumorals, amb el que el seu interès com a fàrmac en teràpies antitumorals es veu incrementat. Posteriorment, aprofitant aquesta capacitat d'inhibició de la calceïna es van avaluar les conseqüències a nivell metabòlic de la inhibició de CDK4 i CDK6 en la línia cel·lular HCT116, prestant especial atenció a si la cèl·lula tumoral contrarestavava l'efecte de l'inhibidor reestructurant la seva xarxa metabòlica. Estudis previs en el nostre grup de recerca han permès establir eines per dur a terme aquest tipus d'anàlisi, tant en línies cel·lulars no tumorals com tumorals (Boren *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2003; Vizan *et al.*, 2005). En combinar l'estudi bioquímic clàssic, de mesura dels intermediaris metabòlics i l'anàlisi enzimàtic utilitzant tècniques espectrofotomètriques, amb les tècniques de cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC/MS) que han revolucionat la metabolòmica i la fluxòmica en els últims anys, es va poder descriure el perfil metabòlic de les cèl·lules HCT116 pertorbades per la inhibició dels enzims CDK4 i CDK6. Per a estudiar el perfil metabòlic de les cèl·lules, igual que en el capítol 5, es va utilitzar com a font de carboni l'isotòpomer estable de la glucosa [1,2-¹³C₂]-D-glucosa, que permet la monitorització de les principals vies de metabolització de la glucosa (Boros *et al.*, 2002). La utilització combinada d'aquestes tècniques permet analitzar de forma precisa els diversos fluxos metabòlics implicats en el metabolisme central de la glucosa, entre els quals destaquen els fluxos glicolític i de les vies oxidativa i no oxidativa de la PPP. Els resultats obtinguts van demostrar que quant més gran és la concentració de calceïna/AM, major és el desequilibri de la ruta de les pentoses fosfat en favor de la via no oxidativa. Mitjançant l'anàlisi del fenotip metabòlic es va deduir que les dosis més eficients de calceïna/AM en la inhibició del creixement de la cèl·lula tumoral donaven lloc a un desequilibri més dramàtic entre les vies oxidativa i no oxidativa de la PPP.

Per altra banda, utilitzant el model de fibroblasts embriònics de ratolí deficientes en les proteïnes CDK4, CDK6 i CDK2 i es va comprovar que la PPP era menys utilitzada pels fibroblasts *knockout* en CDK4, CDK6 i CDK2 (TKO) i que aquests presentaven un gran desequilibri entre les vies oxidativa i no oxidativa de la PPP. Aquests resultats confirmen que

les alteracions metabòliques induïdes per la calceïna/AM en HCT116 es deuen a la inhibició específica sobre les activitats dels enzims CDK4 i CDK6, reafirmant la nostra hipòtesi de que la inhibició de CDK4 i CDK6 és la responsable de la pertorbació del desbalanç de les branques oxidativa i no oxidativa de la PPP. El balanç entre les branques oxidativa i no oxidativa de la PPP no és constant durant el cicle cel·lular i la contribució de la branca oxidativa de la PPP es veu incrementada quan el cicle està progressant a través de la fase S per tal de sintetitzar ribosa-5-fosfat (Vizan *et al.*, 2009). En aquest sentit, el tractament de les cèl·lules tumorals HCT116 amb calceïna/AM així com la deleció dels enzims CDK4, CDK6 i CDK2 fan que el cicle progressi més lentament i que la síntesi de pentoses fosfat disminueixi. A més, la via oxidativa del cicle de les pentoses fosfat es relaciona directament amb la producció cel·lular de NADPH i, per tant, amb el seu sistema redox. El perfil metabòlic observat, tant amb el tractament amb calceïna/AM com el observat en els TKO, apunta a una desacceleració de la majoria de les activitats biosintètiques, especialment les dirigides a la síntesi d'àcids grassos de la membrana. de mode que les necessitats de poder reductor a la cèl·lula minven i per tal d'evitar una acumulació perjudicial de poder reductor, la cèl·lula reprimeix les vies encarregades de la seva producció, en particular aquelles especialitzades en el NADPH, com és el cas de la via oxidativa de la ruta de les pentoses fosfat. No obstant això, tenint en compte les elevades concentracions de radicals d'oxigen (ROS) existents a la cèl·lula tumoral (Kong *et al.*, 2000; Mates i Sanchez-Jimenez, 2000), aquesta baixada en l'activitat de la via oxidativa de les pentoses fosfat podria comprometre la viabilitat cel·lular i desencadenar l'apoptosi, ja que està indirectament involucrada amb els sistemes antioxidants de defensa endògens de la cèl·lula (Banki *et al.*, 1996). Aquests resultats van confirmar que el desequilibri forçat de les rutes de síntesi de pentoses fosfat cap a la via oxidativa en cèl·lules tumorals pot ser pertorbat i usat com a taló d'Aquil·les per tal de contrarestar la robusta adaptació metabòlica de les cèl·lules tumorals. La inhibició dels enzims CDK4 i CDK6 o l'absència dels mateixos permet desbalancejar l'equilibri entre les branques oxidativa i no oxidativa i es una bona estratègia antitumoral i eficaç per tal d'atacar la xarxa metabòlica tumoral ja que permet restaurar el balanç oxidatiu/no oxidatiu existent en la cèl·lula no tumoral. En base a la hipòtesi anteriorment descrita de que la proliferació tumoral es pot veure com un sistema robust en que coexisteix una desregulació del cicle cel·lular juntament amb una sòlida adaptació metabòlica, en un futur s'hauria de plantejar el desenvolupament i validació d'una nova estratègia antitumoral multidiana dirigida a impedir la progressió del cicle cel·lular i la necessària adaptació metabòlica que suporta la proliferació tumoral. Aquesta es basaria en inhibir CDK4 i CDK6 amb inhibidors específics, i la robusta adaptació metabòlica necessària per sostenir els alts requeriments energètics i metabòlics que es necessiten per a perpetuar la situació de descontrol proliferatiu mitjançant l'ús d'inhibidors d'enzims que catalitzen etapes clau d'aquest procés proliferatiu i que a nivell metabòlic pertorben l'entramat metabòlic tumoral.

La falta d'inhibidors específics per a CDK4 i CDK6 fa urgent la necessitat de dissenyar compostos adequats per inhibir la seva activitat i que puguin ser utilitzats com a teràpia antitumoral. Per això, el capítol segon representa una aproximació per millorar els inhibidors fins ara coneguts pels enzims CDK4 i CDK6. L'estratègia seguida va ser buscar compostos que mimetitzessin l'inhibidor natural p16^{INK4a}, per tal de que s'ajustessin al farmacòfor trobat pel grup del Dr. Jaime Rubio. Aquestes estratègies van donar lloc a 11 famílies d'estructures que presentaven homologia amb el farmacòfor d'interès. D'entre ells varem testar 8 compostos en assajos cinasa *in vitro* per tal de veure la seva acció inhibidora sobre una de les dianes d'interès, CDK6. Els resultats d'aquests assajos van permetre descartar 5 d'aquests compostos i amb els tres restants es va fer una àmplia caracterització de la seva capacitat antiproliferativa en diverses línies tumorals. Tots tres compostos (D, F i J) presentaven una IC₅₀ en assajos cinasa de 25, 10 i 10 µM, respectivament i dos d'ells, el D i el F, eren selectius de les cinases diana CDK4 i CDK6. Els assajos de viabilitat van mostrar que els compostos tenien una IC₅₀ sobre cèl·lules tumorals d'aproximadament 1mM, pel que es va creure necessària la síntesi d'èsters dels mateixos per tal de permetre la seva entrada a la cèl·lula. A més a més, els compostos F i J presentaven una IC₅₀ menor per a les cèl·lules tumorals que per cèl·lules normals i tots tres compostos afectaven en menor grau la viabilitat cel·lular en línies tumorals HER2 negatives o que tenien el pRb constitutivament actiu.

Tot i que és necessari seguir treballant per tal de millorar l'especificitat dels compostos cap de sèrie identificats en aquesta Tesi Doctoral, l'estratègia descrita en el capítol 2 és una estratègia innovadora amb la que es poden dissenyar compostos selectius i inhibidors de CDK4 i CDK6. També ha quedat demostrat en aquest treball, que es requereix de la introducció de modificacions estructurals en alguns dels substituents d'aquests compostos per tal de millorar la seva interacció amb les dianes d'interès i la seva entrada a la cèl·lula.

Per tal de disminuir les elevades IC₅₀ sobre les diferents línies tumorals assajades, en el capítol 3, en col·laboració amb el grup de la Dra. Dolors Pujol de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona es van fer lactones disubstituïdes amb diferents radicals, més o menys polars i en diferents posicions per tal de testar-los i comprovar si les millores estructurals corresponien amb millores d'activitat. La idea va ser crear una família de compostos que fossin inhibidors específics més eficients de CDK4 i CDK6. Així, el disseny d'inhibidors específics per CDK4 i CDK6 es considera actualment un repte per tal d'atacar la progressió tumoral en aquells càncers que tinguin alterat el p16^{INK4a} i que mantinguin inalterat pRb i així aconseguir una quimioteràpia molt més efectiva i menys inespecífica.

Els inhibidors comentats anteriorment, són molt prometedors no solament pels seus efectes a nivell molecular, sinó també pels efectes estudiats en el primer capítol a nivell metabòlic. Donat que les adaptacions metabòliques adquirides per la cèl·lula tumoral li

confereixen un perfil molt robust, l'atac d'aquest perfil metabòlic és una estratègia estudiada actualment per tal de combatre el tumor des de diferents vessants. En els últims anys s'ha posat de manifest que és molt útil estudiar les malalties complexes combinant els coneixements obtinguts a partir de diferents camps d'estudi, com la genòmica, la proteòmica o la metabolòmica. Diferents mutacions en oncògens d'una mateixa família de gens poden arribar a desenvolupar tumors amb perfils metabòlics totalment diferenciats, amb el que cada un d'aquests tipus de tumors hauria de rebre un tractament terapèutic específic i d'acord amb les seves característiques particulars. Així, des d'una perspectiva metabolòmica en aquesta Tesi s'ha estudiat el perfil metabòlic associat a una mutació puntual en l'oncogen *HRas*, perquè aquest perfil específic pugui ésser diana de tractaments quimioterapèutics, amb o sense combinació d'inhibidors de l'activitat dels enzims CDK4 i CDK6.

Amb la finalitat de caracteritzar el metabolisme central del carboni en les cèl·lules transformants *HRas-V12* es van fer ús com s'ha esmentat anteriorment, del traçador [1,2, $^{13}\text{C}_2$]-D-glucosa i així mitjançant diferents tècniques, es va dibuixar el perfil metabòlic adquirit per les cèl·lules transfectades amb el gen *HRas* amb una mutació puntual en el codó 12. Els resultats mostren com les cèl·lules *HRas-V12* creixen i es dupliquen a una velocitat similar a les cèl·lules control NIH-3T3. Així mateix el consum de glucosa i la producció de lactat no difereix gaire entre les dues línies estudiades, fet que indica que ambdues línies tenen un perfil glicolític bastant semblant. S'ha de tenir en compte que la mutació en *HRas* s'ha descrit bibliogràficament com menys transformant que les mutacions en *KRas* (Keller *et al.*, 2007). A més a més, les dues línies cel·lulars d'estudi (NIH-3T3 i *HRas-V12*) són cèl·lules immortalitzades, pel que el seu comportament metabòlic pot tenir algunes adaptacions comunes que permetin la proliferació cel·lular. D'altra banda, donat que hem utilitzat eines com la metabolòmica basada en la utilització de traçadors, hem pogut estudiar la xarxa metabòlica de la glucosa de manera integrada i analitzar els canvis a nivell de fluxos a través de les principals vies del metabolisme central induïts per la mutació *HRas-V12*. Els resultats mostren en primer lloc que tot i que l'ús de la PPP és semblant en les dues línies cel·lulars, el desbalanç en l'ús de les branques oxidativa i no oxidativa de la PPP, mostra, un cop més, com la cèl·lula transformant depèn molt més de la branca oxidativa i del poder reductor que se'n deriva per tal de sintetitzar àcids grassos. Per una altra banda, l'ús que fan les línies cel·lulars de la glutamina i glutamat difereix entre ambdues línies degut a que les cèl·lules mutades requereixen de gran quantitat d'intermediaris del cicle dels àcids tricarbòxílics que no li són subministrats per l'enzim anabòlic piruvat carboxilasa (PC) i a més, necessita de l'alliberament d'amoni en la degradació de glutamina per tal de sintetitzar nucleòtids. Curiosament, no hem detectat producció de glutamat per part de la línia control NIH-3T3 i per tant no es poden treure conclusions sobre l'entrada de piruvat a la mitocondria en aquesta línia control. Per altra banda,

l'enzim piruvat cinasa (PK) té un paper molt important en la regulació del metabolisme (Mazurek, 2007; Mazurek *et al.*, 2005). En aquest estudi s'ha vist que l'enzim es presenta en forma tetramèrica en el cas de les cèl·lules mutades. Aquesta forma tetramèrica posseeix més activitat i té més afinitat pel fosfoenolpiruvat que la forma dimèrica. Aquesta conformació de l'enzim de la part baixa de la glicòlisi no permet una acumulació d'intermediaris glicolítics, de manera que l'activitat de la transcetolasa es veu disminuïda

A més a més, el perfil metabòlic de les cèl·lules mutades és més biosintètic que en el control, essent similar al perfil descrit per les cèl·lules de ratolí transfectades amb la mutació en *KRas* (Vizan *et al.*, 2005) que, tot i no ser més proliferants, eren molt més resistents a l'apoptosi, el que els hi conferia el seu potencial transformant. La resistència a l'apoptosi pot ser generada per l'alta activitat de l'enzim principal de la via oxidativa de la PPP, la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH) que és capaç de generar poder reductor i així permet combatre el radicals lliures esdevinguts per l'alta activitat mitocondrial. Tot i que no hem comprovat aquesta resistència a l'apoptosi, diversos estudis bibliogràfics demostren l'associació entre els alts nivells d'activitat de G6PDH i la resistència a l'apoptosi (Li *et al.*, 2009). Així doncs, aquest estudi d'una mutació puntual en la isoforma *HRas* mostra un cop més la metabolòmica com una eina fonamental per tal de descriure les característiques metabòliques diferencials associades a un fenotip genètic específic i que actualment estan essent explotades pel diagnòstic tumoral (Walenta *et al.*, 2004), incorporant-se a protocols clínics. El tractament del càncer sembla ser que cada cop més s'encamina cap a teràpies més personalitzades i específiques segons el transfons genètic del pacient. Per tant, el desenvolupament i estandardització de les tecnologies per l'anàlisi del metaboloma de manera que siguin suficientment accessibles i ràpides podria permetre la seva incorporació en protocols clínics i ajudar al disseny d'estratègies combinades per la inhibició de la transformació i progressió tumoral (van der Greef *et al.*, 2006).

Així doncs, no s'ha de perdre de vista que la cèl·lula tumoral és un *tot* capaç de sobreviure en les pitjors de les circumstàncies, pel que actualment moltes de les teràpies existents fallen degut a la resistència que experimenta la cèl·lula tumoral o a la reestructuració de les seves xarxes de senyalització i metabòliques per tal de contrarestar la pertorbació. És per això que la direcció del disseny de noves teràpies va encaminada avui en dia a la combinació de diferents estratègies per tal d'abordar el tumor des de diferents fronts i minvar les dosis de cadascun dels tractaments i així disminuir els efectes secundaris. En aquest sentit, en el capítol 4, s'ha estudiat l'efecte de l'àcid metilselenínic en les cèl·lules de carcinoma de pulmó A-549. Els seus efectes metabòlics ja han estat descrits per la Dra. Teresa Fan (Universitat de Louisville) i en aquest capítol es vol esbrinar quins efectes es donen a nivell molecular que poden ser correlacionats amb els canvis en el perfil metabòlic. Múltiples estudis ja havien apuntat que el seleni, un agent incorporat en algunes dietes, i que actualment participa en

assajos clínics per tal de verificar els seus efectes antitumorals, afecta a la via de PI3K. Els seus efectes havien estat descrits principalment en càncer de pròstata, de còlon i en cèl·lules metastàtiques, mostrant que els efectors d'aquesta via estan pertorbats per aquest tractament i que Akt juga un rol molt important en la seva acció. Sense perdre de vista aquest efecte, varem estudiar un dels efectors d'aquesta via, els factors de transcripció FOXO, que actualment estan despertant molt d'interès en teràpies antitumorals degut al paper que juguen en multitud de processos cel·lulars relacionats amb la progressió tumoral. Els resultats van mostrar que FOXO3a intervenia en els efectes antitumorals de l'àcid metilselenínic de parada de cicle cel·lular, apoptosi i detoxificació en les cèl·lules humanes de carcinoma de pulmó A-549. El factor de transcripció FOXO3a és translocat al nucli després d'1.5h de tractament amb l'àcid metilselenínic i aquest efecte perdura en el temps durant 24h podent-se descriure com un esdeveniment primerenc de molts dels processos cel·lulars i metabòlics esdevinguts posteriorment. Així, l'àcid metilselenínic és un agent prometedor per tal de translocar FOXO3a al nucli i millorar així la sensibilitat cel·lular front a d'altres drogues utilitzades actualment com el cisplatí. Per tant es posa de manifest la importància de la via PI3K i de l'ús d'inhibidors de la mateixa en teràpies combinades per tal de millorar la resistència de molts tractaments ja utilitzats a la clínica.

CONCLUSIONS

1. La deleció de CDK4, CDK6 i CDK2 en fibroblasts embriogènics de ratolí indueix un perfil metabòlic molt similar al obtingut en inhibir CDK4 i CDK6 amb un inhibidor que mimetitzí l'acció de p16^{INK4a}. La identificació d'aquesta empremta metabòlica proporciona informació molt útil pel disseny de teràpies combinades que impedeixin la progressió del cicle cel·lular i l'adaptació metabòlica tumoral.
2. La caracterització de la selectivitat d'acció sobre CDK4 i CDK6 i de l'efecte antiproliferatiu en diferents línies cel·lulars de compostos potencialment inhibidors de CDK4 i CDK6 identificats mitjançant l'ús de dinàmiques moleculars proporciona informació útil pel disseny racional de nous fàrmacs antitumorals que siguin útils pel tractament de tumors deficients en p16^{INK4a} i amb pRb inalterat.

3. Una nova família de lactones disubstituídes han estat caracteritzades com a potencials agents antitumorals i identificades com a inhibidors de CDK4 i CDK6. La relació de la seva estructura-activitat proporciona informació molt valuosa pel disseny de nous inhibidors d'aquests enzims.

4. L'àcid metilselenínic (MSeA) és capaç d'induir la translocació de FOXO al nucli en menys de 2 hores. La localització nuclear del factor de transcripció és manté a les 24 hores de tractament amb MSeA. Aquest nou mecanisme d'acció del MSeA justifica l'aturada en la fase G1 del cicle cel·lular, la inducció d'apoptosi i la disminució de ROS observades en cèl·lules de carcinoma de pulmó humà A-549 a les 24, 48 i 72 hores de tractament amb aquest compost.

5. La transfecció de fibroblasts de ratolí amb l'oncogen *HRas-V12* indueix un perfil metabòlic altament biosintètic afectant principalment a la via de les pentoses fosfat i la glutaminòlisi.



BIBLIOGRAFIA

- Adams, J.M., i Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science (New York, NY)* **281**, 1322-1326.
- Adjei, A.A. (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **93**, 1062-1074.
- Agus, D.B., Bunn, P.A., Jr., Franklin, W., Garcia, M., i Ozols, R.F. (2000). HER-2/neu as a therapeutic target in non-small cell lung cancer, prostate cancer, and ovarian cancer. *Semin Oncol* **27**, 53-63; discussion 92-100.
- Ahmedin, J., Rebecca, S., Elizabeth, W., Yongping, H., Jiaquan, X., i Michael, J.T. (2009). Cancer Statistics, 2009, pp. 225-249.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., i Watson, J.D. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (New York, Garland Publishing).
- Allen, L.F., Lenehan, P.F., Eiseman, I.A., Elliott, W.L., i Fry, D.W. (2002). Potential benefits of the irreversible pan-erbB inhibitor, CI-1033, in the treatment of breast cancer. *Semin Oncol* **29**, 11-21.
- Aoki, M., Jiang, H., i Vogt, P.K. (2004). Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13613-13617.
- Arends, J.W. (2000). Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* **190**, 412-416.
- Ballinger, A.B., i Anggiansah, C. (2007). Colorectal cancer. *Bmj* **335**, 715-718.
- Banki, K., Hutter, E., Colombo, E., Gonchoroff, N.J., i Perl, A. (1996). Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression. *The Journal of biological chemistry* **271**, 32994-33001.
- Baselga, J., i Swain, S.M. (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* **9**, 463-475.
- Behera, D., i Balamugesh, T. (2004). Lung cancer in India. *Indian J Chest Dis Allied Sci* **46**, 269-281.
- Beral, V., Banks, E., Reeves, G., i Wallis, M. (1997). Hormone replacement therapy and high incidence of breast cancer between mammographic screens. *Lancet* **349**, 1103-1104.
- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L., i Kaldis, P. (2003). Cdk2 Knockout Mice Are Viable. *Current Biology* **13**, 1775-1785.
- Bertout, J.A., Patel, S.A., i Simon, M.C. (2008). The impact of O2 availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 967-975.
- Biggs, W.H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., i Arden, K.C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7421-7426.
- Blain, S.W. (2008). Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **7**, 892-898.
- Blain, S.W., Scher, H.I., Cordon-Cardo, C., i Koff, A. (2003). p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* **3**, 111-115.
- Bockstaele, L., Coulonval, K., Kookan, H., Paternot, S., i Roger, P.P. (2006). Regulation of CDK4. *Cell Div* **1**, 25.
- Boettner, B., i Van Aelst, L. (2002). The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* **286**, 155-174.
- Boren, J., Lee, W.N., Bassilian, S., Centelles, J.J., Lim, S., Ahmed, S., Boros, L.G., i Cascante, M. (2003). The stable isotope-based dynamic metabolic profile of butyrate-induced HT29 cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 28395-28402.
- Boren, J., Montoya, A.R., de Atauri, P., Comin-Anduix, B., Cortes, A., Centelles, J.J., Frederiks, W.M., Van Noorden, C.J., i Cascante, M. (2002). Metabolic control analysis aimed at the ribose synthesis pathways of tumor cells: a new strategy for antitumor drug development. *Mol Biol Rep* **29**, 7-12.
- Boris, J.C., James, G.G., Sunil, N., i Leonard, P.F. (2007). Signaling by estrogens, pp. 610-617.
- Boros, L.G., Brandes, J.L., Yusuf, F.I., Cascante, M., Williams, R.D., i Schirmer, W.J. (1998). Inhibition of the oxidative and nonoxidative pentose phosphate pathways by somatostatin: a possible mechanism of antitumor action. *Medical Hypotheses* **50**, 501-506.

- Boros, L.G., Cascante, M., i Paul Lee, W.-N. (2002). Metabolic profiling of cell growth and death in cancer: applications in drug discovery. *Drug Discovery Today* **7**, 364-372.
- Boros, L.G., Puigjaner, J., Cascante, M., Lee, W.N., Brandes, J.L., Bassilian, S., Yusuf, F.I., Williams, R.D., Muscarella, P., Melvin, W.S., *et al.* (1997). Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res* **57**, 4242-4248.
- Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**, 4682-4689.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., i Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., *et al.* (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science (New York, NY)* **303**, 2011-2015.
- Bryan, T.M., i Cech, T.R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 318-324.
- Calnan, D.R., i Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Oncogene* **27**, 2276-2288.
- Calvo, B.F., Levine, A.M., Marcos, M., Collins, Q.F., Iacocca, M.V., Caskey, L.S., Gregory, C.W., Lin, Y., Whang, Y.E., Earp, H.S., *et al.* (2003). Human epidermal receptor-2 expression in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 1087-1097.
- Campbell, P.M., i Der, C.J. (2004). Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* **14**, 105-114.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., i Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science (New York, NY)* **282**, 1318-1321.
- Cascante, M., Boros, L.G., Comin-Anduix, B., de Atauri, P., Centelles, J.J., i Lee, P.W. (2002). Metabolic control analysis in drug discovery and disease. *Nat Biotechnol* **20**, 243-249.
- Cascante, M., Centelles, J.J., Veech, R.L., Lee, W.N., i Boros, L.G. (2000). Role of thiamin (vitamin B-1) and transketolase in tumor cell proliferation. *Nutr Cancer* **36**, 150-154.
- Catelinois, O., Rogel, A., Laurier, D., Billon, S., Hemon, D., Verger, P., i Tirmarche, M. (2006). Lung cancer attributable to indoor radon exposure in france: impact of the risk models and uncertainty analysis. *Environ Health Perspect* **114**, 1361-1366.
- Clegg, A., Scott, D.A., Hewitson, P., Sidhu, M., i Waugh, N. (2002). Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Thorax* **57**, 20-28.
- Coleman, M.L., Marshall, C.J., i Olson, M.F. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 355-366.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., i Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073-1081.
- Comin-Anduix, B., Agell, N., Bachs, O., Ovadi, J., i Cascante, M. (2001). A new bis-indole, KARs, induces selective M arrest with specific spindle aberration in neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Mol Pharmacol* **60**, 1235-1242.
- Costello, L., i Franklin, R. (2006). The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Molecular Cancer* **5**, 17.
- Coy, J.F., Dressler, D., Wilde, J., i Schubert, P. (2005). Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin Lab* **51**, 257-273.
- Chandramouli, A., Shi, J., Feng, Y., Holubec, H., M.Shanas, R., Bhattacharyya, A.K., Zheng, W., i Nelson, M.A. (2007). Haploinsufficiency of the cdc2l gene contributes to skin cancer development in mice. *Carcinogenesis* **28**, 2028-2035.

- Chau, I., i Cunningham, D. (2009). Treatment in advanced colorectal cancer: what, when and how? *Br J Cancer* **100**, 1704-1719.
- Chen, Z., Zhang, H., Lu, W., i Huang, P. (2009). Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochimica et biophysica acta* **1787**, 553-560.
- Chiaradonna, F., Gaglio, D., Vanoni, M., i Alberghina, L. (2006). Expression of transforming K-Ras oncogene affects mitochondrial function and morphology in mouse fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* **1757**, 1338-1356.
- Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., i Cantley, L.C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452**, 230-233.
- Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature* **441**, 444-450.
- Damiens, E., Baratte, B., Marie, D., Eisenbrand, G., i Meijer, L. (2001). Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene* **20**, 3786-3797.
- Dang, C.V., i Samenza, G.L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends BioSci* **24**, 68 - 72.
- Dangle, P.P., Zaharieva, B., Jia, H., i Pohar, K.S. (2009). Ras-MAPK pathway as a therapeutic target in cancer--emphasis on bladder cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **4**, 125-136.
- Dansen, T.B., i Burgering, B.M. (2008). Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins. *Trends Cell Biol* **18**, 421-429.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., i Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241.
- Davidsson, J., Paulsson, K., i Johansson, B. (2005). Multicolor fluorescence in situ hybridization characterization of cytogenetically polyclonal hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* **163**, 180-183.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., i Thompson, C.B. (2008a). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* **7**, 11-20.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., i Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19345-19350.
- Deberardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., i Thompson, C.B. (2008b). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev.*
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., i Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science (New York, NY)* **278**, 687-689.
- DelSal, G., Loda, M., i Pagano, M. (1996). Cell cycle and cancer: critical events at the G1 restriction point. *Crit Rev Oncog* **7**, 127-142.
- Dench, E.L. (2009). Give me a break: How telomeres suppress the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*.
- Dhanasekaran, K., Sallekoppal, B.B.P., Jayasha, S., Shipra, A., i Tapas, K.K. (2010). Biology of Aurora A kinase: Implications in cancer manifestation and therapy, pp. n/a.
- Dhanasekaran, N., i Premkumar Reddy, E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **17**, 1447-1455.
- Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W., Thomas, N.S., Lammers, J.W., Koenderman, L., i Coffey, P.J. (2002). FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol* **156**, 531-542.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N.S., Lam, E.W., Burgering, B.M., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L., *et al.* (2000). Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Molecular and cellular biology* **20**, 9138-9148.
- Downward, J. (1997). Cell cycle: routine role for Ras. *Curr Biol* **7**, R258-260.

- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 11-22.
- Drosten, M., Dhawahir, A., Sum, E.Y.M., Urosevic, J., Lechuga, C.G., Esteban, L.M., Castellano, E., Guerra, C., Santos, E., i Barbacid, M. Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *EMBO J advance online publication*.
- Edamatsu, H., Gau, C.L., Nemoto, T., Guo, L., i Tamanoi, F. (2000). Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene* **19**, 3059-3068.
- Eigenbrodt, E., Fister, P., i Reinacher, M. (1985). *New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells*. In Regulation of Carbohydrate Metabolism, R. Beitner, ed. (Boca Raton, Florida, U.S.A., CRC Press Inc.), pp. 141-179.
- Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., *et al.* (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* **64**, 3892-3899.
- Elliot, W.H., i Elliot, D.C. (2005). *Biochemistry and Molecular Biology* (Oxford, Oxford University Press).
- Engel, R.H., i Evens, A.M. (2006). Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci* **11**, 300-312.
- Engelbrecht, A.M., Toit-Kohn, J.L., Ellis, B., Thomas, M., Nell, T., i Smith, R. (2008). Differential induction of apoptosis and inhibition of the PI3-kinase pathway by saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in a colon cancer cell model. *Apoptosis* **13**, 1368-1377.
- Engels, E.A., Wu, X., Gu, J., Dong, Q., Liu, J., i Spitz, M.R. (2007). Systematic evaluation of genetic variants in the inflammation pathway and risk of lung cancer. *Cancer Res* **67**, 6520-6527.
- Ezhevsky, S.A., Ho, A., Becker-Hapak, M., Davis, P.K., i Dowdy, S.F. (2001). Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Molecular and cellular biology* **21**, 4773-4784.
- Fantin, V.R., St-Pierre, J., i Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **9**, 425-434.
- Fedi, S., Tola, E., Moenne-Loccoz, Y., Dowling, D.N., Smith, L.M., i O'Gara, F. (1997). Evidence for signaling between the phytopathogenic fungus *Pythium ultimum* and *Pseudomonas fluorescens* F113: *P. ultimum* represses the expression of genes in *P. fluorescens* F113, resulting in altered ecological fitness. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4261-4266.
- Fell, D.A. (1997). *Understanding the Control of Metabolism* (London, Portland Press Ltd).
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* **48**, 155-171.
- Finn, R.S., Dering, J., Conklin, D., Kalous, O., Cohen, D.J., Desai, A.J., Ginther, C., Atefi, M., Chen, I., Fowst, C., *et al.* (2009). PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res* **11**, R77.
- Fischer, P.M., i Gianella-Borradori, A. (2005). Recent progress in the discovery and development of cyclin-dependent kinase inhibitors, pp. 457-477.
- Flores-Resendiz, D., Castellanos-Juarez, E., i Benitez-Bribiesca, L. (2009). [Proteases in cancer progression]. *Gac Med Mex* **145**, 131-142.
- Foster, J.S., Henley, D.C., Bukovsky, A., Seth, P., i Wimalasena, J. (2001). Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. *Molecular and cellular biology* **21**, 794-810.
- Foulkes, W.D. (2008). Inherited Susceptibility to Common Cancers, pp. 2143-2153.
- Frescas, D., Valenti, L., i Accili, D. (2005). Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 20589-20595.

- Freund, C., Mirabel, L., Annane, K., i Mathelin, C. (2005). Allaitement maternel et cancer du sein. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **33**, 739-744.
- Frezza, C., i Gottlieb, E. (2009). Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol* **19**, 4-11.
- Friday, B.B., i Adjei, A.A. (2005). K-ras as a target for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1756**, 127-144.
- Fridman, A.L., i Tainsky, M.A. (2008). Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene* **27**, 5975-5987.
- Gambhir, S.S. (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* **2**, 683-693.
- Ganther, H.E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**, 1657-1666.
- Garber, K. (2006). Energy Deregulation: Licensing Tumors to Grow. *Science (New York, NY)* **312**, 1158-1159.
- Garrett, M.D., i Fattaey, A. (1999). CDK inhibition and cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 104-111.
- Gatenby, R.A., i Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**, 891-899.
- Gatenby, R.A., i Gillies, R.J. (2008). A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**, 56-61.
- Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J., *et al.* (2009). Apoptosis and Cancer: Mutations within Caspase Genes. *Journal of medical genetics*.
- Gilley, J., Coffey, P.J., i Ham, J. (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol* **162**, 613-622.
- Glass, A.G., Lacey, J.V., Jr., Carreon, J.D., i Hoover, R.N. (2007). Breast cancer incidence, 1980-2006: combined roles of menopausal hormone therapy, screening mammography, and estrogen receptor status. *Journal of the National Cancer Institute* **99**, 1152-1161.
- Goldenberg, M.M. (1999). Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther* **21**, 309-318.
- Goodrich, D.W. (2006). The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* **25**, 5233-5243.
- Gordan, J.D., Thompson, C.B., i Simon, M.C. (2007). HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. *Cancer Cell* **12**, 108-113.
- Gout, S., i Huot, J. (2008). Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron* **1**, 69-83.
- Greenwald, P., Anderson, D., Nelson, S.A., i Taylor, P.R. (2007). Clinical trials of vitamin and mineral supplements for cancer prevention. *Am J Clin Nutr* **85**, 314S-317S.
- Greer, E.L., i Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**, 7410-7425.
- Hahn, W.C., i Weinberg, R.A. (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347**, 1593-1603.
- Hall, M., i Peters, G. (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* **68**, 67-108.
- Hamilton, R. (2009). Genetics: Breast Cancer as an Exemplar. *Nursing Clinics of North America* **44**, 327-338.
- Hanahan, D., i Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hankinson, S., Colditz, G., i Willett, W. (2004). Towards an integrated model for breast cancer etiology: The lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones, pp. 213 - 218.
- Harris, C.C. (1996). COMMENTARY: p53 Tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* **17**, 1187-1198.
- Hartwell, L.H., i Kastan, M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science (New York, NY)* **266**, 1821-1828.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.

- Hery, C., Ferlay, J., Boniol, M., i Autier, P. (2008). Changes in breast cancer incidence and mortality in middle-aged and elderly women in 28 countries with Caucasian majority populations. *Ann Oncol* **19**, 1009-1018.
- Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M., Franklin, W.A., Veve, R., Chen, L., Helfrich, B., Zeng, C., Baron, A., i Bunn, P.A., Jr. (2002). Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer* **86**, 1449-1456.
- Ho, A., i Dowdy, S.F. (2002). Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**, 47-52.
- Hsu, P.P., i Sabatini, D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**, 703-707.
- Hu, L.H., Yang, J.H., Zhang, D.T., Zhang, S., Wang, L., Cai, P.C., Zheng, J.F., i Huang, J.S. (2007). The TKTL1 gene influences total transketolase activity and cell proliferation in human colon cancer LoVo cells. *Anticancer Drugs* **18**, 427-433.
- Hung, M.C., i Lau, Y.K. (1999). Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol* **26**, 51-59.
- Hunter, T., i Pines, J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**, 573-582.
- Hynes, N.E., i Stern, D.F. (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1198**, 165-184.
- James, M.K., Ray, A., Leznova, D., i Blain, S.W. (2008). Differential Modification of p27Kip1 Controls Its Cyclin D-cdk4 Inhibitory Activity, pp. 498-510.
- Janssen, K.P. (2003). Murine models of colorectal cancer: studying the role of oncogenic K-ras. *Cell Mol Life Sci* **60**, 495-506.
- Janssen, K.P., Abal, M., El Marjou, F., Louvard, D., i Robine, S. (2005). Mouse models of K-ras-initiated carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1756**, 145-154.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J., i Thun, M.J. (2005). Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* **55**, 10-30.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., i Thun, M.J. (2008). Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* **58**, 71-96.
- Jin, S., DiPaola, R.S., Mathew, R., i White, E. (2007). Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci* **120**, 379-383.
- Kastan, M.B., i Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-323.
- Keller, J.W., Franklin, J.L., Graves-Deal, R., Friedman, D.B., Whitwell, C.W., i Coffey, R.J. (2007). Oncogenic KRAS provides a uniquely powerful and variable oncogenic contribution among RAS family members in the colonic epithelium. *J Cell Physiol* **210**, 740-749.
- Kenyon, C. (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* **120**, 449-460.
- Kikuchi, H., Pino, M.S., Zeng, M., Shirasawa, S., i Chung, D.C. (2009). Oncogenic KRAS and BRAF differentially regulate hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in colon cancer. *Cancer Res* **69**, 8499-8506.
- Kim, J.-w., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., i Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism* **3**, 177-185.
- Kim, K.H., Rodriguez, A.M., Carrico, P.M., i Melendez, J.A. (2001). Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Antioxid Redox Signal* **3**, 361-373.
- Kitamura, Y.I., Kitamura, T., Kruse, J.P., Raum, J.C., Stein, R., Gu, W., i Accili, D. (2005). FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* **2**, 153-163.
- Kitano, H. (2004). Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 227-235.
- Kitisin, K., Ganesan, N., Tang, Y., Jogunoori, W., Volpe, E.A., Kim, S.S., Katuri, V., Kallakury, B., Pishvaian, M., Albanese, C., et al. (2007). Disruption of transforming growth factor-beta signaling through beta-spectrin ELF leads to hepatocellular cancer through cyclin D1 activation. *Oncogene* **26**, 7103-7110.

- Kitisin, K., i Mishra, L. (2006). Molecular biology of colorectal cancer: new targets. *Semin Oncol* **33**, S14-23.
- Knowles, L.M., Yang, C., Osterman, A., i Smith, J.W. (2008). Inhibition of fatty-acid synthase induces caspase-8-mediated tumor cell apoptosis by up-regulating DDIT4. *The Journal of biological chemistry* **283**, 31378-31384.
- Koepfen, H.K., Wright, B.D., Burt, A.D., Quirke, P., McNicol, A.M., Dybdal, N.O., Sliwkowski, M.X., i Hillan, K.J. (2001). Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology* **38**, 96-104.
- Kohrenhagen, N., Voelker, H.U., Schmidt, M., Kapp, M., Krockenberger, M., Frambach, T., Dietl, J., i Kammerer, U. (2008). Expression of transketolase-like 1 (TKTL1) and p-Akt correlates with the progression of cervical neoplasia. *J Obstet Gynaecol Res* **34**, 293-300.
- Kondoh, H., Leonart, M.E., Gil, J., Wang, J., Degan, P., Peters, G., Martinez, D., Carnero, A., i Beach, D. (2005). Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* **65**, 177-185.
- Kong, Q., Beel, J.A., i Lillehei, K.O. (2000). A threshold concept for cancer therapy. *Med Hypotheses* **55**, 29-35.
- Kops, G.J., i Burgering, B.M. (1999). Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med* **77**, 656-665.
- Kops, G.J., Medema, R.H., Glassford, J., Essers, M.A., Dijkers, P.F., Coffey, P.J., Lam, E.W., i Burgering, B.M. (2002). Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Molecular and cellular biology* **22**, 2025-2036.
- Kress, T., Raabe, T., i Feller, S. High Erk activity suppresses expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in colorectal cancer cells, pp. 1.
- Krockenberger, M., Honig, A., Rieger, L., Coy, J.F., Sutterlin, M., Kapp, M., Horn, E., Dietl, J., i Kammerer, U. (2007). Transketolase-like 1 expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases. *Int J Gynecol Cancer* **17**, 101-106.
- Kroemer, G., i Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* **13**, 472-482.
- Kuo, G.H., Deangelis, A., Emanuel, S., Wang, A., Zhang, Y., Connolly, P.J., Chen, X., Gruninger, R.H., Rugg, C., Fuentes-Pesquera, A., *et al.* (2005). Synthesis and identification of [1,3,5]triazine-pyridine biheteroaryl as a novel series of potent cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Med Chem* **48**, 4535-4546.
- Landis, M.W., Pawlyk, B.S., Li, T., Sicinski, P., i Hinds, P.W. (2006). Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* **9**, 13-22.
- Langbein, S., Frederiks, W.M., zur Hausen, A., Popa, J., Lehmann, J., Weiss, C., Alken, P., i Coy, J.F. (2008). Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer. *Int J Cancer* **122**, 2422-2428.
- Langbein, S., Zerilli, M., Zur Hausen, A., Staiger, W., Rensch-Boschert, K., Lukan, N., Popa, J., Ternullo, M.P., Steidler, A., Weiss, C., *et al.* (2006). Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br J Cancer* **94**, 578-585.
- Lapenna, S., i Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 547-566.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., i Semenza, G.L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and cellular biology* **21**, 3995-4004.
- Lavecchia, A., Di Giovanni, C., i Novellino, E. (2010). Inhibitors of Cdc25 phosphatases as anticancer agents: a patent review, pp. 405-425.
- Leber, M.F., i Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* **34**, 881-895.

- Lee, W.N., Boros, L.G., Puigjaner, J., Bassilian, S., Lim, S., i Cascante, M. (1998). Mass isotopomer study of the nonoxidative pathways of the pentose cycle with [1,2-¹³C₂]glucose. *Am J Physiol* **274**, E843-851.
- Lee, W.N.P. (2006). Characterizing phenotype with tracer based metabolomics. *Metabolomics* **2**, 31-39.
- Li, D., Zhu, Y., Tang, Q., Lu, H., Li, H., Yang, Y., Li, Z., i Tong, S. (2009). A new G6PD knockdown tumor-cell line with reduced proliferation and increased susceptibility to oxidative stress. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* **24**, 81-90.
- Liu, B.Q., Peto, R., Chen, Z.M., Boreham, J., Wu, Y.P., Li, J.Y., Campbell, T.C., i Chen, J.S. (1998). Emerging tobacco hazards in China: 1. Retrospective proportional mortality study of one million deaths. *Bmj* **317**, 1411-1422.
- Lobo, C., Ruiz-Bellido, M.A., Aledo, J.C., Marquez, J., Nunez De Castro, I., i Alonso, F.J. (2000). Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. *The Biochemical journal* **348 Pt 2**, 257-261.
- Lopez-Abente, G., Pollan, M., Aragones, N., Perez Gomez, B., Hernandez Barrera, V., Lope, V., i Suarez, B. (2004). [State of cancer in Spain: incidence]. *Anales del sistema sanitario de Navarra* **27**, 165-173.
- Lu, H., Forbes, R.A., i Verma, A. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *The Journal of biological chemistry* **277**, 23111-23115.
- Maiese, K., Chong, Z.Z., Shang, Y.C., i Hou, J. (2009). A "FOXO" in sight: targeting Foxo proteins from conception to cancer. *Med Res Rev* **29**, 395-418.
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P.E., Skeen, J.E., Gottlob, K., Chandel, N.S., Thompson, C.B., Robey, R.B., i Hay, N. (2004). Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular cell* **16**, 819-830.
- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., i Syrigos, K. (2009). Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest* **27**, 1023-1037.
- Malumbres, M. (2005). Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **4**, 206-210.
- Malumbres, M., i Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 222-231.
- Malumbres, M., i Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**, 459-465.
- Malumbres, M., i Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 630-641.
- Malumbres, M., i Barbacid, M. (2006). Is Cyclin D1-CDK4 kinase a bona fide cancer target? *Cancer Cell* **9**, 2-4.
- Malumbres, M., i Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**, 153-166.
- Malumbres, M., Pevarello, P., Barbacid, M., i Bischoff, J.R. (2008). CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends in pharmacological sciences* **29**, 16-21.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., i Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549-555.
- Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., Lee, W.-N.P., Boros, L.G., Fernandez-Novell, J.M., Centelles, J.J., Medrano, A., Rodriguez-Gil, J.E., i Cascante, M. (2003). Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Letters* **554**, 342-346.
- Marin, S., Lee, W.N., Bassilian, S., Lim, S., Boros, L.G., Centelles, J.J., Fernandez-Novell, J.M., Guinovart, J.J., i Cascante, M. (2004). Dynamic profiling of the glucose metabolic network in fasted rat hepatocytes using [1,2-¹³C₂]glucose. *The Biochemical journal* **381**, 287-294.
- Mashima, T., Seimiya, H., i Tsuruo, T. (2009). De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer* **100**, 1369-1372.

- Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306.
- Mates, J.M., i Sanchez-Jimenez, F.M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 157-170.
- Mathupala, S.P., Ko, Y.H., i Pedersen, P.L. (2009). Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol* **19**, 17-24.
- Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., i Hwang, P.M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science (New York, NY)* **312**, 1650-1653.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., i Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11285-11290.
- Matushansky, I., Radparvar, F., i Skoultschi, A.I. (2000). Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14317-14322.
- Maximo, V., Lima, J., Soares, P., i Sobrinho-Simoes, M. (2009). Mitochondria and cancer. *Virchows Arch* **454**, 481-495.
- Mazurek, S. (2007). Pyruvate kinase type M2: a key regulator within the tumour metabolome and a tool for metabolic profiling of tumours. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 99-124.
- Mazurek, S., Boschek, C.B., Hugo, F., i Eigenbrodt, E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* **15**, 300-308.
- Mazurek, S., i Eigenbrodt, E. (2003). The tumor metabolome. *Anticancer Res* **23**, 1149-1154.
- Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Durr, P., i Eigenbrodt, E. (2001). Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene* **20**, 6891-6898.
- McInnes, C. (2008). Progress in the evaluation of CDK inhibitors as anti-tumor agents. *Drug Discovery Today* **13**, 875-881.
- McKeehan, W.L. (1982). Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol Int Rep* **6**, 635-650.
- Medema, R.H., i Bos, J.L. (1993). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* **4**, 615-661.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., i Burgering, B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**, 782-787.
- Menendez, J.A., Vellon, L., Mehmi, I., Oza, B.P., Ropero, S., Colomer, R., i Lupu, R. (2004). Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10715-10720.
- Michieli, P. (2009). Hypoxia, angiogenesis and cancer therapy: to breathe or not to breathe? *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **8**, 3291-3296.
- Migita, T., Narita, T., Nomura, K., Miyagi, E., Inazuka, F., Matsuura, M., Ushijima, M., Mashima, T., Seimiya, H., Satoh, Y., *et al.* (2008). ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **68**, 8547-8554.
- Miliani de Marval, P.L., Macias, E., Rounbehler, R., Sicinski, P., Kiyokawa, H., Johnson, D.G., Conti, C.J., i Rodriguez-Puebla, M.L. (2004). Lack of cyclin-dependent kinase 4 inhibits c-myc tumorigenic activities in epithelial tissues. *Molecular and cellular biology* **24**, 7538-7547.
- Millard, S.S., i Koff, A. (1998). Cyclin-dependent kinase inhibitors in restriction point control, genomic stability, and tumorigenesis. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**, 37-42.
- Miller, K.A., Yeager, N., Baker, K., Liao, X.H., Refetoff, S., i Di Cristofano, A. (2009). Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo. *Cancer Res* **69**, 3689-3694.

- Morrish, F., Isern, N., Sadilek, M., Jeffrey, M., i Hockenbery, D.M. (2009). c-Myc activates multiple metabolic networks to generate substrates for cell-cycle entry. *Oncogene*.
- Morrow, P.K., Zambrana, F., i Esteva, F.J. (2009). Recent advances in systemic therapy: Advances in systemic therapy for HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* **11**, 207.
- Murray, M.D., i Darvell, B.W. (1993). The evolution of the complete denture base. Theories of complete denture retention--a review. Part 2. *Aust Dent J* **38**, 299-305.
- Murray, N., i Turrisi, A.T., 3rd (2006). A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **1**, 270-278.
- Myatt, S.S., i Lam, E.W. (2007). The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 847-859.
- Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D.L., i Accili, D. (2001). The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* **108**, 1359-1367.
- Nakae, J., Park, B.C., i Accili, D. (1999). Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *The Journal of biological chemistry* **274**, 15982-15985.
- Nelson DL, C.M. (2004). *Lehninger principles of biochemistry*. **Gordonsville, VA: W. H. Freeman**.
- Nemoto, S., i Finkel, T. (2002). Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science (New York, NY)* **295**, 2450-2452.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., i Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* **19**, 3159-3167.
- Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B., i Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* **16**, 373-378.
- Omerovic, J., Laude, A.J., i Prior, I.A. (2007). Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2575-2589.
- Ortega, S., Malumbres, M., i Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1602**, 73-87.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M., i Barbacid, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* **35**, 25-31.
- Osman, I., Scher, H.I., Drobnjak, M., Verbel, D., Morris, M., Agus, D., Ross, J.S., i Cordon-Cardo, C. (2001). HER-2/neu (p185neu) protein expression in the natural or treated history of prostate cancer. *Clin Cancer Res* **7**, 2643-2647.
- Osterop, A.P., Medema, R.H., vd Zon, G.C., Bos, J.L., Moller, W., i Maassen, J.A. (1993). Epidermal-growth-factor receptors generate Ras.GTP more efficiently than insulin receptors. *European journal of biochemistry / FEBS* **212**, 477-482.
- Palmarini, M., i Fan, H. (2001). Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **93**, 1603-1614.
- Pawson, T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**, 191-203.
- Pedersen, P.L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr* **39**, 211-222.
- Pelicano, H., Carney, D., i Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* **7**, 97-110.

- Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R.H., i Huang, P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* **25**, 4633-4646.
- Perez de Castro, I., de Carcer, G., i Malumbres, M. (2007). A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis* **28**, 899-912.
- Perez Fidalgo, J.A., Roda, D., Rosello, S., Rodriguez-Braun, E., i Cervantes, A. (2009). Aurora kinase inhibitors: a new class of drugs targeting the regulatory mitotic system. *Clin Transl Oncol* **11**, 787-798.
- Pilarska-Machowicz, A. (1990). [The role of aromatic hydrocarbon hydroxylase in the pathogenesis of lung cancer]. *Pol Tyg Lek* **45**, 303-307.
- Planas-Silva, M.D., i Weinberg, R.A. (1997). The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 768-772.
- Plas, D.R., i Thompson, C.B. (2003). Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *The Journal of biological chemistry* **278**, 12361-12366.
- Plas, D.R., i Thompson, C.B. (2005). Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* **24**, 7435-7442.
- Pop, C., i Salvesen, G.S. (2009). Human caspases: Activation, specificity and regulation. *The Journal of biological chemistry*.
- Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A., i Henderson, B.E. (1990). Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer, pp. 7415-7421.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., et al. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**, 550-555.
- Quinlan, M.P., i Settleman, J. (2009). Isoform-specific ras functions in development and cancer. *Future Oncol* **5**, 105-116.
- Quinn, M.J., Cooper, N., Rachet, B., Mitry, E., i Coleman, M.P. (2008). Survival from cancer of the breast in women in England and Wales up to 2001. *Br J Cancer* **99 Suppl 1**, S53-55.
- Rabindran, S.K. (2005). Antitumor activity of HER-2 inhibitors. *Cancer Lett* **227**, 9-23.
- Rais, B., Comin, B., Puigjaner, J., Brandes, J.L., Creppy, E., Saboureau, D., Ennamany, R., Paul Lee, W.-N., Boros, L.G., i Cascante, M. (1999). Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Letters* **456**, 113-118.
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L., i Sellers, W.R. (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* **2**, 81-91.
- Ramos-Montoya, A., Lee, W.-N.P., Bassilian, S., Lim, S., Trebukhina, R.V., Kazhyna, M.V., Ciudad, C.J., Noé, V., Centelles, J.J., i Cascante, M. (2006). Pentose phosphate cycle oxidative and non-oxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* **119**, 2733-2741.
- Rathmell, J.C., i Newgard, C.B. (2009). Biochemistry. A glucose-to-gene link. *Science (New York, NY)* **324**, 1021-1022.
- Real, P.J., Benito, A., Cuevas, J., Berciano, M.T., de Juan, A., Coffey, P., Gomez-Roman, J., Lafarga, M., Lopez-Vega, J.M., i Fernandez-Luna, J.L. (2005). Blockade of epidermal growth factor receptors chemosensitizes breast cancer cells through up-regulation of Bnip3L. *Cancer Res* **65**, 8151-8157.
- Reddy, H.K., Mettus, R.V., Rane, S.G., Grana, X., Litvin, J., i Reddy, E.P. (2005). Cyclin-dependent kinase 4 expression is essential for neu-induced breast tumorigenesis. *Cancer Res* **65**, 10174-10178.
- Reese, D.M., i Slamon, D.J. (1997). HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells* **15**, 1-8.
- Reid, A., Vidal, L., Shaw, H., i de Bono, J. (2007). Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu). *Eur J Cancer* **43**, 481-489.

- Rena, G., Guo, S., Cichy, S.C., Unterman, T.G., i Cohen, P. (1999). Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* **274**, 17179-17183.
- Rimpi, S., i Nilsson, J.A. (2007). Metabolic enzymes regulated by the Myc oncogene are possible targets for chemotherapy or chemoprevention. *Biochem Soc Trans* **35**, 305-310.
- Robey, R.B., i Hay, N. (2005). Mitochondrial hexokinases: guardians of the mitochondria. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **4**, 654-658.
- Robey, R.B., i Hay, N. (2009). Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* **19**, 25-31.
- Rodriguez-Viciano, P., Tetsu, O., Oda, K., Okada, J., Rauen, K., i McCormick, F. (2005). Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**, 461-467.
- Romano, G., i Giordano, A. (2008). Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **7**, 3664-3668.
- Ross, J.S., i Fletcher, J.A. (1998). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* **16**, 413-428.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., Linette, G.P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Symmans, W.F., Puzstai, L., i Bloom, K.J. (2003). The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* **8**, 307-325.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., i Capaldi, R.A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* **64**, 985-993.
- Samudio, I., Fiegl, M., i Andreeff, M. (2009). Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* **69**, 2163-2166.
- Sanchez-Munoz, A., Perez-Ruiz, E., Jimenez, B., Ribelles, N., Marquez, A., Garcia-Rios, I., i Alba Conejo, E. (2009). Targeted therapy of metastatic breast cancer. *Clin Transl Oncol* **11**, 643-650.
- Sauer, U. (2006). Metabolic networks in motion: 13C-based flux analysis. *Mol Syst Biol* **2**, 62.
- Schmoll, D., Walker, K.S., Alessi, D.R., Grempler, R., Burchell, A., Guo, S., Walther, R., i Unterman, T.G. (2000). Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *The Journal of biological chemistry* **275**, 36324-36333.
- Schrauzer, G.N. (2009). Selenium and selenium-antagonistic elements in nutritional cancer prevention. *Critical reviews in biotechnology* **29**, 10-17.
- Schubert, S., Shannon, K., i Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 295-308.
- Schuster, M., Nechansky, A., i Kircheis, R. (2006). Cancer immunotherapy. *Biotechnol J* **1**, 138-147.
- Schwartz, G.K., i Shah, M.A. (2005). Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. *J Clin Oncol* **23**, 9408-9421.
- Sears, R.C., i Nevins, J.R. (2002). Signaling Networks That Link Cell Proliferation and Cell Fate, pp. 11617-11620.
- Selivanov, V.A., Sukhomlin, T., Centelles, J.J., Lee, P.W., i Cascante, M. (2006). Integration of enzyme kinetic models and isotopomer distribution analysis for studies of in situ cell operation. *BMC Neurosci* **7 Suppl 1**, S7.
- Semenza, G.L., Artemov, D., Bedi, A., Bhujwala, Z., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Ravi, R., Simons, J., Taghavi, P., et al. (2001). 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Found Symp* **240**, 251-260; discussion 260-254.
- Serini, G., Maione, F., i Bussolino, F. (2009). Semaphorins and tumor angiogenesis. *Angiogenesis*.
- Seyfried, T.N., i Shelton, L.M. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* **7**, 7.
- Shapiro, G.I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* **24**, 1770-1783.

- Shepard, H.M., Lewis, G.D., Sarup, J.C., Fendly, B.M., Maneval, D., Mordenti, J., Figari, I., Kotts, C.E., Palladino, M.A., Jr., Ullrich, A., *et al.* (1991). Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol* **11**, 117-127.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science (New York, NY)* **274**, 1672-1677.
- Sherr, C.J., i Roberts, J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18**, 2699-2711.
- Siegel, R.L., Jemal, A., i Ward, E.M. (2009). Increase in Incidence of Colorectal Cancer Among Young Men and Women in the United States, pp. 1695-1698.
- Slamon, D.J. (1987). Proto-oncogenes and human cancers. *N Engl J Med* **317**, 955-957.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., i McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, NY)* **235**, 177-182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., *et al.* (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (New York, NY)* **244**, 707-712.
- Sliwkowski, M.X., Lofgren, J.A., Lewis, G.D., Hotaling, T.E., Fendly, B.M., i Fox, J.A. (1999). Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* **26**, 60-70.
- Son, J.W., Kang, H.K., Chae, M.H., Choi, J.E., Park, J.M., Lee, W.K., Kim, C.H., Kim, D.S., Kam, S., Kang, Y.M., *et al.* (2006). Polymorphisms in the caspase-8 gene and the risk of lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **169**, 121-127.
- Soni, R., O'Reilly, T., Furet, P., Muller, L., Stephan, C., Zumstein-Mecker, S., Fretz, H., Fabbro, D., i Chaudhuri, B. (2001). Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4. *Journal of the National Cancer Institute* **93**, 436-446.
- Spittler, A., Oehler, R., Goetzing, P., Holzer, S., Reissner, C.M., Leutmezer, F., Rath, V., Wrba, F., Fuegger, R., Boltz-Nitulescu, G., *et al.* (1997). Low glutamine concentrations induce phenotypical and functional differentiation of U937 myelomonocytic cells. *J Nutr* **127**, 2151-2157.
- Staiger, W.I., Coy, J.F., Grobholz, R., Hofheinz, R.D., Lukan, N., Post, S., Schwarzbach, M.H., i Willeke, F. (2006). Expression of the mutated transketolase TKTL1, a molecular marker in gastric cancer. *Oncol Rep* **16**, 657-661.
- Stetak, A., Veress, R., Ovadi, J., Csermely, P., Keri, G., i Ullrich, A. (2007). Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. *Cancer Res* **67**, 1602-1608.
- Sutherland, R., i Musgrove, E. (2009). CDK inhibitors as potential breast cancer therapeutics: new evidence for enhanced efficacy in ER+ disease, pp. 112.
- Swinnen, J.V., Brusselmans, K., i Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**, 358-365.
- Tang, E.D., Nunez, G., Barr, F.G., i Guan, K.L. (1999). Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *The Journal of biological chemistry* **274**, 16741-16746.
- Tennant, D.A., Duran, R.V., Boulahbel, H., i Gottlieb, E. (2009). Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis*.
- Terstrie, S., i Grothey, A. (2006). First- and second-line therapy of metastatic colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **6**, 921-930.
- Tong, X., Zhao, F., i Thompson, C.B. (2009). The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 32-37.

- Toogood, P.L., Harvey, P.J., Repine, J.T., Sheehan, D.J., VanderWel, S.N., Zhou, H., Keller, P.R., McNamara, D.J., Sherry, D., Zhu, T., *et al.* (2005). Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J Med Chem* **48**, 2388-2406.
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J., Jr., DiStefano, P.S., Chiang, L.W., i Greenberg, M.E. (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science (New York, NY)* **296**, 530-534.
- Travis, W.D., Travis, L.B., i Devesa, S.S. (1995). Lung cancer. *Cancer* **75**, 191-202.
- Tretter, L., i Adam-Vizi, V. (2005). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 2335-2345.
- van den Heuvel, S., i Dyson, N.J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 713-724.
- van der Greef, J., Hankemeier, T., i McBurney, R.N. (2006). Metabolomics-based systems biology and personalized medicine: moving towards n = 1 clinical trials? *Pharmacogenomics* **7**, 1087-1094.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., i Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, NY)* **324**, 1029-1033.
- VanderWel, S.N., Harvey, P.J., McNamara, D.J., Repine, J.T., Keller, P.R., Quin, J., 3rd, Booth, R.J., Elliott, W.L., Dobrusin, E.M., Fry, D.W., *et al.* (2005). Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *J Med Chem* **48**, 2371-2387.
- Vanhaesebroeck, B., i Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical journal* **346 Pt 3**, 561-576.
- Vivanco, I., i Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501.
- Vizan, P., Alcarraz-Vizán, G., Diaz-Moralli, S., Rodriguez-Prados, J.C., Zanuy, M., Centelles, J.J., Jauregui, O., i Cascante, M. (2007). Quantification of Intracellular Phosphorylated Carbohydrates in HT29 Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*.
- Vizan, P., Alcarraz-Vizan, G., Diaz-Moralli, S., Solovjeva, O.N., Frederiks, W.M., i Cascante, M. (2009a). Modulation of pentose phosphate pathway during cell cycle progression in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Int J Cancer* **124**, 2789-2796.
- Vizan, P., Boros, L.G., Figueras, A., Capella, G., Mangués, R., Bassilian, S., Lim, S., Lee, W.N., i Cascante, M. (2005). K-ras codon-specific mutations produce distinctive metabolic phenotypes in NIH3T3 mice [corrected] fibroblasts. *Cancer Res* **65**, 5512-5515.
- Vizán, P., Mazurek, S., i Cascante, M. (2008). Robust metabolic adaptation underlying tumor progression. *Metabolomics* **4**, 1-12.
- Vizan, P., Sanchez-Tena, S., Alcarraz-Vizan, G., Soler, M., Messeguer, R., Pujol, M.D., Lee, W.N., i Cascante, M. (2009b). Characterization of the metabolic changes underlying growth factor angiogenic activation: identification of new potential therapeutic targets. *Carcinogenesis* **30**, 946-952.
- Volker, H.U., Hagemann, C., Coy, J., Wittig, R., Sommer, S., Stojic, J., Haubitz, I., Vince, G.H., Kammerer, U., i Monoranu, C.M. (2008). Expression of transketolase-like 1 and activation of Akt in grade IV glioblastomas compared with grades II and III astrocytic gliomas. *Am J Clin Pathol* **130**, 50-57.
- Voorhoeve, P.M., i Agami, R. (2004). Unraveling human tumor suppressor pathways: a tale of the INK4A locus. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **3**, 616-620.
- Vrablic, A.S., Albright, C.D., Craciunescu, C.N., Salganik, R.I., i Zeisel, S.H. (2001). Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes. *Faseb J* **15**, 1739-1744.

- Walenta, S., Schroeder, T., i Mueller-Klieser, W. (2004). Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Current medicinal chemistry* **11**, 2195-2204.
- Wallace, D.C. (2005). Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**, 363-374.
- Wang, C., Xu, C., Sun, M., Luo, D., Liao, D.F., i Cao, D. (2009). Acetyl-CoA carboxylase- α inhibitor TOFA induces human cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Warburg, O. (1956). [Origin of cancer cells.]. *Oncologia* **9**, 75-83.
- Warburg, O., Posener, K., i Negelein, E. (1924). Über den Stoffwechsel der Karzinomzellen. *Biochemische Zeitschrift* **152**, 309-344.
- Weigelt, J., Climent, I., Dahlman-Wright, K., i Wikstrom, M. (2001). Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4). *Biochemistry* **40**, 5861-5869.
- Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., i Thompson, C.B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science (New York, NY)* **324**, 1076-1080.
- Wenzlaff, A.S., Cote, M.L., Bock, C.H., Land, S.J., Santer, S.K., Schwartz, D.R., i Schwartz, A.G. (2005). CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis* **26**, 2207-2212.
- Westlake, S., i Cooper, N. (2008). Cancer incidence and mortality: trends in the United Kingdom and constituent countries, 1993 to 2004. *Health Stat Q*, 33-46.
- Whiteman, E.L., Cho, H., i Birnbaum, M.J. (2002). Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 444-451.
- Winawer, S., Fletcher, R., Rex, D., Bond, J., Burt, R., Ferrucci, J., Ganiats, T., Levin, T., Woolf, S., Johnson, D., *et al.* (2003). Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* **124**, 544-560.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., *et al.* (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18782-18787.
- Wu, Z., i Yu, Q. (2009). E2F1-mediated apoptosis as a target of cancer therapy. *Current molecular pharmacology* **2**, 149-160.
- Xu, R.-h., Pelicano, H., Zhou, Y., Carew, J.S., Feng, L., Bhalla, K.N., Keating, M.J., i Huang, P. (2005). Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. *Cancer Res* **65**, 613-621.
- Xu, X., Zur Hausen, A., Coy, J.F., i Lochelt, M. (2008). Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells. *Int J Cancer*.
- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., i Hancock, J.F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* **273**, 24052-24056.
- Yarden, Y., i Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-137.
- Yeagley, D., Guo, S., Unterman, T., i Quinn, P.G. (2001). Gene- and activation-specific mechanisms for insulin inhibition of basal and glucocorticoid-induced insulin-like growth factor binding protein-1 and phosphoenolpyruvate carboxykinase transcription. Roles of forkhead and insulin response sequences. *The Journal of biological chemistry* **276**, 33705-33710.
- Yeung, S.J., Pan, J., i Lee, M.H. (2008). Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3981-3999.
- Yin, J., Vogel, U., Ma, Y., Qi, R., Sun, Z., i Wang, H. (2007). The DNA repair gene XRCC1 and genetic susceptibility of lung cancer in a northeastern Chinese population. *Lung Cancer* **56**, 153-160.

- Yokoyama, H., Gruss, O.J., Rybina, S., Caudron, M., Schelder, M., Wilm, M., Mattaj, I.W., i Karsenti, E. (2008). Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate. *JCell Biol* **180**, 867-875.
- Yu, J., Qiao, L., Zimmermann, L., Ebert, M.P., Zhang, H., Lin, W., Rocken, C., Malfertheiner, P., i Farrell, G.C. (2006a). Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Hepatology* **43**, 134-143.
- Yu, Q., Geng, Y., i Sicinski, P. (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* **411**, 1017-1021.
- Yu, Q., Sicinska, E., Geng, Y., Ahnstrom, M., Zagozdzon, A., Kong, Y., Gardner, H., Kiyokawa, H., Harris, L.N., Stal, O., *et al.* (2006b). Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer Cell* **9**, 23-32.
- Zerilli, M., Amato, M.C., Martorana, A., Cabibi, D., Coy, J.F., Cappello, F., Pompei, G., Russo, A., Giordano, C., i Rodolico, V. (2008). Increased expression of transketolase-like-1 in papillary thyroid carcinomas smaller than 1.5 cm in diameter is associated with lymph-node metastases. *Cancer* **113**, 936-944.
- Zhang, S., Yue, J.X., Yang, J.H., Cai, P.C., i Kong, W.J. (2008). Overexpression of transketolase protein TKTL1 is associated with occurrence and progression in nasopharyngeal carcinoma: a potential therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* **7**, 517-522.
- Zheng, W.H., Kar, S., i Quirion, R. (2000). Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* **275**, 39152-39158.
- Zhong, D., Liu, X., Schafer-Hales, K., Marcus, A.I., Khuri, F.R., Sun, S.Y., i Zhou, W. (2008). 2-Deoxyglucose induces Akt phosphorylation via a mechanism independent of LKB1/AMP-activated protein kinase signaling activation or glycolysis inhibition. *Mol Cancer Ther* **7**, 809-817.
- Zhou, W., Han, W.F., Landree, L.E., Thupari, J.N., Pinn, M.L., Bililign, T., Kim, E.K., Vadlamudi, A., Medghalchi, S.M., El Meskini, R., *et al.* (2007). Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Res* **67**, 2964-2971.
- Zu, X.L., i Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 459-465.



PUBLICACIONES

Capítol 1

La inhibició de CDK4 i CDK6 afecta la progressió tumoral i pertorba el robust perfil metabòlic tumoral

Miriam Zanuy^{1*}, Antonio Ramos-Montoya^{1‡*}, Oscar Villacañas², Anibal Miranda¹, Esther Aguilar¹, Neus Agell³, Oriol Bachs³, Jaime Rubio-Martinez², Maria Dolors Pujol⁴, Wai-Nang P. Lee⁵, Silvia Marin¹ and Marta Cascante^{1‡}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, CSIC associated unit, Faculty of Biology, University of Barcelona, Biomedicine Institute of the University of Barcelona (IBUB), Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

² Department of Physical Chemistry, University of Barcelona and Institut de Recerca en Química Teòrica i Computacional (IQTUB), Martí i Franqués 1, 08028 Barcelona, Spain.

³ Department of Cell Biology and Pathology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

⁴ Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, CSIC associated unit, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain.

⁵ Department of Pediatrics, Los Angeles Biomedical Research Institute at the Harbor-UCLA Medical Center, RB1, 1124 West Carson Street, Torrance, California 90502, USA.

*Aquests autors han contribuït per igual en aquest treball

‡ Adreça actual: Uro-Oncology Research Group, Cancer Research UK Cambridge Research Institute, Li Ka Shing Centre, Robinson Way, Cambridge, CB2 0RE, UK

RESUM

Les cinases dependent de ciclins CDK4 i CDK6 són essencials pel control de la reentrada de la cèl·lula al cicle cel·lular i per la progressió a través de la fase G1 del mateix. Una característica distintiva associada al càncer són les aberracions en CDK4 i CDK6. Per tant, aquestes proteïnes són considerades dianes pel tractament del càncer. En aquest treball, s'ha caracteritzat la calceïna/AM, un tint fluorescent de cèl·lules i un agent citotòxic, com un potent inhibidor específic de cinases dependents de ciclins 4 i 6 en cèl·lules humanes d'adenocarcinoma de còlon HCT116, on la calceïna inhibeix la fosforilació en la Ser780 de la proteïna del retinoblastoma (pRb) i indueix arrest cel·lular en la fase G1 del cicle cel·lular. A més a més, en assajos de recuperació cel·lular en aquesta línia cel·lular, el tractament amb calceïna no va permetre la formació de clons. En aquest estudi, també es van avaluar els efectes a nivell metabòlic produïts per la calceïna/AM en la línia cel·lular HCT116 i els resultats mostren que el flux a través de la branca oxidativa de la via de les pentoses fosfat era clarament més lent amb el tractament amb calceïna/AM i que l'equilibri de les branques oxidativa/no oxidativa de la via de les pentoses fosfat estava visiblement alterat. Per dilucidar si aquests canvis metabòlics es devien a la inhibició de la CDK4 i CDK6 per calceïna/AM, també es va caracteritzar el perfil metabòlic de fibroblasts embriònics de ratolí (MEF) triple *knockout* per CDK4, CDK6 i CDK2. Els resultats mostren que el perfil metabòlic associat amb l'absència de CDK4, CDK6 i CDK2 coincideix amb els canvis metabòlics induïts per calceïna/AM en les cèl·lules HCT116. Per tant, confirmem que la inhibició de CDK4 i CDK6 destorba l'equilibri entre les branques oxidativa i no oxidativa de la via de les pentoses fosfat, que ha estat prèviament descrit com una de les adaptacions metabòliques més sòlides dels tumors. D'aquesta manera, aquí postulem que la calceïna pot parar la divisió cel·lular i matar el tumor a baixes dosis. Així doncs, la inhibició selectiva de CDK4 i CDK6 ha de tenir un gran interès farmacològic, ja que els inhibidors d'aquestes cinases afectarà la progressió del cicle cel·lular i el sòlid perfil metabòlic del tumor.

Chapter 1

CDK4 and CDK6 inhibition affects tumor progression and disrupts the robust tumor metabolic profile

Miriam Zanuy^{1*}, Antonio Ramos-Montoya^{1‡*}, Oscar Villacañas², Anibal Miranda¹, Esther Aguilar¹, Neus Agell³, Oriol Bachs³, Jaime Rubio-Martinez², Maria Dolors Pujol⁴, Wai-Nang P. Lee⁵, Silvia Marin¹ and Marta Cascante^{1‡}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, CSIC associated unit, Faculty of Biology, University of Barcelona, Biomedicine Institute of the University of Barcelona (IBUB), Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

² Department of Physical Chemistry, University of Barcelona and Institut de Recerca en Química Teòrica i Computacional (IQTUB), Martí i Franqués 1, 08028 Barcelona, Spain.

³ Department of Cell Biology and Pathology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

⁴ Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, CSIC associated unit, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain.

⁵ Department of Pediatrics, Los Angeles Biomedical Research Institute at the Harbor-UCLA Medical Center, RB1, 1124 West Carson Street, Torrance, California 90502, USA.

* These authors contributed equally to this work

‡ Present address: Uro-Oncology Research Group, Cancer Research UK Cambridge Research Institute, Li Ka Shing Centre, Robinson Way, Cambridge, CB2 0RE, UK

‡ **Correspondence address:** Marta Cascante, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology (Edifici Nou), Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Phone: 0034 934021593; Fax: 0034 934021559; E-mail: martacascante@ub.edu

RUNNING TITLE

CDK inhibition perturbs Pentose Phosphate Pathway and cell viability

KEYWORDS

Apoptosis

Cell cycle

CDK-Inhibitor

Cyclin dependent kinases

Glycolysis

Pentose Phosphate Pathway

Phase Plane Analysis

Retinoblastoma protein

ABBREVIATIONS

AM: acetoxymethyl ester

CDK: cyclin dependent kinase

CI: Chemical ionization

CKI: CDK inhibitor

DKO: mouse embryonic fibroblast double knock out for CDK4 and CDK6

FACS: Fluorescence-activated cell sorter

G6PDH: glucose-6 phosphate dehydrogenase

GC/MS: Gas chromatography coupled to mass spectrometry

IP: immunoprecipitation

MEF: mouse embryogenic fibroblast

PPP: pentose phosphate pathway

pRb: retinoblastoma protein

TKO: mouse embryogenic fibroblasts triple knock out for CDK4/6 and CDK2

TKT: transketolase

ABSTRACT

Cyclin dependent kinases CDK4 and CDK6 are essential for the control of cell cycle re-entry and progression through G1 phase of the cell cycle. Aberrant expression of CDK4 and CDK6 is a hallmark of cancer. Thus CDK4 and CDK6 are attractive targets for cancer therapy. Herein, we report that fluorescent cell dye and cytotoxic agent calcein/AM is also a potent specific inhibitor of CDK4 and CDK6 in HCT116 human colon adenocarcinoma cells. Calcein inhibited retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation at its Ser780 and induced cell cycle arrest at G1 phase. Interestingly, testing calcein/AM in clonogenic assays using HCT116 cells, the treatment resulted in no colony formation. Effects at metabolic level of calcein/AM on HCT116 have also been evaluated and results showed that flux through the oxidative branch of the pentose phosphate pathway was clearly down and the oxidative/non-oxidative balance of the pentose phosphate pathway visibly disturbed. To elucidate whether these metabolic changes were due to the inhibition of CDK4 and CDK6 by calcein/AM, we also characterized the metabolic profile of mouse embryonic fibroblasts (MEF) which were triple knock out for CDK4, CDK6 and CDK2. The results showed that the metabolic profile associated with the depletion of both CDK4, CDK6 and CDK2 coincided with metabolic changes induced by calcein/AM in HCT116 cells. Thus, it confirmed that inhibition of CDK4 and CDK6 disturbs the balance between the oxidative and the non-oxidative branches of the pentose phosphate pathway, which has been previously described as one of the robust tumor metabolic adaptations. Taking all these results into account, calcein could both effectively stop cell division and kill tumor cells at reduced doses demonstrating that selective inhibition of CDK4 and CDK6 must have an increased pharmacological interest, as inhibitors of these kinases will affect both cell cycle progression and the robust tumor metabolic profile.

INTRODUCTION

The cell cycle and the transmission of genes to the next generation is based on an orchestrated coordination of enzymatic reactions that are hierarchically organized and controlled in order to diminish all risks of aberrant chromosome segregation and to maintain the stability of genomic DNA over generations (Norbury and Nurse, 1992; van den Heuvel and Harlow, 1993). The proliferation of eukaryotic cells typically involves an orderly progression through four distinct phases of the cell cycle: G1, S, G2 and M (Malumbres and Barbacid, 2001; Sherr, 1996). The first step of the G1/S transition of the cell cycle is regulated by cyclin dependent kinases (CDKs: EC 2.7.11.22), CDK4 and CDK6 and their inhibitors, p16^{INK4a} and p15^{INK4a}. According to the long prevailing model of cell cycle control in mammalian cells, cyclin D-CDK4, cyclin D-CDK6 and cyclin E-CDK2 complexes are sequentially required to promote cell cycle entrance from quiescence, progression through the G1 phase and transition from G1 into S phase in response to mitogenic stimulation. Cell culture and biochemical studies have indicated that both cyclin D-CDK4, cyclin D-CDK6 and cyclin E-CDK2 complexes are essential and rate limiting for the phosphorylation and inactivation of the tumour suppressor protein of the retinoblastoma (pRb) and the subsequent induction of the E2F-dependent transcriptional program required for entering S-phase (Lundberg and Weinberg, 1998; Malumbres *et al.*, 2004; Sherr and Roberts, 2004). This step of the cell cycle is very critical. If the cell passes through the restriction point R, it becomes insensitive to extracellular stimuli and it will be committed to enter S phase. Since almost all the regulators of this cell cycle phase are mutated in cancer (Graf *et al.*, 2009), this cell cycle phase has been considered as a good target for therapeutic benefits. Since most mutations in human cancers affect CDK4 and CDK6 or their regulators (Hall and Peters, 1996), and preclinical data indicate that the inhibition of cyclin D-dependent kinase activity may have therapeutic benefits (Graf *et al.*, 2009; Malumbres and Barbacid, 2006; Shapiro, 2006; Yu *et al.*, 2006), interest in CDK4 and CDK6 as promising targets for inhibiting cell-cycle progression has sparked.

The resolution of the tertiary structure of CDKs bound to their cognate cyclins or to their natural inhibitors CKIs (Pavletich, 1999) has greatly facilitated the design of small-molecule inhibitors (Endicott *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 1998). Yet, current strategies tend to target the ATP binding site that is required for their kinase activity (Malumbres and Barbacid, 2001). This makes specificity very difficult to achieve, as there are more than 500 protein kinases in the human genome (Lander *et al.*, 2001). Scientists have therefore developed different strategies over the past two decades that are intended to discover potential specific low molecular weight CDK inhibitors and evaluated them as therapeutic agents, but no CDK inhibitors have been yet approved for commercial use (Lapenna and Giordano, 2009). Despite the increasing evidence of the suitability of targeting cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6, only two specific

CDK4 and CDK6-selective inhibitors, PD 0332991 and P1446A-05, are currently undergoing phase I/II clinical trials for the treatment of lymphomas, multiple myeloma and breast cancer (Fry *et al.*, 2004; McInnes, 2008; Menu *et al.*, 2008; Toogood *et al.*, 2005; VanderWel *et al.*, 2005). However, in recent studies with CD-138 positive myeloma cells isolated from patients it has been reported that PD0332991 keeps cells from dividing but does not kill them (Baughn *et al.*, 2006). Therefore, there is intense interest in developing other selective inhibitors of CDK4 and CDK6, which inhibit pRb phosphorylation and that in addition to stopping cell division will also kill tumor cells for potential use in cancer chemotherapeutics. (Mahale *et al.*, 2006).

Tumour cells suffer metabolic adaptations, which provide them with metabolites and energy to progress through the cell cycle. This adaptation includes, among others, the broadly known *Warburg effect* (high glycolysis in the presence of oxygen) (Warburg, 1956), a high glutamine uptake, the activation of biosynthetic pathways and the over-expression of some glycolytic isoenzymes (Vizán *et al.*, 2008). In the last years it has been accepted that metabolic adaptation of tumour cells includes also an enhancement of pentose phosphate pathway (PPP) fluxes and a specific unbalance between its two branches in favour of the oxidative branch *versus* the non-oxidative branch to maintain the high proliferative rates (Kuo *et al.*, 2000; Poulsen and Frederiksen, 1981; Ramos-Montoya *et al.*, 2006). In previous works we have demonstrated that this balance between the oxidative and non-oxidative branches of the PPP is necessary to maintain the metabolic efficiency of the cancer cell for growth and proliferation, and that it can be a fragility in the robust tumour metabolic adaptation (Ramos-Montoya *et al.*, 2006). The perturbation of this balance by forcing it further towards the oxidative pathway or restoring it to non-tumour cell levels can result in metabolic inefficiency, stop of cell proliferation or even cell death. Moreover, we have also noticed that the PPP is specifically regulated during cell cycle progression in tumour cells (Vizan *et al.*, 2009). We reported a specific increase of the activities of two key enzymes of PPP, glucose-6-phosphate dehydrogenase for the oxidative branch and transketolase for the non oxidative branch, during S/G2 phases of the cell cycle, in particular during the S phase, when the synthesis of nucleotides is required. We also corroborated that an increase of the PPP enzyme activities correlates with a relative increase of the pentose phosphate pool and with an imbalance of oxidative and non-oxidative branches of the PPP (Vizan *et al.*, 2009).

Herein using new bioinformatic tools (Villacanas *et al.*, 2002; Villacanas and Rubio-Martinez, 2006) and docking procedures (Rubio-Martinez, 2005) we have identified calcein (4'5'-*bis*(N,N-bis (carboxymethyl) amino-methyl) fluorescein) as a putative inhibitor of CDK4 and CDK6 that mimic the natural inhibitor p16^{INK4A} in HCT115 cells. This cell line has a silenced wild type p16^{INK4A} gene and only expresses a mutant allele (Myohanen *et al.*, 1998), what makes it very interesting for testing possible inhibitors emulating p16^{INK4a} activity.

Moreover, we provide experimental evidence to prove that this CDK4 and CDK6 inhibitor counteracts metabolic adaptations, which are characteristic of tumor cells and that this metabolic fingerprint is coincident to that obtained in mouse embryogenic fibroblasts knockout for CDK4, CDK6 and CDK2. All together, we demonstrated not only that calcein is a promising agent that could be used as a “lead” for the development of a new family of selective cyclin D-dependent kinases inhibitors but also that inhibition of CDK4 and CDK6 impairs metabolic adaptations that support tumor cell cycle progression.

MATERIALS AND METHODS

Extraction of interaction models from Molecular Dynamics trajectory. Construction and Molecular dynamics simulations of Cdk6-p16^{INK4a} complex as well as the determination of their interactions were carried out as described in (Villacanas *et al.*, 2002). During the last 500ps of the production time (500 snapshots), the position of those atoms involved in the pharmacophoric features of p16^{INK4a}, that is, those atoms belonging to residues of p16^{INK4a} that effectively interact with CDK6, were monitored. As a result, the mean positions of these atoms as well as their maximum deviations were calculated. If several atoms contribute to the same effective interaction, the centre of masses (CM) of the mean positions was calculated and it was treated as a single interaction point. Since all points coming from the production time must be referred to the same reference system, each snapshot was superimposed to the initial geometry (first snapshot). Doing this procedure for all the pharmacophoric features, a 3D picture of all the pharmacophoric points was obtained.

Computer screening procedure and compound selection. The distances from the selected 3D models, as well as the nature of the interactions were introduced as input to search compounds that match this query. Catalyst (Accelrys, Inc., USA) software together with Available Chemical Database (ACD), National Cancer Institute (NCI) database, Maybridge database and Derwent World Drug Database were used. Matches were filtered. Mainly, molecules with unusual bonds or with a molecular weight higher than 750 a.u. were not selected. Each conformation was docked into Cdk6 structure, obtained from Cdk6-p16^{INK4a} dynamics production. Pharmacophoric features were automatically assigned to the ligands, and distances between pharmacophoric points for all conformations were calculated. Next, it was tested if there existed in each conformation a combination that satisfied our pharmacophore hypothesis. If it did, a superimposition between the ligand and the 3D structure of our pharmacophoric hypothesis was carried out, optimizing the RMSD (root mean square deviation). Different steps were carried out in order to get the best docked conformations for each hit. The maximum RMSD allowed was increased 0.25 Å at every step, starting at 0.25 Å.

The process was stopped when either the maximum RMS was 3 Å or every molecule has at least one valid docking result.

A visual structure analysis was carried out to reduce the number of final modelled complexes. Selected compounds were classified regarding their structure. Finally, calcein compound was purchased.

Materials. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), F-12 HAM Nutrient mixture with L-glutamine, MEM-EAGLE non-essential aminoacid solution x100, antibiotic (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin), Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS), Trypsin EDTA solution C (0.05% trypsin –0.02% EDTA) and Glutamine solution 200mM were obtained from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemet, Israel). Fetal Calf Serum (FCS) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), SDS from Fluka, Coomassie blue from Biorad, HEPES and MgCl₂ from Applichem, Trypan blue solution 0.2%, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Dimethyl sulfoxide (DMSO), pyruvic acid, EGTA, EDTA, β-glycerophosphate, NaCl, glycerol, DTT, phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, aprotenin, leupeptin, Na₃VO₄, NaF, calcein, calcein/AM and Tween²⁰ were from Sigma Chemical CO (St. Louis MO, USA). The A-Sepharose was purchased from Pierce, Rockford, IL, USA; the [γ -³²P]ATP, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml from Amersham; histone H1 from Boehringer Mannheim; Bradford reagent (500-0006) and Acrylamide (161-0158) from Bio-Rad Laboratories; anti-CDK6 (sc-177), anti-CDK4 (sc-260-R), anti-cyclin D3 (sc-182) and anti-p16 (sc-468) from Santa Cruz Biotechnology; anti-cyclin D1 (06-137), anti-CDK2 (06-505) and anti-cyclin B1 (05-158) from Upstate Biotechnology; anti-actin (691001) from MP Biomedicals; anti-phospho-Rb (Ser780) from Cell Signaling Technology. pGST-Rb (379-928) (gift of Dr Wang, San Diego, CA, USA) fusion protein was expressed and purified following (Smith and Johnson, 1988) and (Frangioni and Neel, 1993).

Cell culture. In order to perform the experiments, human colon carcinoma HCT116 cells (gift from Dr Capellà, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain), were grown in DMEM : HAM F12 (1:1) Both media were supplemented with 10% FCS, 2 mM Glutamine, 1mM pyruvic acid, 1% non-essential aminoacids, 50 U · mL⁻¹ penicillin and 50 µg · mL⁻¹ streptomycin. All cell cultures were carried out at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Mouse embryonic fibroblast (MEF Ct) and mouse embryonic fibroblast knock out in CDK4, CDK6 and CDK2 (MEF TKO), from Dr. Barbacid at the CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas., Madrid, Spain) were grown as a monolayer culture in minimum essential medium (DMEM with L-glutamine, without glucose and without sodium pyruvate) in the presence of 10% heat-inactivated FCS, 10mM D-glucose and 0.1% streptomycin/penicillin

in standard culture conditions. They were incubated at 37°C, 5% CO₂, 80% of humidity and 3% of O₂. Two different clones of each were used in order to discard the effect of immortalization: MEF Ct: LD179.10.1 and LD207.3.1 and MEF TKO: LD1043.7.1 and LD1043.6.1

Immunoprecipitation and kinase assays. For the kinase assays, immunoprecipitations were performed as described by Harlow and Lane (Harlow and Lane, 1988). HCT116 cells were lysed for 30 min at 4°C in IP buffer (50mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 2.5mM EGTA, 1mM EDTA, 0.1% Tween 20, 10% glycerol, 1mM DTT, 1mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, 1µg·mL⁻¹ aprotinin, 10µg·mL⁻¹ leupeptin, 10mM β-glycerophosphate, 0.1mM Na₃VO₄ and 1mM NaF). Lysates were sonicated twice for 10s at 4°C and clarified by centrifugation at 10,000xg for 10min. Supernatant fraction protein content was measured using the Bradford method (Bradford, 1976), and 400µg of protein from the lysates were incubated with 4µg of antibody (CDK6, CDK4, cyclin-D1, cyclin-D3, cyclin-B1 or CDK2) or with 1µl of normal rabbit serum or normal mouse serum (controls) O/N shaking at 4°C. Protein immunocomplexes were then incubated with 20µL protein A-Sepharose (Pierce, Rockford, IL, USA) for 1h at 4°C, collected by centrifugation and washed four times in IP buffer and twice in kinase buffer (50mM HEPES pH 7.4, 10mM MgCl₂, 2.5mM EGTA, 0.1mM Na₃VO₄, 10mM β-glycerophosphate and 1mM DTT). They were then incubated in kinase buffer containing 2 Ci [γ-³²P]ATP and 1µg pGST-Rb (379-928) fusion protein for CDK6 and CDK4 kinase assays, or 3µg histone H1 for CDK1 and CDK2 kinase assays, for 30min at 30°C in a final volume of 30µL. The samples were pooled together and redistributed to assure equal amounts of all the reagents and immunoprecipitated CDK. Finally, the samples were boiled for 5min and electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels essentially as described by Laemmli (Laemmli, 1970), and the gels were stained with Coomassie blue, dried, and exposed to X-ray films at -80°C.

In order to establish that our method for detecting possible inhibitions was correct, the effect of p16^{INK4a}, the natural inhibitor of CDK4 and CDK6, was tested at a number of increasing concentrations. The decrease in CDK6 phosphorylation of the pRb fragment could be directly related to the concentration of p16, achieving an inhibition of more than 80% at a concentration of 3µM. This p16^{INK4a} concentration of 3µM was used as a positive control for the following kinase assays.

p16^{INK4a} competition assays. CDK6 immunoprecipitations were performed as previously described and non-esterified calcein 2mM was added to some immunoprecipitation pellets. The pellets were kept at 4°C under gentle shaking for 30min. 1µM of p16^{INK4a} was then added to both conditions (calcein 2 mM and control) and they were again kept shaking gently at 4°C for 30min. After a fast spin, the supernatants containing p16^{INK4a} not bound to CDK6 were collected, and the pellets containing p16^{INK4a} bound to CDK6 were washed 3 times in kinase

buffer. All the samples were run in a 15% PAGE and p16^{INK4a} and CDK6 immunoblottings were performed.

Gel electrophoresis and immunoblotting. Cells were lysed in a buffer containing 2% SDS, 67mM Tris-HCl pH 6.8 and 10mM EDTA and sonicated twice for 10s (4°C). Protein content was measured according to the Lowry procedure, using bovine serum albumin (BSA) as standard. The extracts were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gels essentially as described by Laemmli (Comin-Anduix *et al.*, 2002; Laemmli, 1970). After electrophoresis the proteins were transferred to Immobilon-P strips for 2h at 60V. The sheets were preincubated in TBS (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl), 0.05% Tween 20 and 5% BSA for 1h at room temperature, and then incubated for 1h at room temperature in TBS, 0.05% Tween 20, 1% BSA and 0.5% defatted milk powder containing anti-phospho-Rb (Ser780) , anti-CDK4 (sc-260), anti-CDK2(06-505) or anti-actin (60100) antibodies. After washing in TBS, 0.05% Tween 20 (three times, 10 min each), the sheets were incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (1:2000 dilution) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 1h at room temperature. After incubation, the sheets were washed twice in PBS, 0.05% Tween 20 and once in TBS. The reaction was visualized using ECL (Amersham).

Cell growth inhibition. The assay was performed using a variation of the method described by Mosmann (Matito *et al.*, 2003; Mosmann, 1983; Ramos-Montoya *et al.*, 2006). Growing concentrations of the product were plated in 96-well-flat-bottomed microtitre plates to a final volume of 200µL where 1700 cells/well had been seeded 24h before. After incubation for 72h, MTT dissolved in PBS at 1mg · mL⁻¹ and sterile filtered was added to the wells at a final concentration of 0.5mg · mL⁻¹. Following 1 hour of incubation, the generated formazan was dissolved with 100µL of DMSO per well. The absorbance was measured on an ELISA plate reader (Merck ELISA System MIOS version 3.2.) at 550nm. The concentrations that caused 50% of inhibition of cell growth (IC₅₀) were calculated.

Cell culture synchronization and cell cycle analysis. HCT116 cells were brought to 95% cell confluence and kept confluent for 24 hours with 0.5% FCS in culture medium. Then, the cells were detached from the flasks using 0.025% trypsin-EDTA and seeded to 50-60% cell confluence in a medium with 10% FCS. Calcein/AM 2µM was added at this stage. Under all conditions, approximately 5% of the cells were used to perform cell cycle analysis.

In order to determine the proportion of cells in each cell cycle phase (G1, S or G2), cell cycle analysis was assessed with flow cytometry using a fluorescence-activated cell sorter (FACS). Cells were collected by centrifugation after detaching from the flasks using 0.025% trypsin-EDTA. Then, approximately 500,000 cells were resuspended in 0.5mL phosphate buffer saline (PBS) followed by the addition of 4.5mL 70% (v/v) ethanol. The cell suspensions were

stored at -20°C until processing as described (Matito *et al.*, 2003). Briefly, cells were stained in PBS containing $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ propidium iodide, $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNase free RNase and 0.1% Triton® X-100. FACS analysis was carried out at 488nm in an Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). Data of 12,000 cells were collected and analyzed using Multicycle program (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA).

Clonogenic Assay. HCT116 cells recuperation was assessed using a crystal violet colorimetric assay after adding the compounds and leaving the cells growing during 15 days with fresh medium. Briefly, the medium was gently aspirated from each well, the cells were washed once with PBS then dyed with a solution containing 1 g of crystal violet in 70% ethanol, and finally were incubated at room temperature for 2 min. This mixture allowed simultaneous fixation of cells and penetration of crystal violet dye into the living cells. After washing three times in distilled water to elute colour from cells, the surviving clones were observed.

Glucose and lactate concentration. From culture medium, glucose and lactate concentration were determined spectrophotometrically as previously described (Gutmann and Wahlefeld, 1974; Kunst *et al.*, 1984). Glucose, glutamate and glutamine concentrations were measured using a Cobas Mira Plus chemistry analyzer (HORIBA ABX, Montpellier, France), whereas lactate concentration was measured on an ELISA plate reader (Tecan Sunrise MR20-301, TECAN) at the beginning and at the end of incubation time.

Isotopomer distribution analysis. Mass spectral data were obtained on an HP5973 mass selective detector connected to an HP6890 gas chromatograph (HCT116 with calcein/AM assays) and on a GCMS-QP2010 selective detector connected to a GC-2010 gas chromatograph from Shimadzu (MEF Ct and MEF TKO assays). The settings were as follows: GC inlet 230°C (200°C for lactate measurement), transfer line 280°C , MS source 230°C , MS Quad 150°C . An HP-5 and a DB-5MS capillary column (30m length, $250\mu\text{m}$ diameter, $0.25\mu\text{m}$ film thickness) was used. Spectral data were corrected using regression analysis to extract natural ^{13}C enrichment from results (Lee *et al.*, 1991). Measurement of ^{13}C label distribution determined the different relative distribution percentages of the mass isotopomers, m0 (without any ^{13}C labels), m1 (with one ^{13}C), m2 (with two ^{13}C) etc., which were reported as molar fractions. Σm is the sum of the labeled species ($\Sigma\text{m}=\text{m1}+\text{m2}+\text{m3}\dots$) and is representative of the synthesized molecules of each metabolite. The total label enrichment Σmn is the weighted sum of the labeled species ($\Sigma\text{mn}=\text{m1}\times 1+\text{m2}\times 2+\text{m3}\times 3\dots$) and is representative of the contribution of the tracer used in the synthesis of each metabolite.

Lactate from the cell culture medium was extracted by ethyl acetate after acidification with HCl. Lactate was derivatized to its propylamide-heptafluorobutyric form and the m/z 328 (carbons 1–3 of lactate, chemical ionization) was monitored for the detection of m1 (recycled

lactate through the pentose cycle) and m2 (lactate produced by glycolysis) for the estimation of pentose cycle activity (Lee *et al.*, 1998), which is calculated by the m1/m2 ratio in lactate.

RNA ribose was isolated by acid hydrolysis of cellular RNA after Trizol-purification of cell extracts. Ribose isolated from RNA was derivatized to its aldonitrile acetate form using hydroxyl-amine in pyridine and acetic anhydride. We monitored the ion cluster around the m/z 256 (carbons 1-5 of ribose, chemical ionization, CI), to find the molar enrichment and positional distribution of ^{13}C labels in ribose (Boros *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998). The m2 carbon originates from glucose that is converted to ribose through transketolase enzyme reactions, whereas m1 originates from glucose metabolized by direct oxidation via the oxidative steps of the pentose phosphate pathway, where one of the label carbons is lost in the form of CO_2 . The isotopomers m3 and m4 come from the recycling of the previously labeled riboses. The oxidative *versus* non oxidative ratio was measured as $\text{ox}/\text{non ox}=(\text{m1}+\text{m3})/(\text{m2}+\text{m3}+2\times\text{m4})$, since m1 and m3 need the oxidative branch to be formed, whereas m2, m3 and m4 species require the non oxidative branch (twice in m4).

Sugar phosphates determination. Hexose, triose, pentose and fructose-1,6-bis phosphates were determined in cell monolayers frozen in liquid nitrogen as described (Vizan *et al.*, 2007). Briefly, frozen cells were scraped off from the plates adding 100mM acetic acid solution at 4°C. The obtained homogenates were centrifuged at $0.4\times g$ for 10 min at 4°C, and the supernatants containing sugar phosphate molecules were separated and kept frozen at -80°C for the following liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) analysis. Chromatography was performed using an Agilent 1100 (Waldbronn, Germany) quaternary pump equipped with a refrigerated autosampler. A Nucleodex $\beta\text{-OH}$ high performance liquid chromatography (HPLC) column, 200 x 4mm i.d. (Panreac, Badalona, Spain) with a binary gradient at a flow rate of $0.75\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ was used. Solvent A consisted of 10 mM ammonium acetate pH 4.0. Solvent B consisted of acetonitrile. Before reaching the mass spectrometer the flow-rate was splitted (1:3). To reduce the residual matrix effect reaching the mass spectrometer, a divert valve (Valco, Houston, TX) drained off the LC eluent during the time that interferences were detected in order to avoid contamination of the mass spectrometer. Identification of sugar phosphates was carried out in an API-3000 tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The multiple reaction monitoring (MRM) transitions were 259/97 for glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate (hexose phosphates), 199/97 for glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetonephosphate (triose phosphates), 339/97 for fructose-1,6-bisphosphate and 229/97 for ribose-5-phosphate and xylulose-5-phosphate (pentose phosphates).

Data analysis and statistical methods. *In vitro* experiments were carried out using three cultures each time for each treatment regimen and then repeated twice. Mass spectral analyses were carried out by three independent automatic injections of 1 μL of each sample by the

automatic sampler and accepted only if the sample standard deviation was less than 1 % of the normalized peak intensity. Statistical analyses were performed using the parametric unpaired, two-tailed independent sample *t* test with 95%, 99% and 99.9% confidence intervals and $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ were considered, respectively, to indicate significant differences in glucose carbon metabolism.

RESULTS

Selection of a better CDK4 and CDK6 inhibitor.

Results from CDK6-p16^{INK4a} complex dynamics were used to model the interaction pattern of the putative inhibitors. ACD 3D database (Available Chemical Database 3D) was screened for the search of commercial compounds that matched our query. After docking procedures, several compounds were selected to further experimental kinase assays, being calcein the most active of them.

Calcein inhibits CDK4 and CDK6 activities but does not inhibit CDK1 and CDK2.

To investigate whether calcein produced potential inhibition of CDK4 and CDK6, immunoprecipitations were performed followed by kinase assays in the presence or absence of calcein. A dose-response curve was carried out with increasing doses of calcein from 10 μM to 500 μM (**Figures 1A and 1B**) on immunoprecipitations of CDK6. This led to an *in vitro* IC₅₀ of calcein in these kinase assays of 75 μM . The maximum dose tested, 500 μM , produced a strong inhibition of CDK6, which was comparable to that induced by p16^{INK4A}, the natural inhibitor of CDK4 and CDK6, at a concentration of 3 μM .

Calcein was likely to exert a similar inhibition of CDK4. Therefore, immunoprecipitations of CDK4, cyclin D1 and cyclin D3 were prepared, and kinase assays using the IC₅₀ concentration on CDK6 of 75 μM were carried out (**Figure 1C**). The three immunoprecipitation systems yielded an inhibition of approximately 50% or over, being very similar to the effects observed on the CDK6 immunoprecipitation kinase assay.

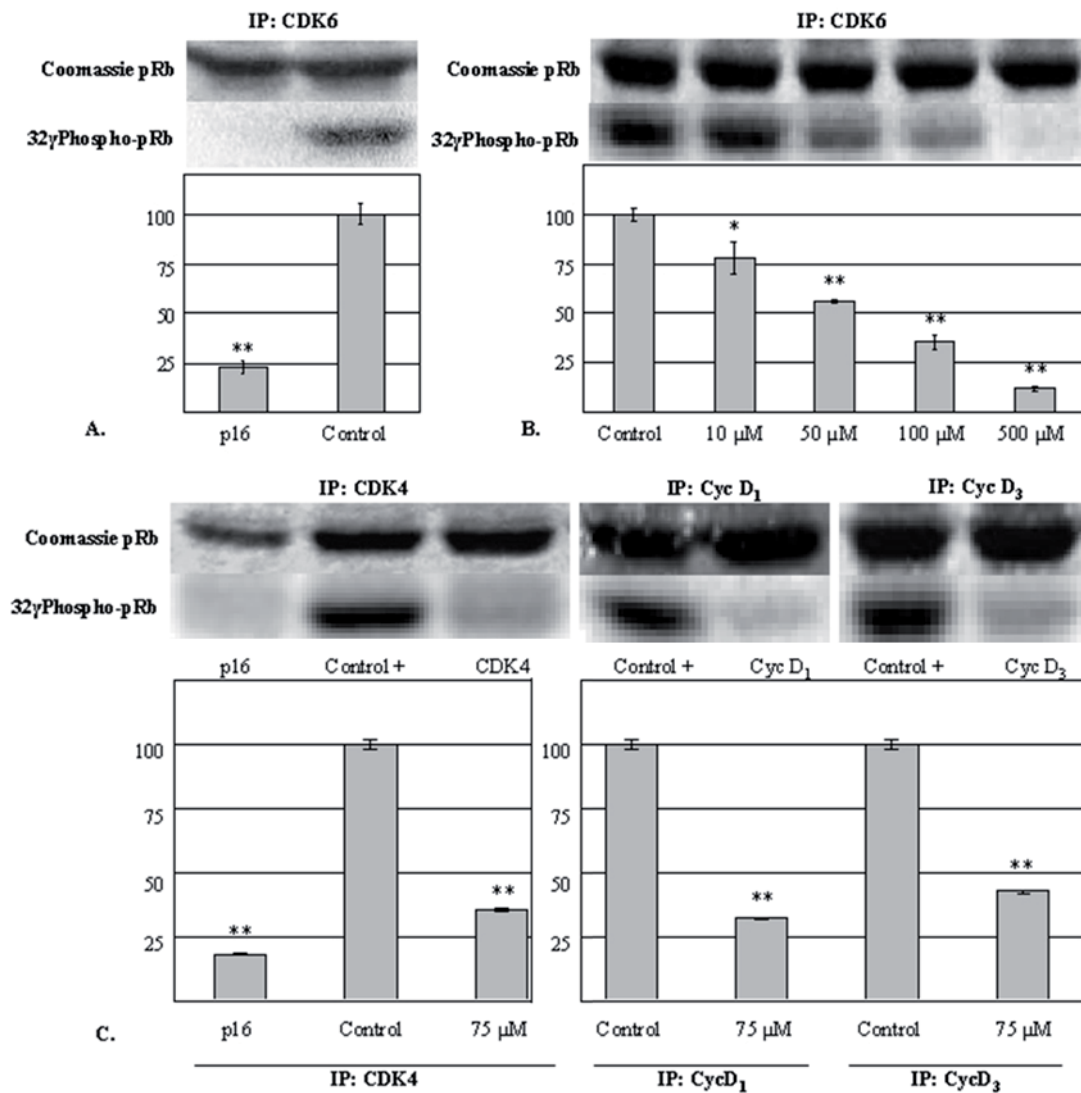


Figure 1. Effects of calcein on kinase assays after CDK6, CDK4, cyclin D1 and cyclin D3 immunoprecipitations **A.** CDK6 activity is inhibited by p16^{INK4A} at 3 μM in these in vitro assays. **B.** Dose-effect curve of non-esterified calcein on CDK6 activity (10 μM to 500 μM). **C.** CDK4, cyclin D1 and cyclin D3 immunoprecipitations and kinase assays tested in the presence of 75 μM of non-esterified calcein (IC₅₀ for the CDK6 kinase assay). pGST-Rb (379-928) fusion protein was used as a substrate and p16^{INK4A} as a positive control of the inhibition. Mean + SD; n = 3. A single asterisk (*) indicates p < 0.05, whereas double asterisks (**) indicate p < 0.01. The experiment was performed 3 times. One representative example is shown in each case.

To test whether the inhibition of calcein was specific for CDK4 and CDK6, the activities of CDK1 and CDK2 were tested in the presence of different concentrations of calcein, using histone H1 as a substrate and p21 as a control (**Figure 2**). In this case, no inhibitory effect on their activities was observed.

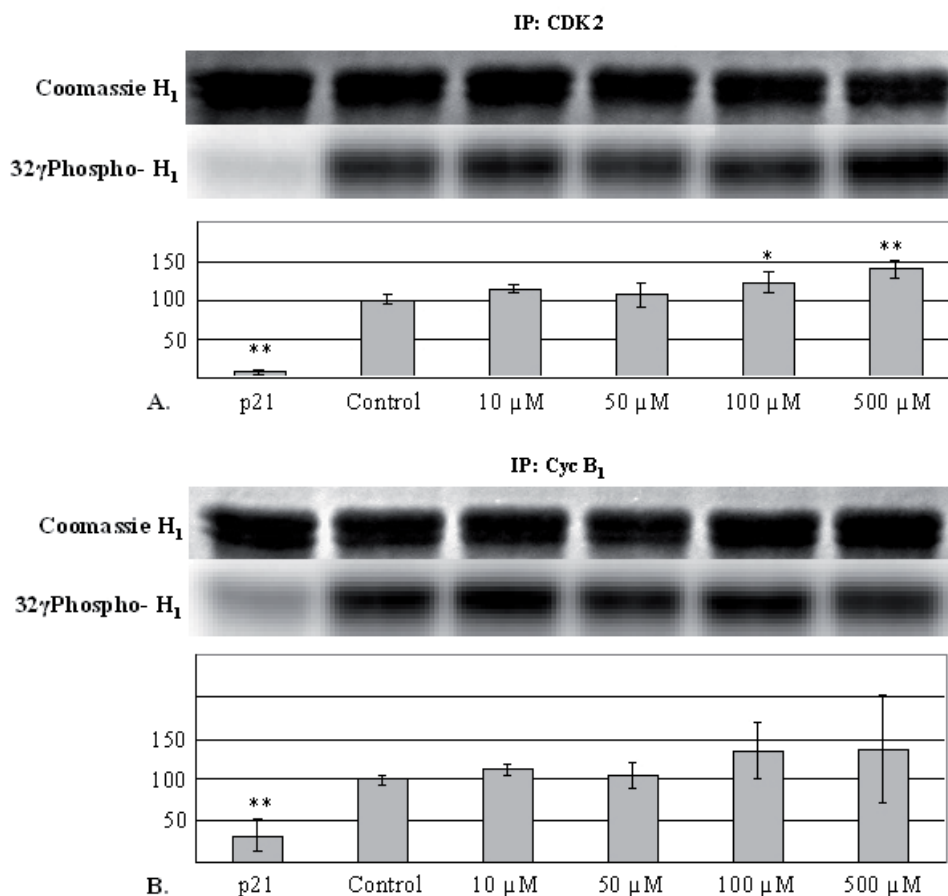


Figure 2. Dose-effect curve of calcein on CDK2 and CDK1 activities. CDK2 and cyclin B1 immunoprecipitations and kinase assays tested in the presence of increasing concentrations of non-esterified calcein (10 μ M to 500 μ M). Histone H1 was used as a substrate and p21 as a positive control of the inhibition. **A.** Immunoprecipitation of CDK2. **B.** Immunoprecipitation of cycB1. Mean + SD; n = 3. A single asterisk (*) indicates $p < 0.05$, whereas double asterisks (**) indicate $p < 0.01$. The experiment was performed 3 times. One representative example is shown in each case.

All these data demonstrate that calcein inhibits CDK4 and CDK6 activities without affecting the activities of other cyclin dependent kinases, like CDK1 and CDK2.

Competition assay confirms that calcein binds to the p16^{INK4A} binding site.

In order to establish whether calcein interacted with CDK4 and CDK6 at the p16^{INK4A} binding site, competition assays were run using immunoprecipitations of CDK6 and incubations with p16^{INK4A} and calcein. As seen in the kinase assays, the concentration of calcein needed to produce a similar inhibition of CDK6 as the one produced by p16^{INK4A} was considerably high. For that reason, we used a high concentration of calcein (2mM) to check the displacement of p16^{INK4A} from CDK6. As shown in **Figure 3**, a high dose of calcein reduced the quantity of p16^{INK4A} that attached itself to the immunoprecipitated CDK6, which meant that calcein was

competing with p16^{INK4A} for its binding site in CDK6, although with a lower affinity than the natural inhibitor. This indicated that the inhibitory effects of calcein on CDK6 activity could be due, as it was expected, to emulation of the effects of p16^{INK4A}, which would make calcein or future derivatives of this molecule very interesting in the study and treatment of tumors that have lost the expression of a functional p16^{INK4A}.

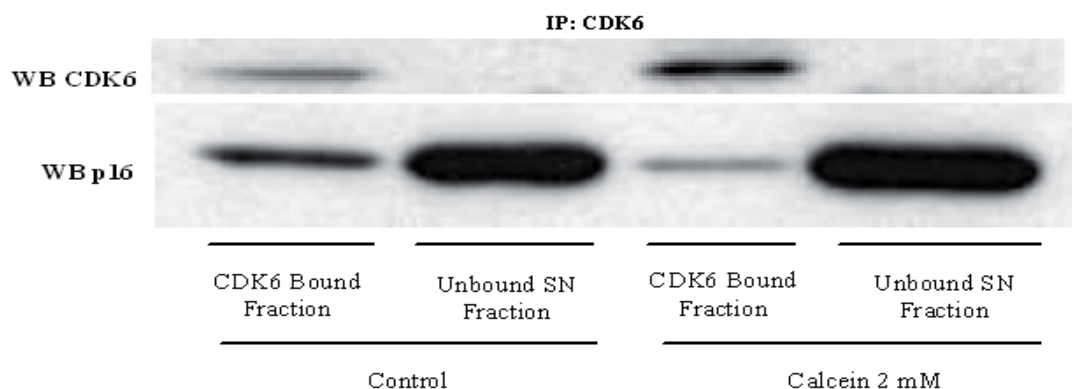


Figure 3. p16 competition assay. p16-specific Western blot image shows how the presence of non-esterified calcein 2 mM diminishes the specific binding of p16^{INK4A} to CDK6, suggesting a competition for the same binding site. The experiment was performed 3 times. One representative example is shown. (SN: supernatant).

Effect of calcein and their esters on cell growth.

Human colon adenocarcinoma HCT116 cells, which have a silenced wild type p16^{INK4A} gene and only express a mutant allele (Myohanen *et al.*, 1998), were incubated with calcein to test if the inhibition of CDK4 and CDK6 was able to compromise cell viability. Thus, a cell viability dose-response curve with the MTT system in microtitre plates was performed. As **Figure 4A** shows, increasing doses of calcein in the media, up to a maximum of 1mM, produced an inhibitory effect on cell growth (IC₅₀ = 400µM). Calcein is hydrophilic and has problems to enter into the cell through the plasmatic membrane. In order to facilitate the entrance of calcein into the cells, MTT assays were also performed with calcein ester-derivatives that increased its lipophilia. These lipophilic derivatives of calcein (esters) are non-fluorescent analogues of fluorescein and quickly enter the cells, as they are lipophilic enough to diffuse through the cytoplasmic membrane. Once inside, they are rapidly hydrolyzed by intracellular esterases into fluorescent hydrophilic non-esterified calcein (Morris, 1990; Weston and Parish, 1990). Therefore, with the esterification of calcein we could manage to introduce a higher proportion of the active molecule inside the cell.

The effects of the acetoxymethyl ester of calcein (calcein/AM) on the cell growth were dramatically increased (~600 times as compared with the non-esterified calcein), with an IC₅₀ of

0.6 μ M and a maximum effect at 2 μ M (Figure 2B). To test the effects of a different ester, we also studied a *tert*-butoxymethyl ester, calcein/tBM, which presented a similar proliferation curve with an IC₅₀ of 80 μ M and a maximum growth inhibition of 80% at 200 μ M.

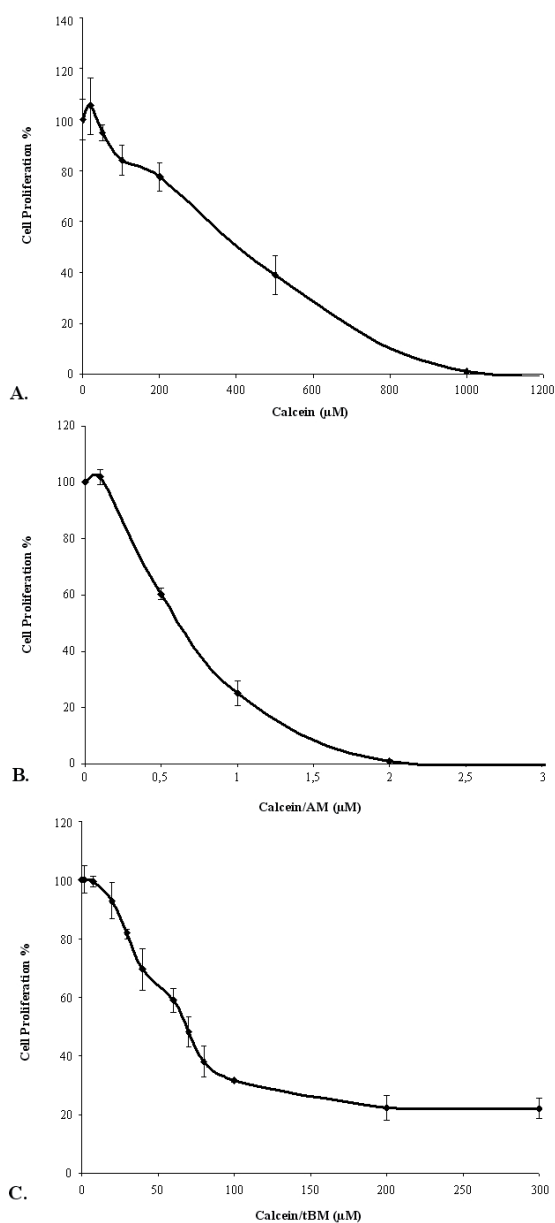


Figure 4. Dose-effect curves of calcein, calcein/AM and calcein/^tBM on cell growth. HCT116 cell cultures were treated with increasing doses of calcein (A) or its esters calcein/AM (B) and calcein/tBM (C), as indicated on the x axis. Their viability and proliferation were determined by formazan dye uptake and expressed as a percentage of untreated control cell proliferation. A. Dose-effect curve of calcein, IC₅₀ = 400 μ M. B. Dose-effect curve of calcein/AM, IC₅₀ = 0.6 μ M. C. Dose-effect curve of calcein/tBM, IC₅₀ = 80 μ M. Mean + SD; n = 3.

Inhibition of CDK4 and CDK6 activity is directly associated with a decrease in pRb phosphorylation and an arrest in G₁.

CDK4 and CDK6 phosphorylate pRb to allow the progression of the cell cycle. To check whether the phosphorylation of pRb was affected by the decrease in CDK4 and CDK6 activity, western blot studies were run with extracts of HCT116 cells that were previously treated with non-esterified calcein (400 μ M and 1 mM) and with calcein/AM (0.6 μ M and 2 μ M) for 24 h. These were blotted against phosphoserine 780 of pRb, which is a specific target for CDK4 and CDK6. **Figure 5 (A and B)** shows how calcein and its ester calcein/AM induced a decrease in the phosphorylation of serine 780 of pRb. To corroborate that this reduction in the phosphorylation of pRb was accompanied by an arrest of the cell cycle in G₁, we analysed the cell cycle of synchronous cells (58% G₁, 32% S and 11% G₂ phase) that were treated with 2 μ M calcein/AM for 24h. As it is shown in **Figure 5C**, 2 μ M calcein/AM produced a strong arrest in G₁ phase after 24 h, while cell cycle of control cells advanced. All these data indicate that the concentration of calcein that strongly inhibited the growth of HCT116 after 72 h of treatment had inhibited CDK4 and CDK6 activities and the specific phosphorylation of pRb and had induced a cell cycle arrest in G₁ phase after 24 h of treatment.

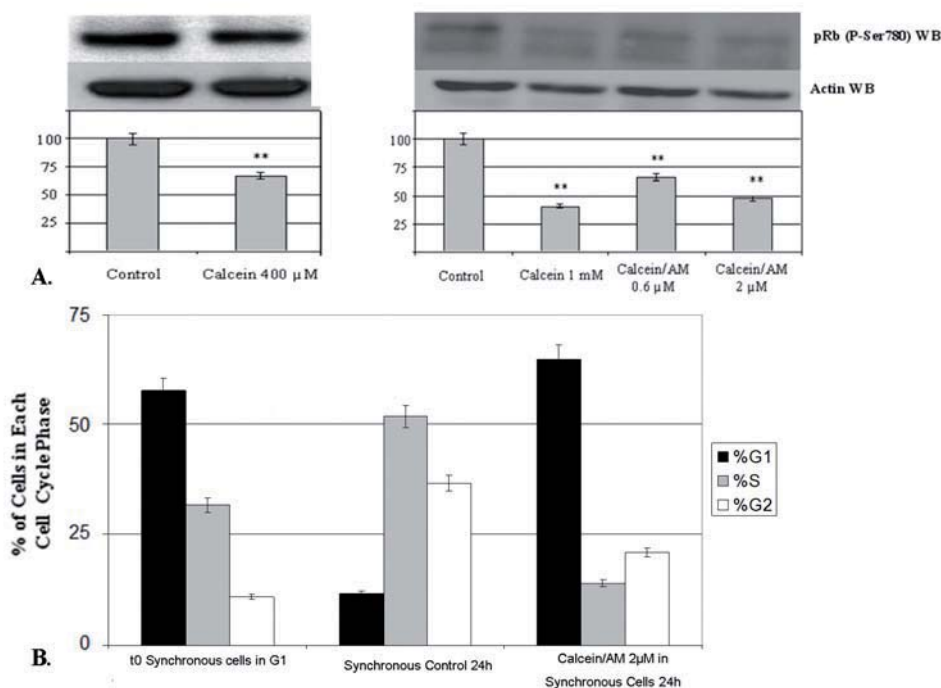


Figure 5. Phosphorylation of pRb serine780 and cell cycle analysis. A-B. HCT116 cells were treated with 400 μ M and 1 mM of calcein or with 0.6 μ M and 2 μ M of calcein-AM for 24 h and the extracts were blotted specifically against phosphoserine 780 of pRb. In Figure A, calcein clearly decreases such phosphorylation after 24 h of treatment. This response is particularly dramatic at 1 mM. Figure A shows too how calcein/AM also decreases the phosphorylation of pRb after 24 h. **B.** Synchronized HCT116 cells

(t0 synchronous control) in G1 and synchronized HCT116 cells in G1 after 24h with or without treatment with Calcein/AM 2 μ M. Calcein/AM produces a strong arrest in G1. A single asterisk (*) indicates $p < 0.05$, whereas double asterisks (**) indicate $p < 0.01$. The experiment was performed 3 times (Mean + SD; n = 3). One representative example is shown in each case.

Cytotoxic effect of calcein/AM.

Clonogenic assays can be performed in order to distinguish if the effects seen during proliferation assays are due to an inhibitor acting as a cytostatic agent (leaving the cell able to proliferate) or as a cytotoxic agent. HCT116 cells were treated with 0.6 μ M calcein/AM for 72h and with 2 μ M calcein/AM for 24h and then left to grow in fresh medium. As **Figure 6** shows, no clones could be formed after these two treatments with calcein/AM, bringing to light that calcein effects on cell proliferation were probably due to cytotoxic properties of this compound.

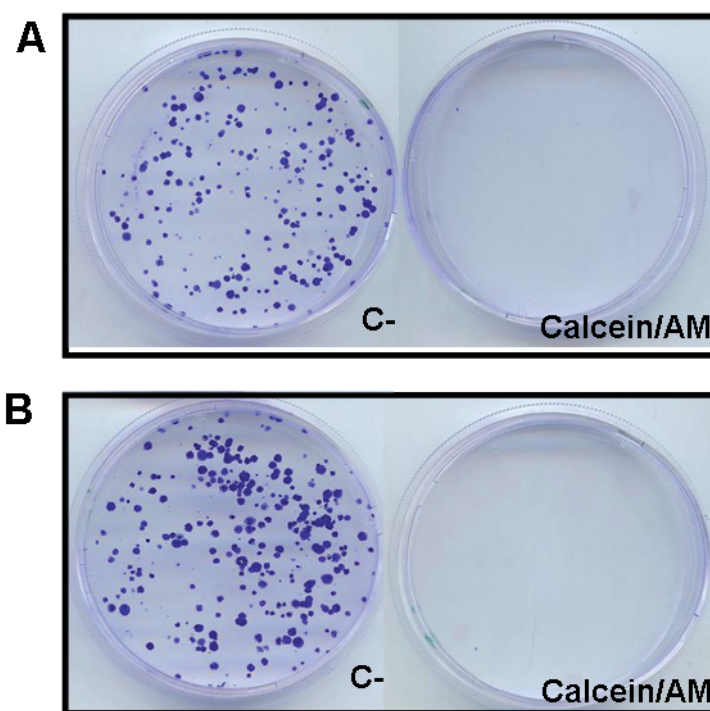


Figure 6. Clonogenic assay on HCT116 cells. The cells were treated with **A.** IC₅₀ of calcein/AM during 72 h and **B.** IC₁₀₀ of calcein/AM during 24 h. The viable clones proliferate and form clones that are then dyed with crystal violet .

Effect of calcein/AM at metabolic level on HCT116 cells.

HCT116 human colon adenocarcinoma cells were incubated with 10mM glucose 50% enriched in [1,2-¹³C₂]-D-glucose and were exposed for 72h to increasing concentrations of

calcein/AM: IC₂₅ (0.36 μM), IC₅₀ (0.61 μM) and IC₇₅ (1.0 μM), determined previously after 72 h of treatment. As shown in **Figure 7A**, increasing concentrations of calcein/AM produced a dose-dependent decrease in cell proliferation. Consequently, the increasing doses of calcein/AM also provoked a dose dependent diminution of glucose consumption and lactate production (**Figures 7 B and 6C**).

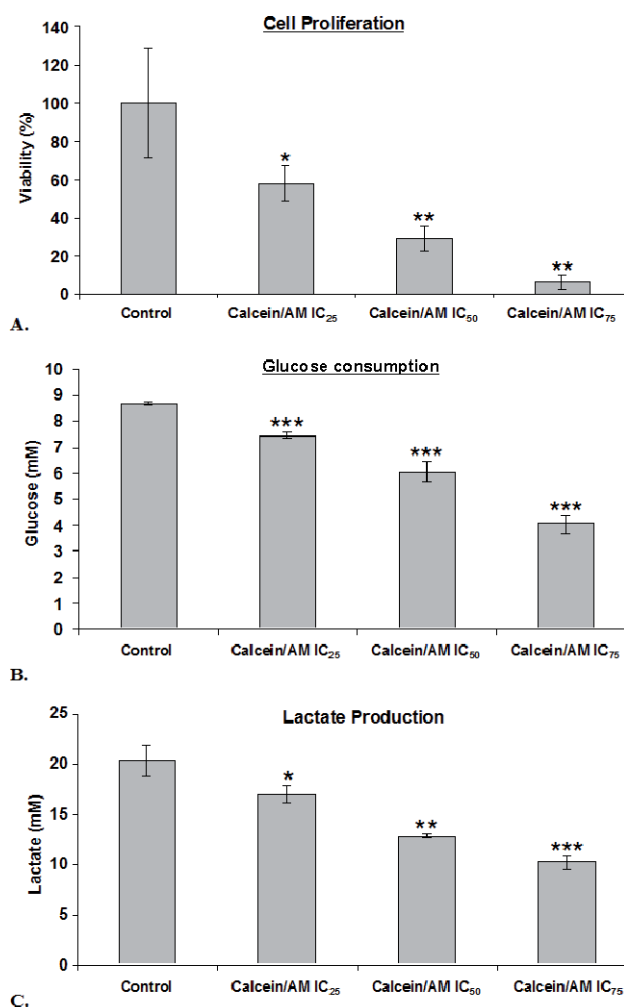


Figure 7. Effect of calcein/AM on cell proliferation, glucose uptake and lactate production. **A.** Cell proliferation of HCT116 after 72h under different concentrations IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅ of calcein/AM (0.36 μM, 0.61 μM and 1.0 μM respectively). **B.** Glucose consumption after 72h and an initial concentration of glucose in the medium of 10mM. **C.** Lactate production after 72h. (MEAN + S.D.; *n* = 9; *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001).

Lactate labelling from [1,2-¹³C₂]glucose was measured using GC/MS. **Figure 7A** shows a graphical representation of the distribution of the different isotopomers of lactate, m1 and m2, obtained from the labelled glucose normalized with the summatory of the molar fractions of all

the labelled species of lactate (Σm). m_2 is originated from glucose that is converted to lactate directly by glycolysis, whereas m_1 is originated from glucose metabolized by direct oxidation via the oxidative steps of the pentose phosphate pathway and then recycled to glycolysis via the non-oxidative pentose pathway. The increase of calcein/AM brought along a decrease of $m_1/\Sigma m$ and an opposite increase of $m_2/\Sigma m$. This drop of $m_1/\Sigma m$ indicated a reduction of the contribution of the oxidative pentose phosphate pathway flux in lactate synthesis. Another way to represent this effect is graphed in **Figure 8B**. The relative amount of glucose that is converted indirectly to lactate through the pentose cycle as a percentage of the glycolytic flux (Pentose Cycle Activity) can be calculated from the $(m_1/m_2)/(3+(m_1/m_2))$. A dose dependent reduction in the pentose cycle activity was observed in HCT116 cells treated with growing doses of calcein/AM, reaching a 19% of diminution in the condition where the cells were treated with an IC_{75} concentration. This lessening of the Pentose Cycle Activity indicator strengthened the hypothesis of a reduction of the oxidative pentose phosphate pathway flux and a decrease of its contribution to new glucose metabolism.

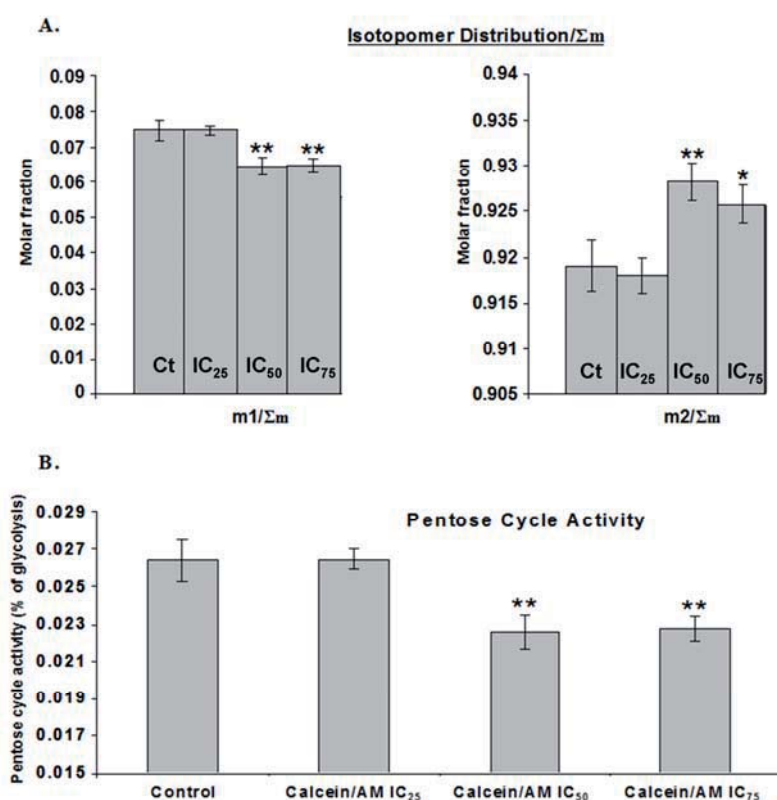


Figure 8. Effect of calcein/AM on lactate isotopomers from $[1,2-^{13}C_2]$ glucose. **A.** This is a graphical representation of the distribution of the different isotopomers of lactate m_1 and m_2 obtained from the glucose label normalized with the summatory of the molar fractions of all the labelled species of lactate (Σm). **B.** The pentose cycle activity is defined as a percentage of the glycolytic flux calculated from $(m_1/m_2)/(3+(m_1/m_2))$. (MEAN + S.D.; $n = 9$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Calcein/AM treatment in HCT116 cells resulted also in a slight decrease of the ^{13}C from glucose that was incorporated into nucleic acid ribose (see **Figure 9A**). The average number of ^{13}C atoms per ribose molecule was reduced 20% by the IC_{75} concentration treatment. Since calcein/AM treatment seemed to slow down the oxidative PPP (lactate $m1/\Sigma m$ isotopomer data in **Figure 8A**), the reduction of ribose synthesis in HCT116 cells could be caused by reduced substrate flux through the oxidative steps of the pentose cycle. The isotopomer pattern distribution in RNA ribose has been plotted in **Figure 9B** as normalized with the summatory of the molar fractions of all the labelled species of ribose (Σm). Calcein/AM treatment in HCT116 cells caused a dose dependent $m1/\Sigma m$ decrease as well as a linear increase of $m2/\Sigma m$ ribose. This was in accordance to the results obtained in lactate measurements (see **Figure 8B**) and denoted a clear attenuation of the flux through the oxidative PPP.

To provide information on the relative importance of the two pathways of pentose phosphate production to the growth phenotype of the cell we used phenotypic phase-plane analysis. Phenotypic phase-plane analysis is the analysis of substrate production and utilization of cells, and is an important aspect of reaction network analysis (Edwards *et al.*, 2002; Lee, 2006). **Figure 9C** contains the phase-plane analysis of the normalized ribose isotopomers $m1$ and $m2$, where values for oxidative ribose synthesis are plotted against non-oxidative ribose synthesis. The line of optimality is arbitrarily defined as the line drawn through the point for the basal state (Ct-Control treatment) corresponding to conditions satisfying the optimal conditions for growth (objective function). The slope of the line represents the optimal ratio of ribose formed through the oxidative pentose phosphate pathway to a given level of non-oxidative ribose synthesis for the tumor cells. When a line is drawn from a phenotype (a point on the phase plane) in parallel to the major axis, the intersection between the line of optimality and the parallel line indicates the degree of optimality relative to the basal state. Using metabolic phenotype phase plane analysis, we saw that increasing doses of calcein/AM resulted in a more dramatic imbalance between oxidative/non oxidative pentose phosphate pathways.

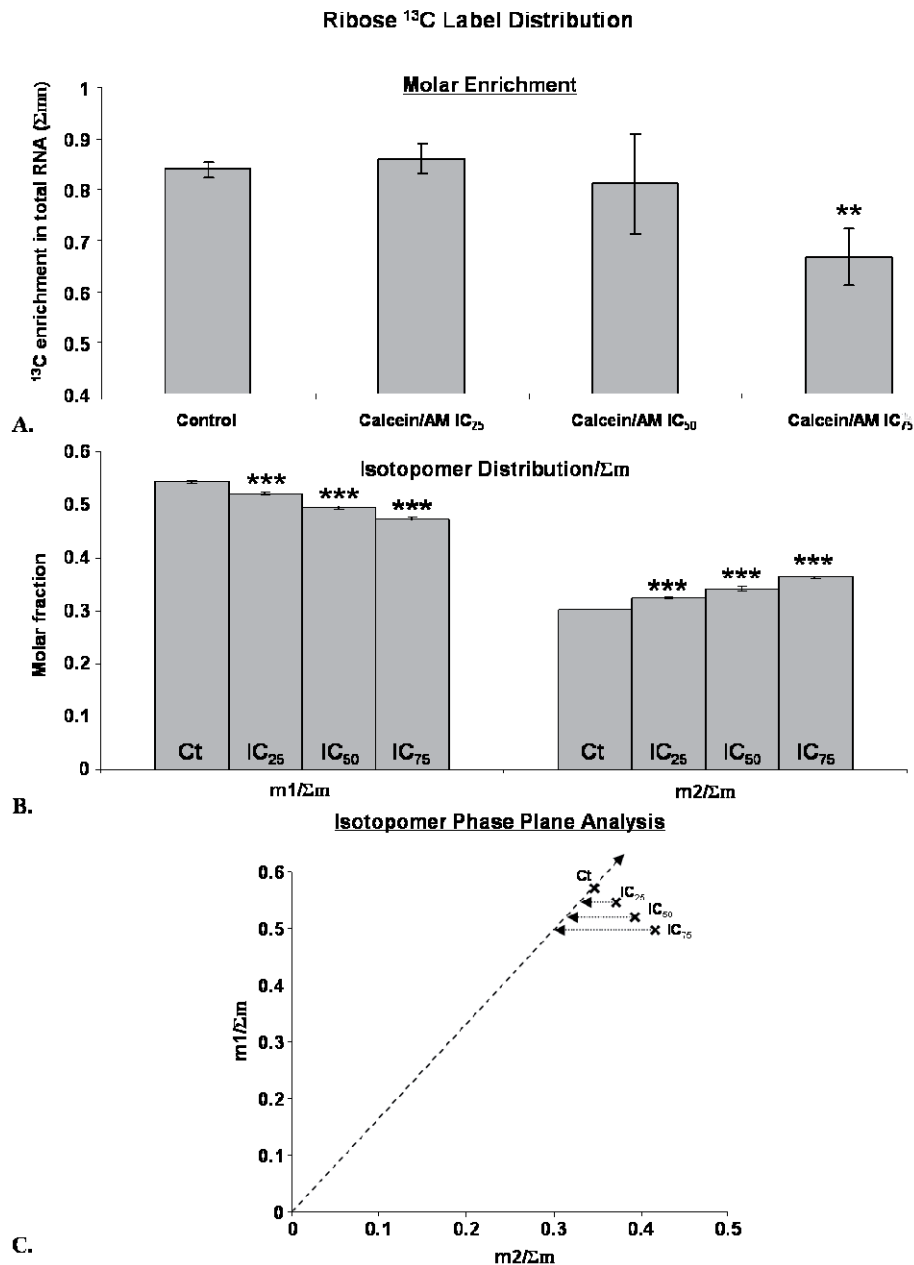


Figure 9. Effect of calcein/AM on ribose synthesis. A. Σmn represents the molar enrichment of ^{13}C in ribose for each condition and is indicative of the ribose that is synthesized *de novo* from glucose. B. Ribose isotopomers obtained from the experiment with glucose label are shown normalized with the summatory of the molar fractions of all the labelled species of ribose (Σm). The m2 isotopomers of ribose are indicative of the non-oxidative pentose phosphate pathway flux, whereas the m1 isotopomers indicate the oxidative combined with the non-oxidative pentose phosphate pathway flux producing ribose. C. Phase plane analysis of the normalized ribose isotopomers m1 and m2. (MEAN + S.D.; $n = 9$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Metabolic effect of CDK4, CDK6 and CDK2 depletion on glucose uptake and lactate production.

To check if the metabolic profile on HCT116 cells treated with calcein/AM was characteristic of the inhibition of the G1/S transition CDKs, we characterized the metabolic profile of the mouse embryonic fibroblasts (MEF) knockout in CDK4, CDK6 and CDK2, which were immortalized and proliferated despite they did not have CDK4, CDK6 and CDK2 activities. These MEF constituted a new additional tool which could better elucidate the effects of the permanent absence of these CDKs *in vivo* and their contributions to cell cycle progression and the robust tumor metabolic adaptation.

First of all, we performed western blot assays with control (Ct) and double and triple knock out (DKO and TKO) MEF cells to confirm the deletion of the kinases (**Figures 10A and B**). Glucose consumption and lactate production were also assayed in both cell lines, being observed that both were lower in MEF TKO than in MEF Ct cells (**Figures 10C and 10D**). These results indicate a reduction in the glycolytic flux in cells without CDK4, CDK6 and CDK2.

When MEF were incubated with [1,2-¹³C₂]-D-glucose, the deletion of CDK4, CDK6 and CDK2 reduced m1 lactate (2.22 ± 0.16 % in MEF Ct and 1.81 ± 0.70 % MEF TKO), indicating a reduced use of the oxidative pathway of PPP in lactate synthesis. In addition, a reduction in the pentose cycle activity was observed in MEF TKO cells, reaching a 32.5% of decrease when CDK4, CDK6 and CDK2 were absent (**Figure 10E**). This lessening of the Pentose Cycle Activity indicator strengthened the hypothesis of a reduction of the oxidative pentose phosphate pathway flux and a decrease of its contribution to new glucose metabolism.

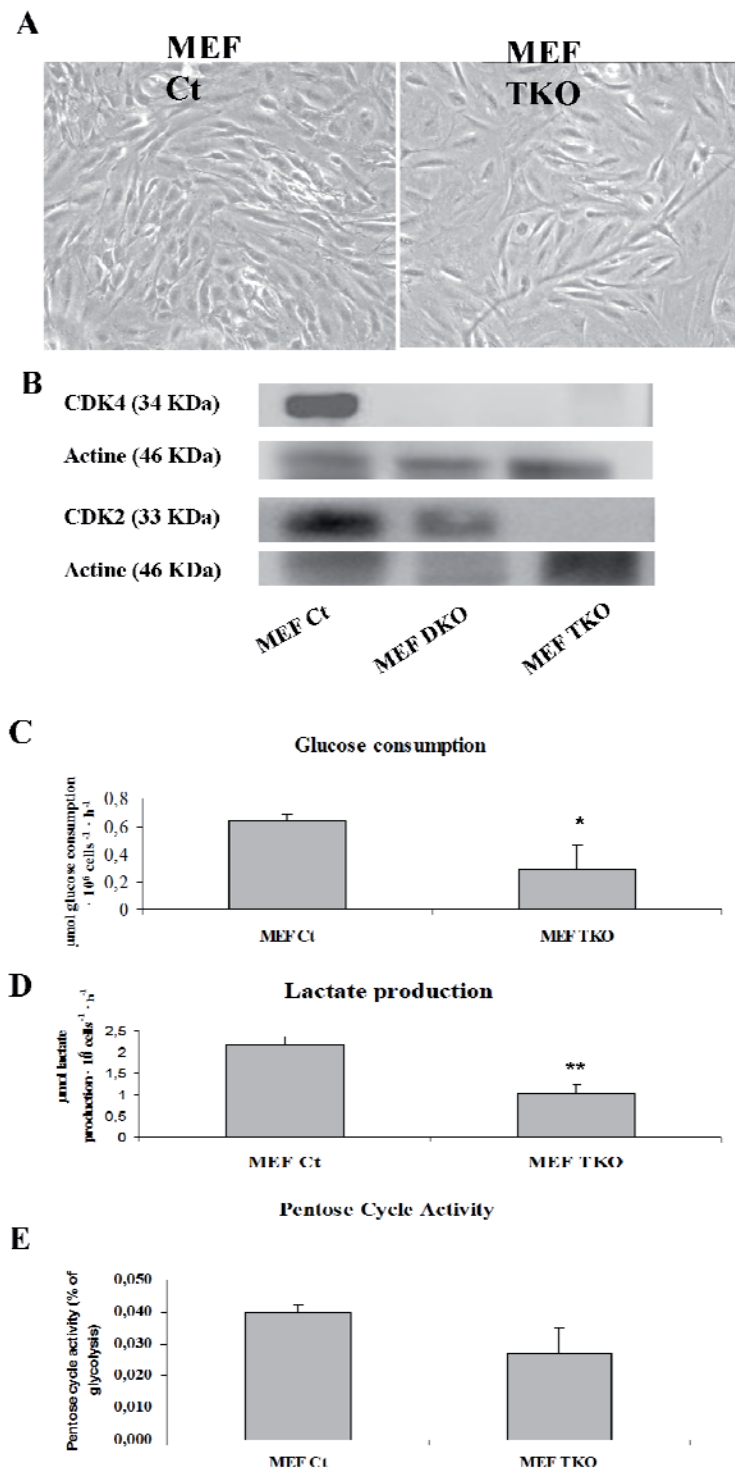


Figure 10. A. Cell proliferation of 500,000 mouse embryonic fibroblast control and mouse embryonic fibroblast knock out in CDK4, CDK6 and CDK2 seeded 48h before of the picture (10x) **B.** Western blot of CDK4 and CDK2 of MEF Control, MEF DKO (Santamaria and Ortega, 2006) or MEF TKO. **C.** Determination of glucose consumption of MEF Ct and MEF TKO. **D.** Determination of lactate production of MEF Ct and MEF TKO. **E.** Effect of CDK4, CDK6 and CDK2 deletion on lactate isotopomers from $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ glucose. The pentose cycle activity is defined as a percentage of the

glycolytic flux calculated from $m1/m2 / 3 + m1/m2$. (MEAN + S.D.; $n = 9$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

To study in depth if the deletion of CDK4, CDK6 and CDK2 affected the pentose phosphate pathway, the molar enrichment and the major isotopomers of ribose were studied: m1 ribose (formed when $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -D-glucose is decarboxylated through the oxidative branch of the PPP) and m2 ribose (synthesized through the reversible non-oxidative branch of the cycle) (**Figures 11A and 11B**). Deletion of CDK4, CDK6 and CDK2 resulted in a decrease in the $m1/\Sigma m$ isotopomer (0.45 ± 0.002 % in MEF Ct vs 0.41 ± 0.002 % in MEF TKO), which indicated a decrease in the use of the oxidative branch of the PPP. Similarly, the oxidative/non-oxidative ratio of PPP that was calculated as it is described in *Materials and Methods* section (Ramos-Montoya *et al.*, 2006), was also significantly lower (14%) for MEF TKO (0.78 ± 0.00) than for the control ones (0.91 ± 0.01). This ratio has been reported to be higher in tumor cells vs. normal cells.

In addition, and accordingly with the lower proliferation rate (MEF Ct: 0.26 h^{-1} and MEF TKO: 0.12 h^{-1}), the total label incorporation in ribose or ^{13}C ribose enrichment was significantly lower in MEF TKO than in MEF Ct cells (**Figure 11A**). Moreover, the isotopomer pattern distribution in RNA ribose plotted in **Figure 11B** as normalized with the summatory of the molar fractions of all the labeled species of ribose (Σm) shows that the depletion of CDK4, CDK6 and CDK2 caused a significant $m1/\Sigma m$ decrease as well as a significant increase of $m2/\Sigma m$ ribose. This was in accordance to the results obtained in lactate measurements (see **Figure 10E**) and denoted a clear attenuation of the flux through the oxidative pentose phosphate pathway.

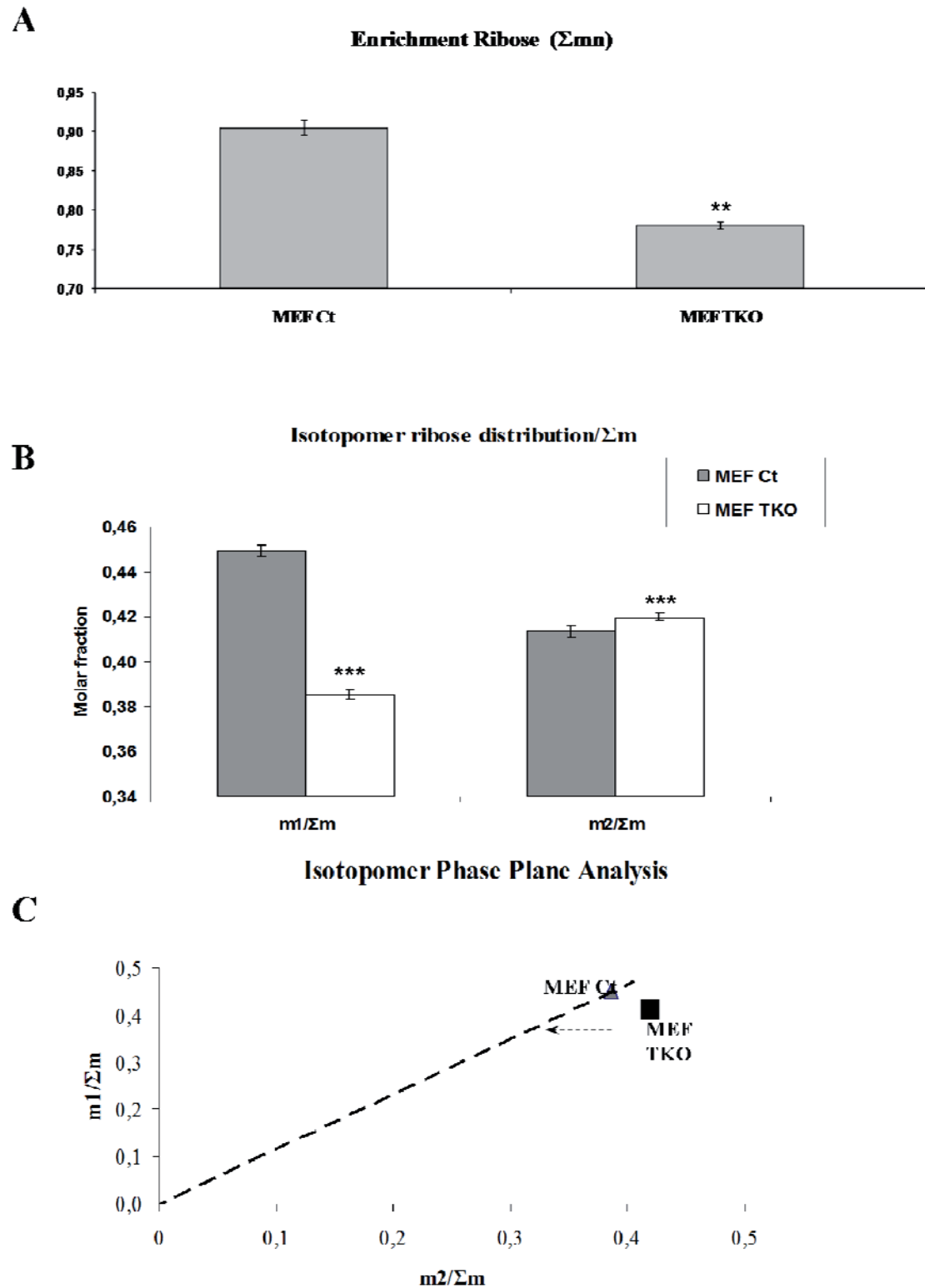


Figure 11. Ribose ^{13}C label distribution. **A.** Total ^{13}C ribose enrichment from labeled glucose of the different treatments was calculated as $\Sigma_{mn}=m1+2\times m2+3\times m3$. **B.** Ribose isotopomers obtained from the experiment with glucose label are shown normalized with the summatory of the molar fractions of all the labeled species of ribose (Σm). The m2 isotopomers of ribose are indicative of the non-oxidative pentose

phosphate pathway flux, whereas the m1 isotopomers indicate the oxidative combined with the non-oxidative pentose phosphate pathway flux producing ribose. **C.** Phase plane analysis of the normalized ribose isotopomers m1 and m2. $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were considered to indicate significant differences.

According to these data, the representation of $m1/\sum m$ vs $m2/\sum m$ in a phenotypic phase plane analysis confirmed the same tendency as in calcein/AM treated cells: the deletion of the cyclin dependent kinases, which phosphorylate pRb, caused an unbalance of the PPP towards the non-oxidative branch (**Figure 11C**).

Sugar phosphate pool decreases when cell cycle does not progress.

When there is an important variation in metabolic distribution, the analysis of sugar phosphates is very interesting, as these variations are usually reflected in the absolute concentrations of the intermediary sugar phosphates. Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry allowed us to resolve sugar phosphate pools. After treating HCT116 cells with IC_{50} of calcein/AM (0.6 μ M) or studying the MEF TKO cell line, pentose phosphate, triose phosphate and hexose phosphate pools were quantified (**Figure 12**). In both cases the profile of intermediary sugar phosphates was quite similar. Phosphate intermediaries' concentrations varied little between MEF control and MEF TKO. A decrease of almost all the phosphate intermediaries (except hexose-6phosphate) was seen when MEF TKO were tested through LCMS, demonstrating that the arrest in G1 phase of the cell cycle generally decreased the concentration of sugar phosphates. Once again, this profile corresponded with that observed in HCT116 cells treated with IC_{50} of calcein/AM (0.6 μ M) during 72h. Interestingly, pentose phosphate's intracellular concentration was decreased, although not significantly, when cell cycle was arrested in G1.

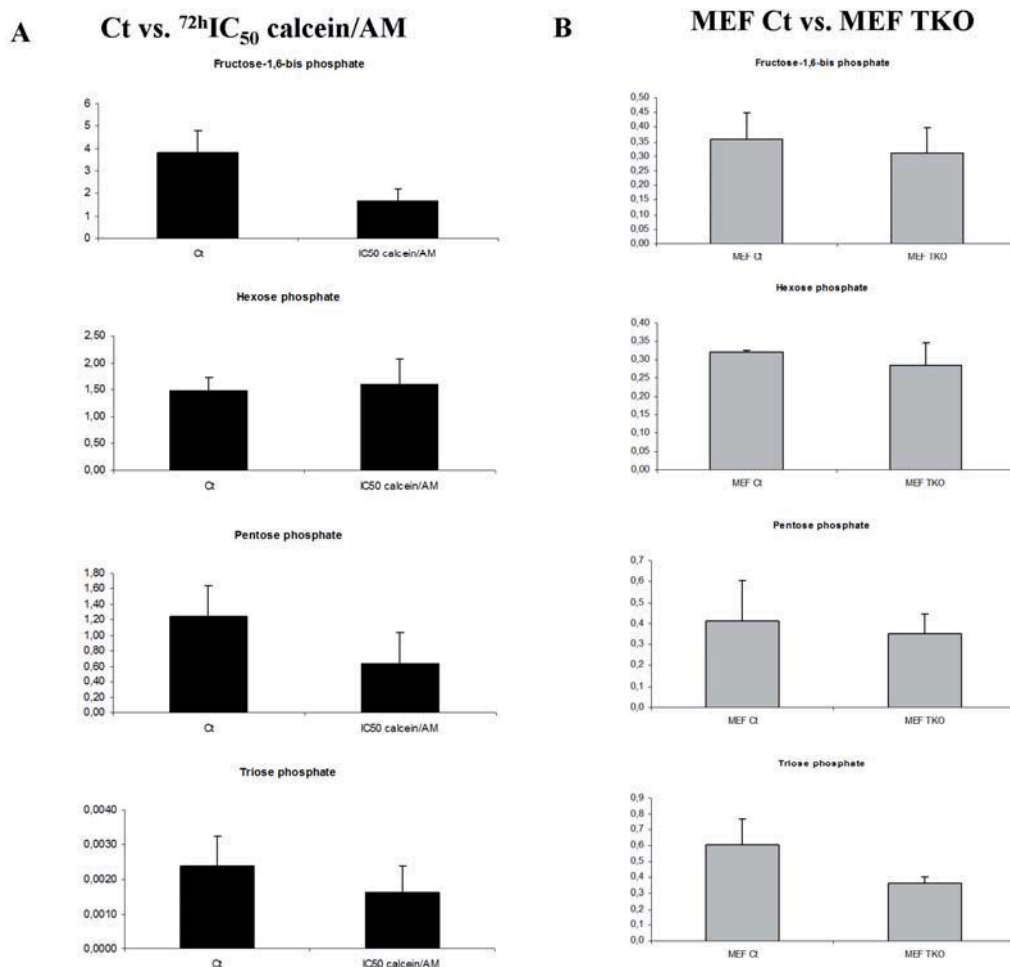


Figure 12. Phosphate intermediaries. Concentrations of Fructose-1,6-bisphosphate, Trioses Phosphate (Glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetonephosphate), HexP (hexoses phosphate: glucose-6 phosphate and fructose-6 phosphate) and PenP (pentoses phosphate: ribose-5 phosphate and xylulose-5 phosphate) were determined by LC/MS. Sugar phosphate concentration is expressed as ppm×mg/protein. **A.** Sugar phosphate determination in calcein/AM IC₅₀ concentration (0.6μM) treated HCT116 cells during 72h. **B.** Sugar phosphate determination in MEF Ct and MEF TKO after 72h in culture.

DISCUSSION

Evidence indicates that CDK4 and CDK6 are excellent targets in the design of new antitumor drugs (Miliani de Marval *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2002) (Lukas *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1995) (Landis *et al.*, 2006; Schreiber *et al.*, 1999 {Yu, 2006 #30) (Malumbres and Barbacid, 2006; Marzec *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006). However, the design of good specific inhibitors against the activity of these kinases has not been successful until now. The first reported pharmacological CDK inhibitors (6-dimethylaminopurine and isopentenyladenine) were neither particularly active nor selective. Nevertheless, they offered the first example of

inhibitory structures, and represented the beginning of a search for more potent and selective inhibitors (Knockaert *et al.*, 2002). Since then, different strategies have been employed in the search for good inhibitors: most notably, the prevention of cyclin–CDK interaction using peptidomimetics or multifunctional chemical structures (Noble and Endicott, 1999), the prevention of CDK inhibitor (CKI) degradation, and the restoration of CKI function by gene therapy (Sandig *et al.*, 1997) or by the use of peptidomimetics (Fahraeus *et al.*, 1998). Furthermore, small synthetic peptides have also been confirmed as having *in vitro* efficacy (Fahraeus *et al.*, 1996). The two only specific CDK4 and CDK6-selective inhibitors on clinical trials, PD 0332991 and P1446A-05, hinder the interaction of ATP with the ATP-binding site of the CDK4 and CDK6 kinases, impeding the activation of the complexes cyclin D-CDKs (Fry *et al.*, 2004; McInnes, 2008; Menu *et al.*, 2008; Toogood *et al.*, 2005; VanderWel *et al.*, 2005). The design of inhibitors following this strategy carries out a lot of side-effect due to its inespecificity (Lander *et al.*, 2001). Thus, there is emerging interest in developing other strategies to search selective inhibitors of CDK4 and CDK6 for cancer chemotherapy (Mahale *et al.*, 2006).

Herein, we present a new set of bioinformatic tools that has been used to obtain CDK4 and CDK6 inhibitors that mimic the natural inhibitor of CDK4 and CDK6, p16^{INK4a}. Using these tools calcein was found as a possible inhibitor of CDK4 and CDK6 enzymes. Calcein is a fluorescent dye that localizes intracellularly after esterase-dependent cellular trapping and has shown cytotoxic activity against various established human tumour cell lines at relatively low concentrations (Jonsson *et al.*, 1996; Liminga *et al.*, 2000). In addition to its use as a fluorescent tag, it has been established that calcein/AM, the acetoxymethyl ester of calcein, is cytotoxic at very low concentrations (approximately 2.5 μM) in human tumour cell lines (Liminga *et al.*, 1995) and in primary cultures of human tumour cells (Jonsson *et al.*, 1996) (Liminga *et al.*, 2000). According to our results, ester forms of calcein penetrated easily HCT116 cells, inhibiting cell proliferation at relatively lower doses (acetoxymethyl ester, $\text{IC}_{50} = 0.6 \mu\text{M}$ and *tert*-butoxymethyl ester, $\text{IC}_{50} = 80 \mu\text{M}$) compared with the non-sterified calcein ($\text{IC}_{50} = 400 \mu\text{M}$). Using kinase assays with HCT116 cells we have proved that calcein (the active form inside the cell of the calcein/AM ester) specifically inhibited CDK4 and CDK6 (cyclin D-related activities), inducing inhibition of pRb phosphorylation, and did not affect CDK2 and CDK1 activities. Phosphorylation and inactivation of the pRb and subsequent induction of the E2F-dependent transcriptional program is required for entering S-phase (Lundberg and Weinberg, 1998; Malumbres *et al.*, 2004). These evidences confirmed the potential of calcein to arrest cell cycle in G₁ phase, thus avoiding the entrance in S phase of the cell cycle. This potential was validated, as calcein/AM treatment on HCT116 cells provoked a strong G₁- phase

cell cycle arrest. Therefore, calcein would not be a pan-CDK inhibitor, but a specific inhibitor for CDK4 and CDK6.

Some studies have demonstrated that calcein/AM-induced tumor cell death is the result of rapid inhibition of DNA synthesis and partial depolarization of the mitochondrial membrane, followed by activation of the caspase cascade and nuclear fragmentation. This chain of events is consistent with the induction of programmed cell death and classical apoptosis (Liminga *et al.*, 1999). Ten years ago, Liminga *et al.* found that calcein/AM provoked a strong apoptotic response within hours of exposure and tested it in a panel of 10 different cell lines, but they failed to find its precise mechanism of action (Liminga *et al.*, 1999; Liminga *et al.*, 2000; Liminga *et al.*, 1995). However, so far no one had found the mechanism of action of calcein/AM that induces cell proliferation inhibition. Herein, we have demonstrated that calcein/AM inhibits specifically cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4 and CDK6) with no cross reaction with other important cell cycle kinases, as CDK1 or CDK2.

In this paper we have also wanted to characterize the effects of CDK4 and CDK6 inhibition over the metabolic profile of the tumor cell line HCT116 in depth using a tracer-based metabolomics approach. We have previously demonstrated that the balance between oxidative and non-oxidative branches of the pentose phosphate pathway is essential to maintain proliferation in cancer cells and is a vulnerable target within the cancer metabolic network for potential novel therapies in overcoming drug resistance (Ramos-Montoya *et al.*, 2006). Our results here showed that the higher calcein/AM concentration was, the stronger the imbalance of PPP in favour of the non-oxidative branch became. Using metabolic phenotype phase-plane analysis we inferred that the most efficient doses of calcein/AM in the inhibition of tumour cell growth resulted in a more dramatic imbalance between oxidative and non oxidative PPP. The perturbation of this unbalance results in metabolic inefficiency and consequently could cause a pause of cell proliferation or even cell death. Moreover, the Σ_{mn} , which reflects the synthesis *de novo* of ribose, decreased with the treatment accordingly with the lower proliferation of treated cells.

Equally, we characterized the metabolic profile of the cell line MEF TKO, which was triple knock out for CDK4, CDK6 and CDK2, and was compared with its control cell line. The lack of functionality of CDK4, CDK6 and CDK2 induced a metabolic profile in fibroblasts that correlated with the alterations in the metabolic profile induced by calcein/AM on tumour cells. These results confirmed that the metabolic alterations induced by calcein/AM in HCT116 cells were due to the specific inhibition provoked by this compound in CDK4 and CDK6 activities, strengthening our hypothesis that inhibition of CDK4 and CDK6 was the responsible for the

oxidative/non-oxidative imbalance in PPP induced by calcein. The balance between oxidative and non-oxidative branches is not constant during cell cycle progression, as it increases progressively in S and G2 phase. This means that the contribution of the oxidative branch to ribose-5-phosphate synthesis is relatively increased when the cycle progresses through the S phase (Vizan *et al.*, 2009). In this article, the results supported this statement, showing a decrease of this balance when HCT116 cells were treated with calcein/AM or when MEF did not have CDK4, CDK6 and CDK2 and progressed slower through the cell cycle. Moreover, ¹³C incorporation from glucose in RNA ribose was lower both in HCT116 treated with calcein/AM and in MEF knocked out for CDK4, CDK6 and CDK2, indicating that ribose-5-phosphate synthesis decreases when the entrance of the cell into S phase is inhibited. Additionally, in this work we have also shown that the imbalance in PPP induced by the inhibition of CDK4 and CDK6 provoked an imbalance in the overall central carbon metabolic network of the cell. This imbalance was reflected in the alteration of the levels of intermediary sugar phosphates.

It has been previously postulated that the forced unbalance of the PPP towards the oxidative branch is a possible Achilles' heel in the robust tumor metabolic adaptation. In this way, it has been shown that effective antitumor strategies against this target can be designed, not only with drugs that force this imbalance even further (Ramos-Montoya *et al.*, 2006), but also by means of drugs that recover the oxidative/non-oxidative balance existing in the non-tumour cells. In this way, the inhibition of PPP using inhibitors of the glucose-6-phosphate dehydrogenase and transketolase enzymes provokes a perturbation of the imbalance between the two branches of the PPP, inducing cell death (Ramos-Montoya *et al.*, 2006). The work presented here demonstrates that the inhibition of CDK4 and CDK6 using calcein/AM not only inhibited the progression of cell cycle but also disrupted this oxidative/non oxidative imbalance of PPP, which has been described as essential for tumor proliferation, reinforcing the interest of CDK4 and CDK6 as a targets in cancer therapy.

To sum up, the results presented here support the need of developing new CDK4 and CDK6 inhibitors, not only for their potential to arrest cell cycle in G1 phase, but also for their metabolic effects. Therefore, these inhibitors present a double interest as antitumor strategy, as two critical characteristics of tumors will be attacked simultaneously, increasing the effect on the impediment of tumor progression. Furthermore, in this study we suggest that calcein, which could stop division cells as well as kill them, could be a "lead" for the development of a new family of selective cyclin D-dependent kinases inhibitors that are based on its structure.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by grants SAF2008- 490 00164 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and ISCIII-RTICC (RD06/0020/0046) from the Spanish government, from the European Union FEDER funds and from the European Commission (FP7) Etherpaths KBBE-grant agreement no.222639. It has also received financial support from the Government of Catalonia (2005SGR00204). One of us (M. Z.) acknowledges the Generalitat de Catalunya for the predoctoral fellowship.

BIBLIOGRAPHY

- Baughn, L.B., Di Liberto, M., Wu, K., Toogood, P.L., Louie, T., Gottschalk, R., Niesvizky, R., Cho, H., Ely, S., Moore, M.A., *et al.* (2006). A novel orally active small molecule potently induces G1 arrest in primary myeloma cells and prevents tumor growth by specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6. *Cancer Res* **66**, 7661-7667.
- Boros, L.G., Puigjaner, J., Cascante, M., Lee, W.N., Brandes, J.L., Bassilian, S., Yusuf, F.I., Williams, R.D., Muscarella, P., Melvin, W.S., *et al.* (1997). Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res* **57**, 4242-4248.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Comin-Anduix, B., Boros, L.G., Marin, S., Boren, J., Callol-Massot, C., Centelles, J.J., Torres, J.L., Agell, N., Bassilian, S., and Cascante, M. (2002). Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *J Biol Chem* **277**, 46408-46414.
- Edwards, J.S., Ramakrishna, R., and Palsson, B.O. (2002). Characterizing the metabolic phenotype: a phenotype phase plane analysis. *Biotechnol Bioeng* **77**, 27-36.
- Endicott, J.A., Noble, M.E., and Tucker, J.A. (1999). Cyclin-dependent kinases: inhibition and substrate recognition. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 738-744.
- Ezhevsky, S.A., Ho, A., Becker-Hapak, M., Davis, P.K., and Dowdy, S.F. (2001). Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Mol Cell Biol* **21**, 4773-4784.
- Fahraeus, R., Lain, S., Ball, K.L., and Lane, D.P. (1998). Characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a model for a synthetic tumour suppressor molecule. *Oncogene* **16**, 587-596.
- Fahraeus, R., Paramio, J.M., Ball, K.L., Lain, S., and Lane, D.P. (1996). Inhibition of pRb phosphorylation and cell-cycle progression by a 20-residue peptide derived from p16CDKN2/INK4A. *Curr Biol* **6**, 84-91.
- Frangioni, J.V., and Neel, B.G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* **210**, 179-187.

- Fry, D.W., Harvey, P.J., Keller, P.R., Elliott, W.L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W.R., Pryer, N.K., *et al.* (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* **3**, 1427-1438.
- Graf, F., Koehler, L., Kniess, T., Wuest, F., Mosch, B., and Pietzsch, J. (2009). Cell Cycle Regulating Kinase Cdk4 as a Potential Target for Tumor Cell Treatment and Tumor Imaging. *J Oncol* **2009**, 106378.
- Gray, N.S., Wodicka, L., Thunnissen, A.-M.W., nbsp, H, Norman, T.C., Kwon, S., Espinoza, F.H., Morgan, D.O., Barnes, G., *et al.* (1998). Exploiting Chemical Libraries, Structure, and Genomics in the Search for Kinase Inhibitors. *Science* **281**, 533-538.
- Gutmann, I., and Wahlefeld, A.W. (1974). *L-(+)-Lactate*. In *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer, ed. (NY, Academic Press), pp. 1464-1468.
- Hall, M., and Peters, G. (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* **68**, 67-108.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. In (New York, Laboratory Press), p. 469.
- Jonsson, B., Liminga, G., Csoka, K., Fridborg, H., Dhar, S., Nygren, P., and Larsson, R. (1996). Cytotoxic activity of calcein acetoxymethyl ester (Calcein/AM) on primary cultures of human haematological and solid tumours. *Eur J Cancer* **32A**, 883-887.
- Knockaert, M., Greengard, P., and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 417-425.
- Kunst, A., Draeger, B., and Ziegenhorn, J. (1984). *D-Glucose; UV-methods with hexolinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase*. In *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer, ed. (Weinheim, Verlag Chemie), pp. 163-172.
- Kuo, W., Lin, J., and Tang, T.K. (2000). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Int J Cancer* **85**, 857-864.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Landis, M.W., Pawlyk, B.S., Li, T., Sicinski, P., and Hinds, P.W. (2006). Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* **9**, 13-22.
- Lapenna, S., and Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 547-566.
- Lee, W.N., Boros, L.G., Puigjaner, J., Bassilian, S., Lim, S., and Cascante, M. (1998). Mass isotopomer study of the nonoxidative pathways of the pentose cycle with [1,2-13C2]glucose. *Am J Physiol* **274**, E843-851.
- Lee, W.N., Byerley, L.O., Bergner, E.A., and Edmond, J. (1991). Mass isotopomer analysis: theoretical and practical considerations. *Biol Mass Spectrom* **20**, 451-458.
- Lee, W.N.P. (2006). Characterizing phenotype with tracer based metabolomics. *Metabolomics* **2**, 31-39.
- Liminga, G., Jonsson, B., Nygren, P., and Larsson, R. (1999). On the mechanism underlying calcein-induced cytotoxicity. *Eur J Pharmacol* **383**, 321-329.

- Liminga, G., Martinsson, P., Jonsson, B., Nygren, P., and Larsson, R. (2000). Apoptosis induced by calcein acetoxymethyl ester in the human histiocytic lymphoma cell line U-937 GTB. *Biochemical Pharmacology* **60**, 1751-1759.
- Liminga, G., Nygren, P., Dhar, S., Nilsson, K., and Larsson, R. (1995). Cytotoxic effect of calcein acetoxymethyl ester on human tumor cell lines: drug delivery by intracellular trapping. *Anticancer Drugs* **6**, 578-585.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* **375**, 503-506.
- Lundberg, A.S., and Weinberg, R.A. (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**, 753-761.
- Mahale, S., Aubry, C., Jenkins, P.R., Marechal, J.D., Sutcliffe, M.J., and Chaudhuri, B. (2006). Inhibition of cancer cell growth by cyclin dependent kinase 4 inhibitors synthesized based on the structure of faspaplysin. *Bioorg Chem*.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 222-231.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2006). Is Cyclin D1-CDK4 kinase a bona fide cancer target? *Cancer Cell* **9**, 2-4.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118**, 493-504.
- Marzec, M., Kasprzycka, M., Lai, R., Gladden, A.B., Wlodarski, P., Tomczak, E., Nowell, P., Deprimo, S.E., Sadis, S., Eck, S., *et al.* (2006). Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity. *Blood* **108**, 1744-1750.
- Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J.J., Torres, J.L., and Cascante, M. (2003). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur J Nutr* **42**, 43-49.
- McInnes, C. (2008). Progress in the evaluation of CDK inhibitors as anti-tumor agents. *Drug Discovery Today* **13**, 875-881.
- Medema, R.H., Herrera, R.E., Lam, F., and Weinberg, R.A. (1995). Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6289-6293.
- Menu, E., Garcia, J., Huang, X., Di Liberto, M., Toogood, P.L., Chen, I., Vanderkerken, K., and Chen-Kiang, S. (2008). A novel therapeutic combination using PD 0332991 and bortezomib: study in the 5T33MM myeloma model. *Cancer Res* **68**, 5519-5523.
- Miliani de Marval, P.L., Macias, E., Rounbehler, R., Sicinski, P., Kiyokawa, H., Johnson, D.G., Conti, C.J., and Rodriguez-Puebla, M.L. (2004). Lack of cyclin-dependent kinase 4 inhibits c-myc tumorigenic activities in epithelial tissues. *Mol Cell Biol* **24**, 7538-7547.
- Morris, S.J. (1990). Real-time multi-wavelength fluorescence imaging of living cells. *Biotechniques* **8**, 296-308.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Myohanen, S.K., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1998). Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* **58**, 591-593.

- Noble, M.E., and Endicott, J.A. (1999). Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases: insights into design from X-ray crystallographic studies. *Pharmacol Ther* **82**, 269-278.
- Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* **61**, 441-470.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**, 821-828.
- Poulsen, H.S., and Frederiksen, P. (1981). Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in human breast cancer. Lack of association with oestrogen receptor content. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* **89**, 263-270.
- Ramos-Montoya, A., Lee, W.-N.P., Bassilian, S., Lim, S., Trebukhina, R.V., Kazhyna, M.V., Ciudad, C.J., Noé, V., Centelles, J.J., and Cascante, M. (2006). Pentose phosphate cycle oxidative and non-oxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* **119**, 2733-2741.
- Rubio-Martinez, J.P., M.; Tomas M.S.; Perez, J. J. (2005). Dock_Dyn: a program for fast molecular docking using molecular dynamics information. *University of Barcelona and Technical University of Catalonia*.
- Sandig, V., Brand, K., Herwig, S., Lukas, J., Bartek, J., and Strauss, M. (1997). Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nat Med* **3**, 313-319.
- Santamaria, D., and Ortega, S. (2006). Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci* **11**, 1164-1188.
- Schreiber, M., Muller, W.J., Singh, G., and Graham, F.L. (1999). Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21(WAF1/CIP1) and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene* **18**, 1663-1676.
- Shapiro, G.I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* **24**, 1770-1783.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18**, 2699-2711.
- Smith, D.B., and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Toogood, P.L., Harvey, P.J., Repine, J.T., Sheehan, D.J., VanderWel, S.N., Zhou, H., Keller, P.R., McNamara, D.J., Sherry, D., Zhu, T., *et al.* (2005). Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J Med Chem* **48**, 2388-2406.
- van den Heuvel, S., and Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**, 2050-2054.
- VanderWel, S.N., Harvey, P.J., McNamara, D.J., Repine, J.T., Keller, P.R., Quin, J., 3rd, Booth, R.J., Elliott, W.L., Dobrusin, E.M., Fry, D.W., *et al.* (2005). Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *J Med Chem* **48**, 2371-2387.
- Villacanas, O., Perez, J.J., and Rubio-Martinez, J. (2002). Structural analysis of the inhibition of Cdk4 and Cdk6 by p16(INK4a) through molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn* **20**, 347-358.
- Villacanas, O., and Rubio-Martinez, J. (2006). Reducing CDK4/6-p16(INK4a) interface. Computational alanine scanning of a peptide bound to CDK6 protein. *Proteins* **63**, 797-810.

- Vizan, P., Alcarraz-Vizán, G., Diaz-Moralli, S., Rodriguez-Prados, J.C., Zanuy, M., Centelles, J.J., Jauregui, O., and Cascante, M. (2007). Quantification of Intracellular Phosphorylated Carbohydrates in HT29 Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*.
- Vizan, P., Alcarraz-Vizan, G., Diaz-Moralli, S., Solovjeva, O.N., Frederiks, W.M., and Cascante, M. (2009). Modulation of pentose phosphate pathway during cell cycle progression in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Int J Cancer* **124**, 2789-2796.
- Vizán, P., Mazurek, S., and Cascante, M. (2008). Robust metabolic adaptation underlying tumor progression. *Metabolomics* **4**, 1-12.
- Warburg, O. (1956). [Origin of cancer cells.]. *Oncologia* **9**, 75-83.
- Weston, S.A., and Parish, C.R. (1990). New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* **133**, 87-97.
- Yu, Q., Sicinska, E., Geng, Y., Ahnstrom, M., Zagozdzon, A., Kong, Y., Gardner, H., Kiyokawa, H., Harris, L.N., Stal, O., *et al.* (2006). Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer Cell* **9**, 23-32.
- Zou, X., Ray, D., Aziyu, A., Christov, K., Boiko, A.D., Gudkov, A.V., and Kiyokawa, H. (2002). Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. *Genes Dev* **16**, 2923-2934.

Capítol 2

Nova estratègia per a inhibir CDK4 i CDK6 mimetitzant el mecanisme d'acció de p16^{INK4a}

Miriam Zanuy,¹ Antonio Ramos-Montoya,^{1¥} Oscar Villacañas,² Neus Agell,³ Oriol Bachs,³ Maria Dolors Pujol,⁴ Jaime Rubio-Martinez² i Marta Cascante^{1¥}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, CSIC associated unit, Faculty of Biology, University of Barcelona, Biomedicine Institute of the University of Barcelona (IBUB), Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

² Department of Physical Chemistry, University of Barcelona and Institut de Recerca en Química Teòrica i Computacional (IQTUB), Martí i Franqués 1, 08028 Barcelona, Spain.

³ Department of Cell Biology and Pathology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

⁴ Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, CSIC associated unit, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain.

¥ Adreça actual: Uro-Oncology Research Group, Cancer Research UK Cambridge Research Institute, Li Ka Shing Centre, Robinson Way, Cambridge, CB2 0RE, UK

RESUM

Estudis recents posen de manifest que moduladors sintètics del creixement i divisió cel·lular estan adquirint un gran potencial com agents antitumorals. Donat que les cinases dependents de ciclins exerceixen un paper essencial en la regulació del cicle cel·lular, s'han considerat com unes de les dianes més plausibles a l'hora de dissenyar noves estratègies farmacològiques. Concretament, les dades suggereixen que la inhibició de les cinases CDK4 i CDK6 exerceix una forta activitat antitumoral. De fet, l'avaluació clínica del compost PD0332991, un inhibidor de CDK4 i CDK6 que s'uneix al lloc d'unió al ATP, ha demostrat que el bloqueig selectiu de l'activitat CDK4 i CDK6 és una estratègia terapèutica viable en tumors Rb-positius. Per una altra banda, aberracions en l'inhibidor natural de les CDK4 i CDK6, p16^{INK4a}, estan correlacionades freqüentment amb el càncer. Per tant, restablir els nivells del supressor de tumors p16^{INK4a} en aquells tumors on aquest manqui podria bloquejar la proliferació de la cèl·lula. Per aquest motiu, mimetitzar el mecanisme d'acció de p16^{INK4a} inhibint CDK4 i CDK6 és un esquema atractiu per tal de dissenyar i modelar noves drogues que ataquin el càncer. En aquest treball es descriu com s'ha dissenyat un model tridimensional d'interacció per possibles inhibidors de CDK6. Estudis, mitjançant tècniques de Dinàmica Molecular del complex CDK6-p16^{INK4a} han estat la base per tal de discernir aquelles interaccions més rellevants entre les dues proteïnes i determinar els paràmetres geomètrics del model. Totes aquestes dades, conjuntament amb observacions experimentals han permès crear un model amb 5 punts d'interacció amb el qual s'han cercat possibles candidats en bases de dades tridimensionals. Els diferents compostos obtinguts es van acoblar amb l'estructura de CDK6, mitjançant *docking* dirigit, per a tenir en compte les possibles repulsions estèriques entre el receptor i els lligands, i es van classificar segons el seu RMS (*Root Mean Square*) entre els punts del model d'interacció i els corresponents en les molècules.

En aquest treball s'han estudiat 8 d'aquests compostos, i s'ha identificat que tres d'ells s'uneixen als enzims CDK4 i CDK6 i inhibeixen selectivament la seva activitat. D'altra banda, s'ha verificat que no inhibeixen l'activitat CDK1 i CDK2 a concentracions superiors a 100 µM. També es demostra que en un ampli panel de línies cel·lulars els productes produeixen citotoxicitat a unes concentracions del rang de milimolar, pel que és necessària la síntesi de nous èsters per tal de permetre una millor entrada dels compostos a la cèl·lula. Aquests assajos de viabilitat mostren que la IC₅₀ dels compostos és menor en línies cel·lulars HER2 positives i en aquelles que tenen p16^{INK4a} mutat i que dos dels compostos assajats, F i J, són específics per línies tumorals. Finalment, en la línia d'adenocarcinoma de còlon HCT116, aquests compostos inhibeixen la fosforilació de la Ser⁷⁸⁰ del pRb, diana específica de fosforilació de CDK4 i CDK6, pel que tot i la seva elevada IC₅₀ poden ser considerats per posteriors modificacions estructurals que millorin la seva entrada a la cèl·lula. Els resultats mostren que aquesta nova

estratègia de mimetitzar l'inhibidor natural dels complexos ciclinaD-CDK4 i CDK6 és una estratègia amb molt d'èxit per tal d'obtenir inhibidors específics de CDK4 i CDK6 que inhibeixin el creixement tumoral en cèl·lules defectives en p16^{INK4a} que mantinguin el pRb inalterat, suggerint que aquelles molècules que mimetitzin p16^{INK4a} representen una eina prometedora per teràpies antitumorals en determinats tipus de càncer que mantinguin inalterat el pR.

Chapter 2

New strategy to inhibit CDK4 and CDK6 by mimicking p16^{INK4a} mechanism

Miriam Zanuy,¹ Antonio Ramos-Montoya,^{1‡} Oscar Villacañas,² Neus Agell,³ Oriol Bachs,³ Maria Dolors Pujol,⁴ Jaime Rubio-Martinez² and Marta Cascante^{1‡}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, CSIC associated unit, Faculty of Biology, University of Barcelona, Biomedicine Institute of the University of Barcelona (IBUB), Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

² Department of Physical Chemistry, University of Barcelona and Institut de Recerca en Química Teòrica i Computacional (IQTUB), Martí i Franqués 1, 08028 Barcelona, Spain.

³ Department of Cell Biology and Pathology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

⁴ Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, CSIC associated unit, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain.

[‡]Present address: Uro-Oncology Research Group, Cancer Research UK Cambridge Research Institute, Li Ka Shing Centre, Robinson Way, Cambridge, CB2 0RE, UK

[‡]**Correspondence address:** Marta Cascante, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology (Edifici Nou), Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Phone: 0034 934021593; Fax: 0034 934021559; E-mail: martacascante@ub.edu

RUNNING TITLE

Selective inhibitors of CDK4 and CDK6.

KEYWORDS

Apoptosis

CDK-Inhibitor

Cell cycle

Cyclin dependent kinases

HER2

Retinoblastoma protein

ABBREVIATIONS

AM: acetoxymethyl ester

CDK: cyclin dependent kinase

CKI: CDK inhibitor

CM: centre of masses

IP: immunoprecipitation

pRb: retinoblastoma protein

RMSD: root mean square deviation

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

ABSTRACT

Recent studies have shown that synthetic modulators of cell growth and division have significant potential as anti-tumor therapeutics. Since cyclin dependent kinases play an essential role in the regulation of the cell cycle, they have been considered as targets for plausible pharmacological strategies. Specifically, the data available strongly suggest that inhibition of CDK4 and CDK6 is a major determinant of anti-tumor activity. The clinical evaluation of PD0332991, an inhibitor of CDK4 and CDK6 that targets their ATP-binding site, has demonstrated that selective blocking of CDK4 and CDK6 activity is a viable therapeutic strategy in Rb-positive tumors. Moreover, aberrations in p16^{INK4a} have frequently been related to cancer. Therefore, restoration of the tumor suppressor p16^{INK4a} in p16^{INK4a}-lacking cells may stop cell proliferation. Thereby, mimicking the p16^{INK4a} mechanism for CDK4 and CDK6 inhibition is an attractive premise to model new drugs against cancer. Herein, it is reported how a three-dimensional interaction model for putative CDK6 inhibitors has been designed. Molecular Dynamics studies of the CDK6-p16^{INK4a} complex have been carried out in order to obtain the most relevant interactions between the two proteins, and to determine the geometrical parameters for the model. These data, together with experimental observations, led to a five-point interaction model which has been used to search compounds in three-dimensional databases. Hits were docked in CDK6 structure, to take into account Van der Waals hindrance, and classified according to their RMS (Root Mean Square) between the points of the interaction model and the corresponding ones in the molecules.

In this paper we have studied eight different compounds found through this method and finally three of them were found to bind to and selectively inhibit CDK4 and CDK6. Interestingly, they did not inhibit CDK1 and CDK2 activity at concentrations up to 100 μ M. We show that in different cell lines these products are cytotoxic in the milimolar range, which indicates that synthesis of esters of these compounds is necessary to improve their entry into the cell. Viability assays have shown that the IC₅₀ of these compounds is lower in p16^{INK4a} mutated cell lines and in HER2 positive cell lines and that two of the products, F and J are specific for tumor cells. In addition, these cytotoxic compounds inhibit pRb phosphorylation at its serine 780, a specific phosphorylation target for CDK4 and CDK6, in the colon adenocarcinoma HCT116 cell line. Therefore, these compounds are good CDK4 and CDK6 inhibitors and need to be esterified in order to pass through the plasmatic membrane. The results showed that this new strategy of mimicking the natural inhibitor of the complexes is a successful strategy to obtain new specific CDK4 and CDK6 inhibitors that can inhibit tumor growth in p16^{INK4a}-defective, pRb-expressing human cells, suggesting that p16^{INK4a}-mimicking molecules can represent a promising tool for targeted therapy in selected cancer phenotypes.

INTRODUCTION

Since the molecular mechanism governing the mammalian cell cycle was first elucidated in the 1970s and 1980s by Hartwell and Nurse (Balter and Vogel, 2001) it has been recognized that synthetic modulators of cell growth and division have significant potential as anti-tumor therapeutics.

Cyclin dependent kinases (CDKs) represent key molecules involved in regulation of the cell-cycle. CDKs are serine/threonine kinases that become active only when associated with a regulatory partner (e.g. cyclins or other proteins). Cyclin-CDK holoenzymes are activated by phosphorylation, which is catalyzed by CDK-activator kinases (CAK). The activity of CDKs is negatively regulated by direct interactions with proteins referred to as CDK inhibitors (CDKIs). CDKIs are divided into two major families: the INK4 (inhibitor of CDK4) family, including p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} and p19^{INK4d}, which specifically inhibit cyclin D-associated kinases (CDKs 4 and 6); and the Cip/Kip (kinase inhibitor protein) family, consisting of p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} and p57^{KIP2}, which inhibit most CDKs. Deregulation of molecules controlling the cell-cycle plays an important role in tumor pathogenesis.

Moreover, enforced perturbations in CDKs and/or CDKIs can promote neoplastic transformation and/or enhance the carcinogenic properties of oncoproteins. Thus, CDKs represent very attractive targets for cancer therapy. More than 50 pharmacological CDK inhibitors have been described, some of which have potent antitumor activity. Furthermore, multiple CDK inhibitors are currently undergoing preclinical and clinical evaluation, and the search for new CDK inhibitors continues (Dai and Grant, 2003). This has been possible because of the fact that the inhibition of CDKs has been greatly facilitated by the growing information about structure, activation and regulation of these enzymes. However, despite more than a decade of investigation, a specific enough CDK inhibition has not been yet achieved (McInnes, 2008).

It has been demonstrated that interphase CDKs (CDK2, CDK4 and CDK6) are not essential for the mammalian cell cycle (Malumbres and Barbacid, 2009). Instead, they are only required for the proliferation of specific cell types. By contrast, CDK1 is essential for cell division in the embryo. Moreover, CDK1 is sufficient among the other cell cycle CDKs for driving the cell cycle in all cell types, at least until mid gestation (Malumbres and Barbacid, 2009).

Experimental evidence suggests that some human tumor cell lines display a selective dependence on interphase CDKs. Therefore, if tumor cells also have specific requirements for individual CDKs, then therapeutic strategies based on CDK inhibition should take into consideration these specific requirements. For instance, whereas colon carcinoma cell lines

efficiently proliferate in the absence of CDK2, downregulation or inhibition of this kinase in cell lines derived from glioblastomas and osteosarcomas prevents their proliferation (Tetsu and McCormick, 2003; van den Heuvel and Harlow, 1993). As CDK2 is not required for proliferation of cells of brain or connective tissue, at least in mice, the requirement of these tumor cells for CDK2 must be acquired during the neoplastic process. Similar observations are now emerging from more sophisticated studies using gene-targeted mouse tumor models. *Cdk4*-deficient mice are resistant to mammary tumors expressing *ErbB2* and *Hras* under the control of the mouse mammary tumor virus promoter (Reddy *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006). However, expression of CDK4 does not appear to be essential for mammary gland development. Similarly, mice lacking cyclin D1 or expressing a cyclin D1 mutant that does not activate CDK4 are also resistant to breast tumors induced by *ErbB2* (Landis *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2001). However, lack of cyclin D1 has no effect on breast tumor development induced by *Myc* or *Wnt1* (Yu *et al.*, 2001). These observations indicate that active cyclin D1-CDK4 complexes are required for breast tumor development, depending on the nature of the oncogenic insult or cellular context. Thus, CDK4 inhibition by small molecules may have therapeutic value in treating ErBB2-positive breast tumors (Malumbres and Barbacid, 2006). The specific inhibition of an interphase CDK in cells that present acquired and/or innate dependency to it is an interesting therapeutic possibility that deserves to be explored.

The catalytic activity of CDK4 or CDK6 regulates a critical checkpoint for the G1-S transition and the commitment to cell division (Ho and Dowdy, 2002). Currently, there are small-molecules, like PD0332991, which inhibit CDK4 and CDK6 through competition with ATP for the same binding site. As a matter of fact, some of them are nowadays in clinical development (McInnes, 2008). This ATP-competitive strategy comes up with some drawbacks. Mainly, specificity is difficult to achieve, since not only CDKs have a very similar ATP-binding site but also all the other different kinases that exist in the organism share some degree of similarity. It is therefore of great interest to design specific inhibitors of CDK4 and CDK6 using a different strategy to eliminate undesirable side effects. (Fischer and Gianella-Borradori, 2005; Toogood *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2003a; Zhu *et al.*, 2003b). An alternative strategy to inhibit CDK4 and CDK6 is to use inhibitors that mimic the interactions of p16^{INK4a} with these proteins. The expected success of this strategy is based on the fact that loss of function of INK4 inhibitors, like p16^{INK4a}, occurs in practically all types of cancer (Ruas and Peters, 1998) and that restoration of this tumor suppressor in p16^{INK4a}-lacking cells arrests them in G1 phase (Craig *et al.*, 1998; Suzuki-Takahashi *et al.*, 1997).

However, trying to mimic p16^{INK4a} interactions is difficult. It is seen from Cdk6-p16^{INK4a} X-ray structure (Russo *et al.*, 1996) that the interaction surface is large and cannot be embraced by small molecules. Therefore, under the hypothesis that not all of the interactions are necessary

to achieve a CDK4 and CDK6 inhibitor property, a small number of them, as long as they take up a surface which can embrace a small-molecule, have to be selected and used as a reference interaction model.

Following this strategy in the last years several peptides made from the p16^{INK4a}-mimick motif have been synthesized and their capacity to induce apoptosis predominantly in p16^{INK4a} negative and pRb positive cancer cells has been demonstrated (Douglas *et al.*, 2005).

In this article, using Molecular Dynamics simulation of the CDK6-p16^{INK4a} complex we identify the interaction patterns of the putative inhibitors that will mimic p16^{INK4a} interactions with CDK4 and CDK6. ACD 3D database (Available Chemical Database 3D) was screened for the search of commercial compounds that matched our query. After docking procedures, 8 compounds were selected as putative CDK4 and CDK6 inhibitors and screened to further experimental kinase assays, only 3 of them being active. Kinase assays were performed again to determine the CDKs inhibitions of the three compounds (D, F and J). Two of them (D and F) were specific for CDK4 and CDK6. Moreover, the products were cytotoxic in different cell lines at concentrations around 1mM, which indicated a necessary synthesis of ester derivatives of the compounds in order to improve their IC₅₀. All the products affected HER2+ breast cancer cells (SKBR-3) more than HER2- breast cancer cells (MCF-7) and presented a higher IC₅₀ in cells with a constitutively inactivated pRb. Furthermore, F and J compounds were selective for non-tumor cells. Finally, all the compounds decreased the levels of pRb phosphorylated in its Ser780, which is a specific target of CDK4 and CDK6. Products D and F were further characterized as apoptosis inducers and selective for CDK4 and CDK6 and all of them were able to arrest cell cycle in G1 phase in the human colon adenocarcinoma cell line HCT116. All this data suggested that the three compounds were good selective inhibitors of the CDK4 and CDK6 enzymes.

Most currently available CDK inhibitors target the ATP binding site. On the contrary, the designed inhibitors target the binding site of p16^{INK4a} and, in consequence, they are highly specific for CDK4 and CDK6 kinases (Barvian *et al.*, 2000; Fry *et al.*, 2001). These molecules can therefore be suggested as effective and selective inhibitors of tumor growth *in vitro*. The results reported indicate that inhibiting CDK4 and CDK6 with compounds with a p16^{INK4a}-mimicking motif is a powerful strategy to attack predominantly p16^{INK4a}-negative and pRb positive cancer cells. It is therefore expected that the CDK4 and CDK6 inhibitors developed in this study will have high practical applicability and usefulness in cancer treatment.

MATERIALS AND METHODS

All products were purchased from Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA), unless otherwise specified.

Chemicals. B, C and E were supplied by Research Plus (Barnegat, NJ, USA), Biomol Research Labs (PA, USA), and Toronto Research Chemicals (ON, Canada), respectively. F and G were purchased from Acros Organics (Fisher Scientific International, Inc., New Hampshire, USA). R (the acetoximetil-F) was synthesized from F by Dr. M. Dolors Pujol at the University of Barcelona.

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), F-12 HAM Nutrient mixture with L-glutamine, MEM-EAGLE non-essential aminoacid solution x100, antibiotic (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin), Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS), Trypsin EDTA solution C (0.05% trypsin –0.02% EDTA) and Glutamine solution 200mM were obtained from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemet, Israel). Fetal Calf Serum (FCS) was purchased by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Theoretical methods for CDK4 and CDK6: Extraction of interaction models from Molecular Dynamics trajectory. Construction and Molecular dynamics simulations of Cdk6-p16^{INK4a} complex as well as the determination of their interactions were carried out as described in (Villacanas *et al.*, 2002). During the production time, the position of those atoms involved in the pharmacophoric features of p16^{INK4a}, that is, those atoms belonging to residues of p16^{INK4a} that effectively interact with CDK6, were monitored. As a result, the mean positions of these atoms as well as their maximum deviations were calculated. If several atoms contribute to the same effective interaction, the centre of masses (CM) of the mean positions was calculated and it was treated as a single interaction point. Since all points coming from the production time must be referred to the same reference system, each snapshot was superimposed to the initial geometry (first snapshot). Doing this procedure for all the pharmacophoric features, a 3D picture of all the pharmacophoric points was obtained. Pharmacophoric points were gathered in all possible combinations, as long as distances between points within a group were no longer than 12 Å. Each group represented a different 3D interaction model.

Theoretical methods for CDK4 and CDK6: Computer screening procedure and compound selection. The distances from the selected 3D interaction models, as well as the nature of the interactions were introduced as input to search compounds that match this query. Catalyst (Accelrys, Inc., USA) software together with Available Chemical Database (ACD), National Cancer Institute (NCI) database, Maybridge database and Derwent World Drug Database were used. Matches were filtered. Mainly, molecules with unusual bonds or with a molecular weight higher than 750 a.u. were not selected. Hits were saved as *mol2* format files

containing all the conformations given by Catalyst. Each conformation was docked into Cdk6 structure, obtained from Cdk6-p16^{INK4a} dynamics production. Pharmacophoric features were automatically assigned to the ligands, and distances between pharmacophoric points for all conformations were calculated. Next, it was tested if there existed in each conformation a combination that satisfied our pharmacophore hypothesis. If it did, a superimposition between the ligand and the 3D structure of our pharmacophoric hypothesis was carried out, optimizing the RMSD (root mean square deviation). Different steps were carried out, in order to get the best docked conformations for each hit. The maximum RMSD allowed was increased 0.25 Å at every step, starting at 0.25 Å. The process was stopped when either the maximum RMS was 3 Å or every molecule had at least one valid docking result.

A visual structure analysis was carried out to reduce the number of final modeled complexes. Selected compounds were classified regarding their structure. Finally, eight compounds were purchased, trying to embrace the whole structural diversity of molecules selected in the docking procedure.

Cell culture. For the performance of the experiments, human colon adenocarcinoma HCT116 cells and MCF-7 (gift from Dr. Capellà and Dra. Lopez, from Institut Català d'Oncologia, Barcelona), were grown in DMEM: HAM F12 (1:1) and RPMI respectively. Both media were supplemented with 10% FCS and penicillin (50 U/mL) and streptomycin (50 µg/mL). Additionally, the HCT116 medium was supplemented with Glutamine (2 mM), pyruvic acid (1mM) and non-essential aminoacids (1%) (Biological Industries). Human breast carcinoma SKBR-3 cells (obtained from Dr. Ciudad (Universitat de Barcelona) were grown as a monolayer culture in minimum essential medium (DMEM with l-glutamine, 25mM of D-glucose and without sodium pyruvate) in the presence of 10% heat-inactivated fetal calf serum, and 0.1% streptomycin/penicillin.

COS-1 cell line (gift from Dr. Agell (Hospital Clínic) was grown in DMEM media supplemented with 10% FCS and penicillin (50 U/mL) and streptomycin (50 µg/mL). The COS cell line (kidney cells of a monkey) has a defect in genomic replication (Gluzman, 1981). This defect implies a constitutively inactivated pRb.

NCM460 cell line, obtained by a Material Transfer Agreement with INCELL (Texas, US) is an epithelial cell line derived from the normal colon mucosa of a 68-year old Hispanic male (Moyer *et al.*, 1996). These cells were grown as a monolayer culture in M3Base medium (which contains growth supplements and antibiotics) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 2.5 mM of D-glucose (final concentration 5 mM glucose). All cell cultures were carried out at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Immunoprecipitation and kinase assays. For kinase assays, immunoprecipitations were performed as described in literature (Harlow and Lane, 1988). HCT116 cells were lysed for 30 min at 4°C in IP buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM Na₃VO₄ and 1 mM NaF). Lysates were sonicated and supernatant fraction protein content was measured using the Bradford method (Bradford, 1976), and 400 µg of protein from the lysates were incubated with 4 µg of antibody (cdk6, cdk4, cdk1, cycD1 or cycD3) (anti-cdk6 (sc-177), anti-cdk4 (sc-260-R), anti-cdk1 (sc-54) and anti-cyclin D3 (sc-182)) from Santa Cruz Biotechnology (California, USA) and anti-cyclin D1 (06-137) from Upstate Biotechnology (NY, USA) or with 20 µl of Anti-Flag M2 Agarose from mouse A2220 as a negative control of immunoprecipitation O/N shaking at 4°C. Protein immunocomplexes were then incubated with 20 µl protein A-Sepharose (Pierce, Rockford, IL, USA) for 1 h at 4°C, collected by centrifugation and washed four times in IP buffer and twice in kinase buffer (HEPES 50 mM pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM EGTA, 0.1 mM Na₃VO₄, 10 mM β-glycerophosphate and 1 mM DTT) and then incubated in kinase buffer containing or 2 Ci [³²P]ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml from Amersham Biosciences, NJ, USA) and H1-Histone (1 µg/µL) or 1µg pGST-Rb (379-928) fusion protein (for cdk6 kinase) (gift of Dr Wang, San Diego, CA, USA, the fusion protein was expressed and purified following (Frangioni and Neel, 1993; Smith and Johnson, 1988)) for 30 min at 30°C in a final volume of 30µl. Then, the samples were boiled for 5 min and electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels essentially as described (Laemmli, 1970) and the gels were stained with Coomassie blue, dried, and exposed to X-ray films with vacuum at 80°C. The intensity of radioactivity was measured by Thyphoon Trio+, Trio 9200 (Amersham Biosciences). It was used Olomoucine (Calbiochem, CA, USA), p21 and p16^{INK4a} (purified by Dra. Neus Agell group at the Hospital Clinic of Barcelona) as a positive control.

Cell growth inhibition. The assay was performed by a variation of the method described by Mosmann (Matito *et al.*, 2003; Mosmann, 1983; Ramos-Montoya *et al.*, 2006). Growing concentrations of the products were plated in 96-well-flat-bottomed microtitre plates where 1700 HCT116, 4000 MCF-7, 12000 SKBR-3, 800 COS-1, 10000 NCM460 cells/well had been seeded 24h before. After incubation for 72 hours, MTT dissolved in PBS at 1 mg/ml and sterile filtered was added to the wells at a final concentration of 0.5 mg/ml. Following 1 hour of incubation, the generated formazan was dissolved with 100 µL of DMSO per well. The absorbance was measured on an ELISA plate reader (Merck ELISA System MIOS version 3.2.) at 550 nm. The concentrations that caused 50% of inhibition of cell growth (IC₅₀) were calculated.

Protein concentration determination. To determine the protein concentration of extracts obtained from HCT116 cells treated with the CDK4 and CDK6 inhibitors, bicinchoninic acid (BCA) assay protein kit (Pierce, Rockford, IL, USA) was used. A BSA (bovine serum albumin) standard curve with dilutions in triplicate from 125 to 2000 $\mu\text{g/mL}$ was performed. Then, 10 μL of each standard or sample was placed in a 96-well flat-161 bottomed microlitre plate and 200 μL of BCA protein kit (prepared by mixing 50 volumes of reactive A for each volume of reactive B) was added to all the wells, with lysis buffer as blank. After 30 min of shaking at 37 $^{\circ}\text{C}$, absorbance at 550 nm was measured on an ELISA plate reader (Sunrise Tecan, Barcelona, Spain). Protein concentration was obtained by extrapolation from standard curve.

Gel electrophoresis and immunoblotting. Cells were lysed in a buffer containing 2% SDS, 67 mM Tris-HCl pH 6.8 and 10 mM EDTA and sonicated twice for 10 s (4 $^{\circ}\text{C}$). Protein content was measured as it was described above, using bovine serum albumin (BSA) as standard. The extracts were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gels for 90 min at 300 V essentially as described by Laemmli (Comin-Anduix *et al.*, 2002; Laemmli, 1970). After electrophoresis the proteins were transferred to Immobilon-P strips for 1 hour at 70 V. The sheets were preincubated in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.05% Tween 20 and 5% BSA for 1 hour at room temperature, and then incubated for 1 hour at room temperature in TBS, 0.05% Tween 20, 5% BSA containing anti-phospho-Rb (Ser780) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) or anti-actin (MP Biomedicals, Ullkirch, France) antibodies. After washing in TBS, 0.05% Tween 20 (three times, 10 min each), the sheets were incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (1: 3000 dilution) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 1 h at room temperature. After secondary antibody incubation, membranes were washed again three times during 5 min in TBS-T and once in TBS before protein detection. To verify an identical protein load, membranes were incubated with polyclonal anti- α actin diluted 1:50000 in TBS-T with 5% (w/v) BSA during 1 hour at room temperature, washed with TBS-T, incubated with the appropriate secondary antibody and washed again as explained above (Harlow and Lane, 1988). $^{(\text{Ser780})}\text{pRb}$ and α -actin were visualized by enhanced chemoluminescence using a chemoluminescence (ECL) kit (Biological Industries) as substrate for the horseradish peroxidase. The Image LAS 3000 Photo Version 2.0 (Fujifilm) was used to analyze the chemoluminescence.

Synthesis of (1). Under air, an oven-dried, two-necked flask equipped with a stir bar was charged with the methylthymol blue pentasodium salt (F) (100 mg, 0.19 mmol) dissolved in 100 mL of distilled DMF, sealed with a septum, and purged with argon. This system was cooled at 0 $^{\circ}\text{C}$ in an ice bath and the bromoester (0.186 mL, 0.76 mmol) was added by syringe, and the mixture was stirred at room temperature for approximately 72 h until the starting compound was consumed (the reaction was monitored by TLC analysis, $r_f = 0.4$, methanol 100%). The reaction

mixture initially colourless changed to yellow after the addition of the bromoester. After completion of the reaction, the solvent was removed under reduced pressure by micro-distillation and the solid residue was subjected to column chromatography over alumina applying a mixture of ethyl acetate/methanol 99:1 to afford compound **1** in 45% yield as a yellow solid. M.p. 54 °C. The final compound formation was determined by ¹H-NMR, masses and IR to confirm the structure. IR (film) ν (cm⁻¹), 3407 (OH, sulfonic acid), 1634 (CO, ester), 1613 (CO, ester), 1455 (C=C), 1230 (Ar-O), 1180 (C-O). EM (ESI (+) H₂O: CH₃CN (1:1)) m/z = 1188 (M), 925, 680. RMN-¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm): 0.99 (d, J = 6 Hz, 12H, CH₃-); 2.19 (s, 6H, CH₃-Ar); 2.20 (m, 12H, CH₃-CO); 2.22 (m, 2H, CH-Ar), 2.28 (s, 1H, CH-Ar); 2.72 (bs, 4H, Ar-CH₂-N); 2.89 (s, 4H, CH₂-CO-); 2.95 (s, 4H, CH₂-CO-); 6.98 (m, 2H, Ar); 7.41 (m, 3H, Ar); 8.12 (m, 1H, Ar).

Data analysis and statistical methods. *In vitro* experiments were carried out using three cultures each time for each treatment and then repeated three times. Statistical analyses were performed using the parametric unpaired, two-tailed independent sample t test with 99.9, 99 and 95 % confidence intervals. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) was considered to indicate significant differences between treated and not treated cell lines.

RESULTS

Design of new synthetic CDK4 and CDK6 inhibitors.

The twenty 3D models obtained when following the directions described in *Extraction of interaction models from Molecular Dynamics trajectories* in *Materials and Methods* section were analyzed taking into account the available experimental information in order to select the most promising one. Thus, the final 3D model (Figure 1) for the pharmacophore included three residues (X, X and X) belonging to a 20-residue peptide with the same sequence as the XXX segment of p16^{INK4a}, which interacts with CDK6, according to the crystal structure (Russo *et al.*, 1998) and molecular dynamics simulation (Villacanas *et al.*, 2002), and two other nearby residues (X and X) with reported biological relevance.

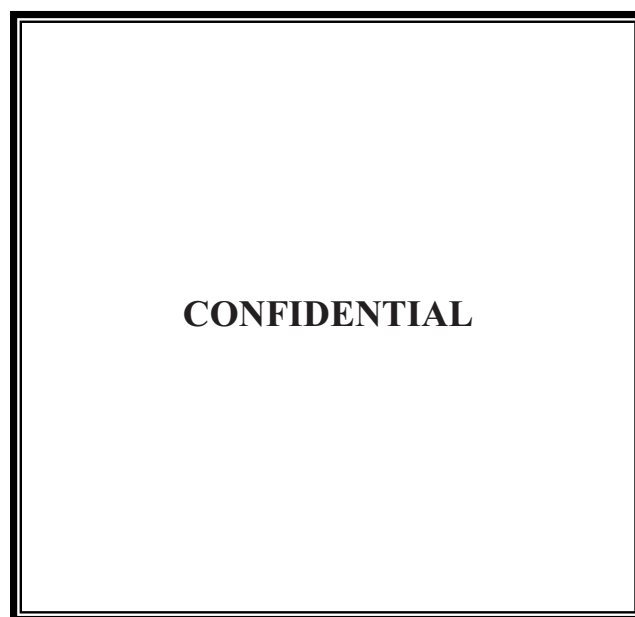


Figure 1. Interaction model for CDK6 inhibitors in three-dimensional databases. Picture was made with VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

The later 3D interaction model (with five pharmacophoric points) was introduced as hypothesis in Catalyst (Accelrys, Inc. USA) to find molecules fitting the requirements and the search procedure was carried out in Available Chemical Database (ACD), National Cancer Institute (NCI) database, Maybridge database and Derwent World Drug Database. Only four hits were found out, all of them in ACD. In order to raise the number of hits, the interaction points (Figure 1) were reduced, generating two of four (without either X or X) and one of three (without X or X). All these sub-models kept up the features described in the previous section. X-X-X-X model gave 38 hits, X-X-X-X 41, and X-X-X 82, all of them in the ACD database.

All the conformations from every hit were docked in the CDK6 protein, as described in *Computer screening procedure and compound selection* in *Materials and Methods* section. Resultant compound-CDK6 complexes were visually checked. Basically, the complex was selected if the hydrophobic group had the same orientation as the original point in p16^{INK4a}, in which the CM of X ring must be a hydrophobic group with a protuberant shape towards CDK6.

Resultant compounds from this section were classified according to their structure. 11 structure-based types of molecules were obtained. Taking into account the availability, the RMSD of the docked conformations as well as the need of considering the whole diversity of the molecules, 8 molecules (**B** to **H** and **J**, Figure 2) were purchased from commercial companies to test CDK4 and CDK6 inhibition.

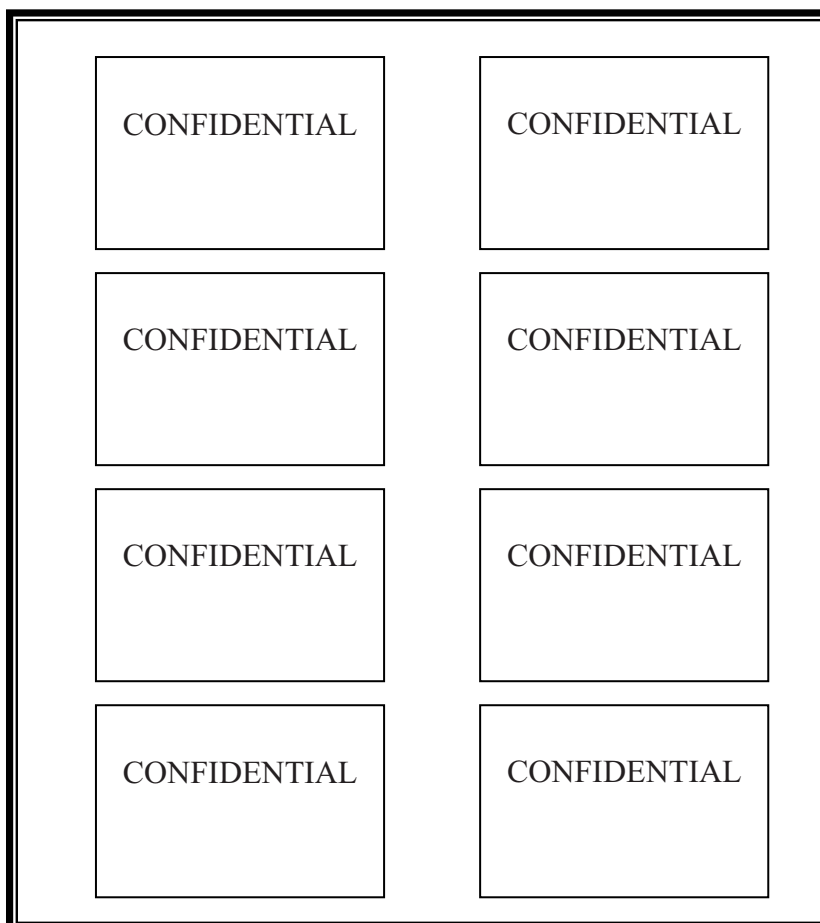


Figure 2. Selected compounds to target CDK4 and CDK6 enzyme activity. Selected compounds were docked into CDK6 with an in-house program and finally, a visual structure analysis was carried out to reduce the number of final modeled complexes. **B**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H** and **J**.

In vitro enzymatic inhibition of cyclin dependent kinases 4 and 6.

p16^{INK4a} was first tested at different concentrations in order to prove the effect of the natural inhibitor on CDK6 immunoprecipitated from colon adenocarcinoma HCT116 cells through kinase assays using pGST-Rb (379-928) fusion protein as substrate of the reaction (Figure 3.A). The eight compounds described (**B** to **H** and **J**) were then tested with this system for CDK6 activity inhibition. The obtained results are plotted in Figure 3.B. and show that **D**, **F** and **J** significantly inhibited CDKs activity. As a consequence, they were selected for further characterization. The inhibitory concentration of **D**, **F** and **J** which decreased 50% the activity

of CDK6 in the kinase assays (IC_{50}) was therefore determined. The results showed that the IC_{50} of **D**, **F** and **J** for the activity of CDK6 *in vitro* were 25 μ M, 10 μ M and 10 μ M, respectively (Figure 3.C). Further studies showed that these concentrations were also able to inhibit the activity of CDK4 as well as the kinase-associated activities of cyclins D1 and D3 (Figure 3.D).

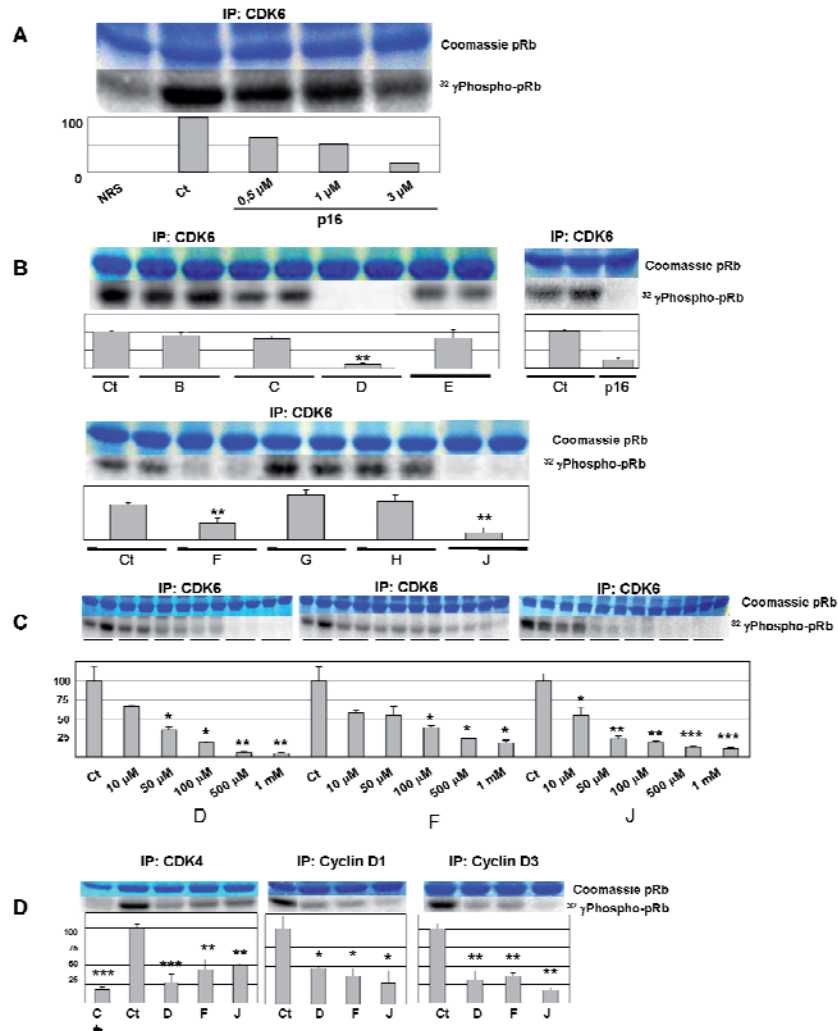


Figure 3. CDK4 and CDK6 activity after treatment with the different compounds. Enzymatic activity was determined on CDK6, CDK4, cyclin D1 and cyclin D3 immunoprecipitations using radioactivity methods. Results are expressed as mean % respect to a control without inhibitor (N=3). **A.** CDK6 activity is inhibited by p16^{INK4a} in these *in vitro* assays. **B.** Discriminatory CDK6 kinase assay with compounds (1 mM) **C.** Dose-effect curve of **D**, **F** and **J** on CDK6 activity (10 μ M to 1 mM). **D.** CDK4, cyclin D1 and cyclin D3 immunoprecipitations and kinase assays tested in the presence of 25, 10 and 10 μ M of **D**, **F** and **J**, respectively (IC_{50} for the CDK6 kinase assay). pGST-Rb (379-928) fusion protein was used as a substrate, purified water as a negative control and p16^{INK4a} as a positive control of the inhibition. Results are expressed as mean % respect to a control without inhibitor. Mean + SD; n = 3 A single asterisk (*) indicates p < 0.05, whereas double asterisks (**) indicate p < 0.01 and triple asterisks (***) indicate p < 0.001. One representative example is shown in each case.

In vitro enzymatic inhibition of cyclin dependent kinase 1.

Taking into account the importance of CDK1 in the progression of the cell cycle and their independence of interphase CDKs, CDK1 kinase assays were performed. 7 μ M of Olomoucine was used as a positive control of CDK1 activity inhibition.

Figure 5.A shows that, product **D** at concentrations up to 4-fold the IC₅₀ on CDK6 *in vitro* activity, does not inhibit CDK1 activity. However at concentrations 20-fold the IC₅₀ on CDK6 (500 μ M) we observed a 27% of decrease in CDK1 activity. In Figure 5.B. the CDK1 activity after the incubation with product **F** is plotted and the results show that product **F**, at concentrations up to 5-fold the IC₅₀ on CDK6, did not inhibit CDK1 activity.

On the contrary, compound **J** did inhibit CDK1 activity (Figure 5.C) at concentrations 5-fold higher than its IC₅₀ on CDK6.

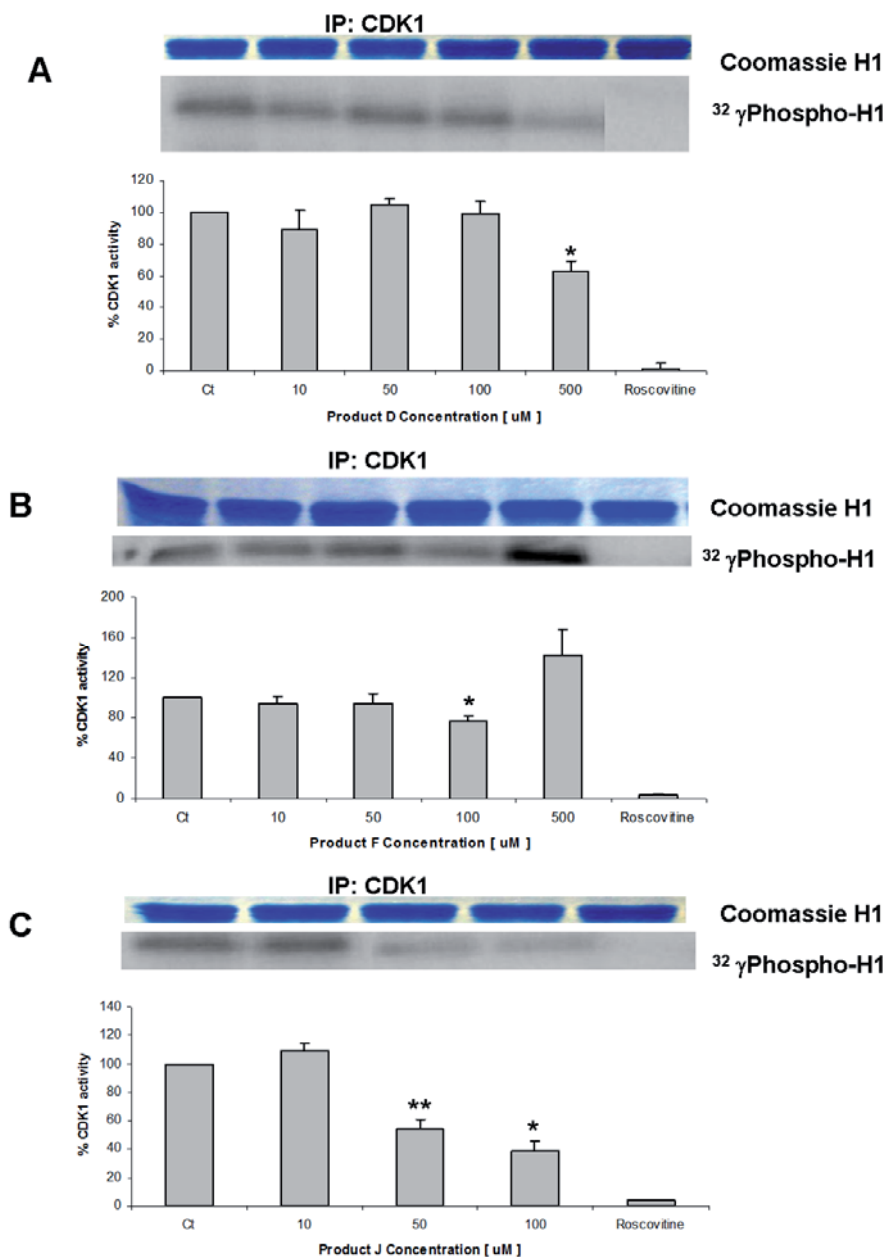


Figure 5. Dose-effect curve of D, F and J on CDK1 activities. CDK1 immunoprecipitations and kinase assays tested in the presence of increasing concentrations of D, F and J (10 μ M to 500 μ M). Histone H1 was used as a substrate, Olomoucine (7 μ M) as a positive control and purified water as a negative control of inhibition. **A.** CDK1 immunoprecipitation and kinase assays tested in the presence of increasing concentrations of D product. CDK1 immunoprecipitation and kinase assays tested in the presence of increasing concentrations of F product. **C.** CDK1 immunoprecipitation and kinase assays tested in the presence of increasing concentrations of J product. Mean + SD; n = 2. A single asterisk (*) indicates $p < 0.05$, whereas double asterisks (**) indicate $p < 0.01$. One representative example is shown in each case.

In vitro enzymatic inhibition of cyclin dependent kinase 2.

To ascertain the selectivity of products **D**, **F** and **J** for cyclin dependent kinases 4 and 6 we tested their activity against CDK2 by performing *in vitro* kinase assays at concentrations equal to their respective IC_{50} values on CDK6 (Figure 4). 3 μ M of p21 was used as a positive control of CDK2 activity inhibition. The results showed that products **D**, **F** and **J** did not inhibit the CDK2 activity.

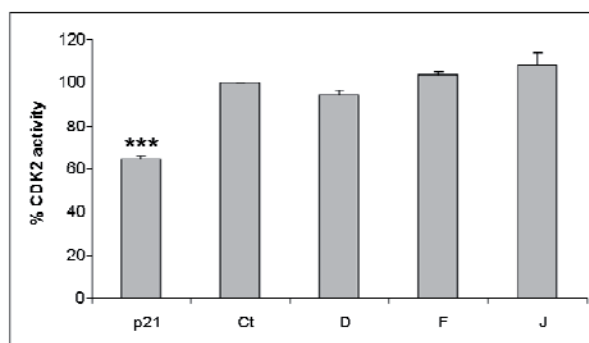


Figure 4. Cyclin E immunoprecipitations and CDK2 kinase assays tested in the presence of IC_{50} of CDK4 and CDK6 of the products **D**, **F** and **J**. Histone H1 was used as a substrate and p21^{Kip/Cip} as a positive control of the inhibition. Mean + SD; n = 3. A triple asterisk (***) indicates $p < 0.001$

Tumor cell viability inhibition.

Products **D**, **F** and **J** were tested in different cell lines, which were selected according to the criteria that follows. The HCT116 colon adenocarcinoma cells were selected because they have an unaltered pRb expression, and, of the two p16^{INK4A} alleles they express only a mutant allele while the wild type allele is silenced (Myohanen *et al.*, 1998), which make them very interesting for testing possible inhibitors emulating p16^{INK4a} activity. To assess whether the compounds had some selectivity for normal *versus* cancer cells, human normal colon cells NCM460 were selected to be treated with **D**, **F** and **J**. Moreover, two different breast tumor cell lines (MCF-7 and SKBR-3) were selected because both had unaltered pRb but they were *Her2* negative or *Her2* positive, respectively. Finally, the COS-1 cell line was selected due to its perturbation on pRB.

Cells were incubated with increasing doses of each compound during 72h and we estimated the concentration at which cell proliferation was inhibited by 50% with respect to the control condition (IC_{50}).

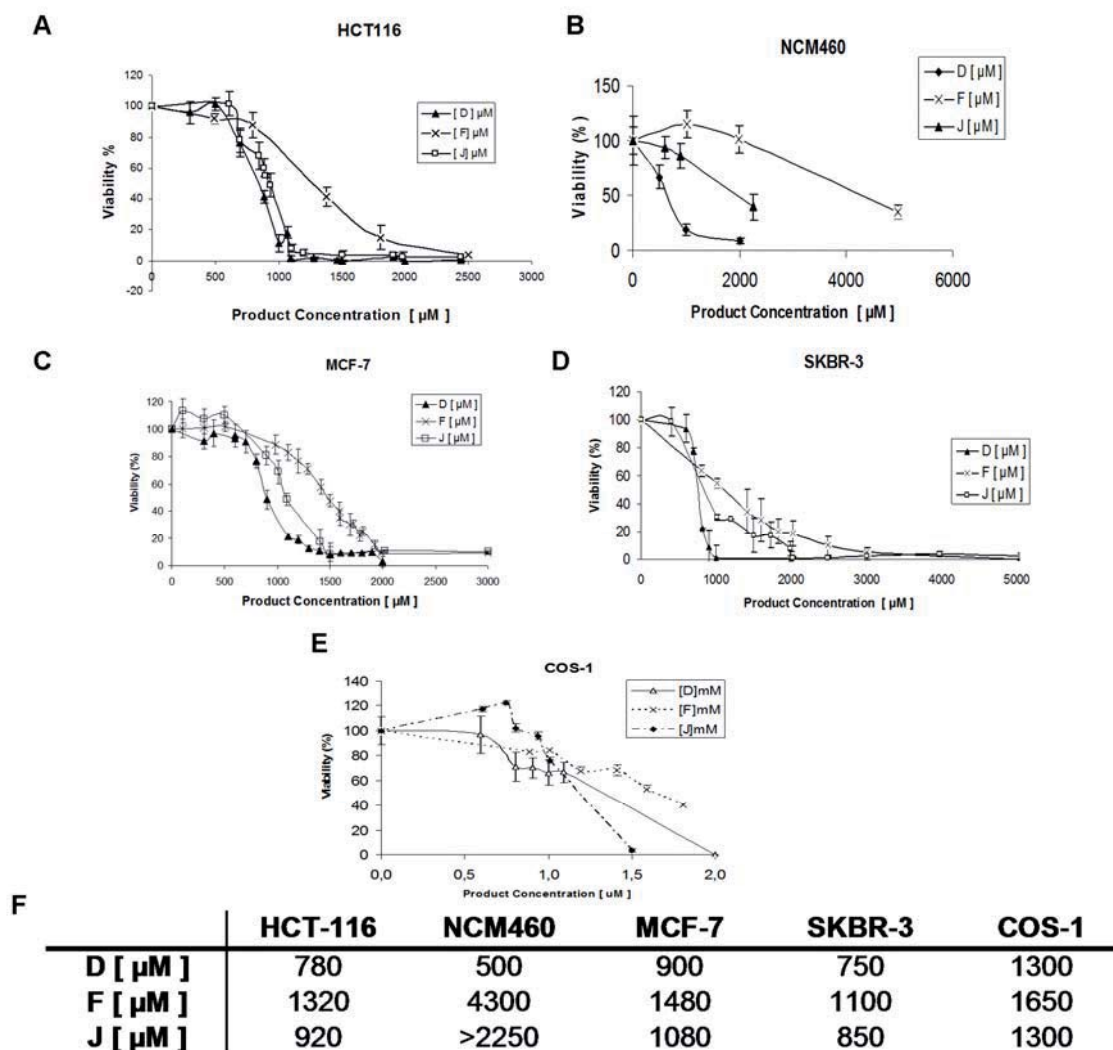


Figure 6. D, F, J and 1 dose-response curves for cell proliferation in different cell lines. After 72 h, dose-escalating treatment with the compounds caused dose-dependent inhibition of cell proliferation. Data are presented as mean \pm standard deviation of three independent experiments. Viability assay was performed through the MTT method described in *Materials and Methods* section and expressed as a percentage of untreated control cell proliferation. **A.** HCT116 cell cultures were treated with increasing doses of **D**, **F** and **J** as indicated on the x axis (IC_{50} = 780, 1320 and 920 μ M). **B.** NCM460 cell cultures were treated with increasing doses of **D**, **F** and **J** as indicated on the x axis (IC_{50} = 500, 4300 and 2250 μ M). **C.** MCF-7 cell cultures were treated with increasing doses of **D**, **F** and **J** as indicated on the x axis (IC_{50} = 900, 1480 and 1080 μ M). **D.** SKBR-3 cell cultures were treated with increasing doses of **D**, **F** and **J** as indicated on the x axis (IC_{50} = 750, 1100 and 850 μ M). **E.** COS-1 cell cultures were treated with increasing doses of **D**, **F** and **J** as indicated on the x axis (IC_{50} = 900, 1480 and 1080 μ M). **F.** 50% inhibitory concentration (μ M) of **D**, **F** and **J** in tumor cells lines (HCT116, MCF-7, SKBR-3 and COS-1) and non-tumor cell line (NCM460).

Results summarized in Figure 6 show that MCF-7 cells (which do not over-express the *Her2* gene) are less sensitive (Figure 6.C) to **D**, **F** and **J** than SKBR-3 cells (which over-express the *Her2* gene) (Figure 6.D). These results confirmed the hypothesis that CDK4- and CDK6-selective inhibitors as ours could be a potential tool to treat HER2+ breast cancer.

Moreover, the IC_{50} values for HCT116 cells were in the milimolar range (D- IC_{50} = 780 μ M; F- IC_{50} = 1320 μ M; J- IC_{50} = 920 μ M). **F** and **J** compounds presented a higher cytotoxicity on the HCT116 tumor cell line than on the NCM460 non-tumor cell line (Figure 6.A and B). This result might indicate that they could be useful for *in vivo* experiments.

Finally, the results also showed that the IC_{50} of products **D**, **J** and **F** on COS-1 cells, which express a constitutively inactivated form of pRb, were much higher than the IC_{50} of **D**, **J** and **F** products on HCT116 cell line.

From the obtained results in the different tested tumor cell lines we conclude that HCT116 is the most sensitive to CDK4 and CDK6 inhibitors and we decided to continue a further characterization of the inhibitors on this cell line. As synthesis of higher amounts of ester derivatives is difficult and time consuming procedure we decided to characterize the effects of **D**, **F** and **J** on HCT116 cells in more detail to select the best compound before synthesizing the corresponding ester.

Treatment with products F, D and J is directly associated with a decrease in pRb phosphorylation

To check the phosphorylation of pRb in his Ser780, a specific target of CDK4 and CDK6, we performed Western blot studies. Figure 7 shows a significant decrease in CDK4 and CDK6-specific pRb Ser(780) phosphorylation when HCT116 were treated with the IC_{100} of products **F** and **J** for 24h. These data support the proposed mechanism of action of these inhibitors blocking hyperphosphorylation of pRb by inhibiting CDK4 and CDK6 activity.

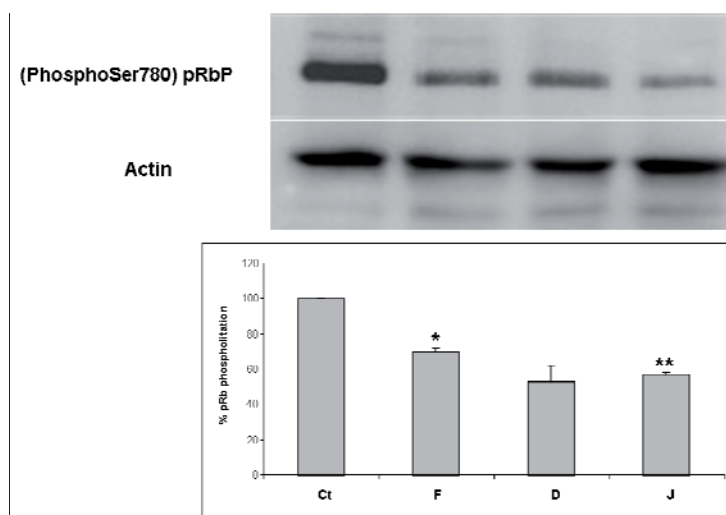


Figure 7. pRb phosphorylation in Western blot analysis. (Ser780) phosphorilated pRb analysis (110K) and actine (46KDa) as a protein control. Extracts of HCT116 cells had previously been treated with **F**, **D** and **J** IC₁₀₀ for 24 h. A single asterisk (*) indicates $p < 0.05$, whereas double asterisks (**) indicate $p < 0.01$. One representative example is shown in each case.

Altogether, the results suggested that **D**, **F** and **J** products inhibited CDK4 and CDK6 activities inside the cell in accordance with what we had observed in the *in vitro* kinase assays.

Improvement of the CDK4 and CDK6 inhibitor compounds.

As product **F** is the most selective to tumor vs. non-tumor cell lines and the most selective to CDK4 and CDK6 we decided to synthesize the acetoxymethyl ester of **F** (identified with the arabic number **1**) as it was described in *Materials and Methods* in order to improve its entrance inside the cell and thus permitting the interaction with the target (Figure 8).

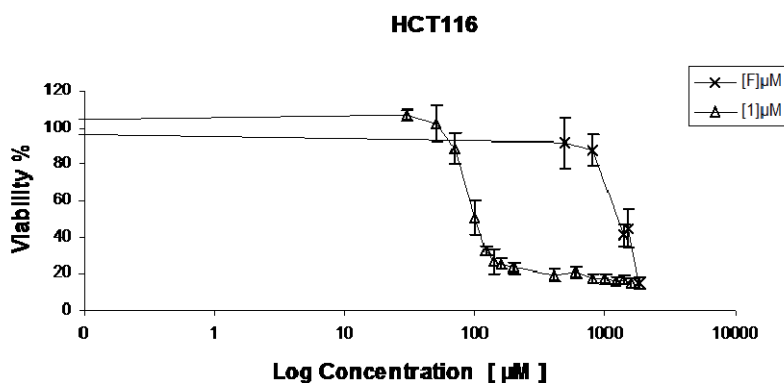


Figure 8. F and 1 (acetoxymethyl-F) dose-response curve for cell proliferation in the HCT116 cell line. The effect of the esterification of the molecule **F** decreases one magnitude order.

Figure 8 shows that the IC_{50} of the acetoxymethyl ester of **F** is 100 μ M, around 13 times lower than that obtained for compound **F**. The lower IC_{50} demonstrated that the ester facilitates the entrance of the compound to the cells. Following the encouraging results of these compounds, another generation of ester derivative molecules will be designed in order to improve their entry into the cells and their inhibition activity on cell assays. The docked structure of the compounds will be considered as a starting point to visualize different changes to improve the interaction pattern. Then, taking into account the allosteric interactions as well as the esteric impediment and the hydrophilic properties of **D**, **F** and **J**, it could be possible to design new improved CDK4 and CDK6 inhibitors.

DISCUSSION

It is well established that eukaryotic cell proliferation is a tightly regulated system controlled by a network of cyclin-CDK complexes (Malumbres and Barbacid, 2001); (Obaya and Sedivy, 2002; Sherr, 1996). In epithelial cells, the major regulatory checkpoint in this process is the transition from G_1 to S phase, which is characterized by the phosphorylation of pRb, being the CDK4 and CDK6-cyclin D complexes responsible for the beginning of this reaction. Carcinomas are of epithelial origin and they exhibit a general dependence on CDK4 and CDK6-cycD activity for their proliferation (Joshi *et al.*, 2007). In fact, inhibition of CDK4 and CDK6-cycD results in the inhibition of tumor cell proliferation, as evidenced by the experiments using antisense or antibodies for cyclin D1 (Arber *et al.*, 1997; Driscoll *et al.*, 1997; Morgan, 1997; Morgan *et al.*, 1998; Schrumpp *et al.*, 1996). These observations suggested that an agent that could block the activity of these enzyme complexes might be of therapeutic value against most carcinomas.

In this study, we report the results of our efforts to find inhibitors of CDK4 and CDK6 and their possible therapeutic utility. We have found three novel small-molecule inhibitors of CDK4 and CDK6 (named **D**, **F** and **J**), which are substantially different from the ones reported in the literature so far. Unlike most synthetic CDK4 and CDK6 inhibitors, the aim of our products was not to target the ATP-binding site of these kinases, but the binding domain for p16^{INK4a}, which is their natural inhibitor. With this different approach we were hoping to avoid cross-reactivity with other kinases, thanks to a better specificity, and therefore to improve future therapeutic results in cancer patients.

Compounds **D**, **F** and **J** proved to be good inhibitors of CDK4 and CDK6-cyclin D complexes *in vitro*, while on the other hand, and with the exception of **J**, the compounds tested showed little or no activity against other CDKs of the cell cycle, like CDK2 or CDK1, therefore fulfilling the first requirement for this study. Furthermore, when they were tested in the

HCT116 colon adenocarcinoma cell line and in the NCM460 non-tumor cell line products **F** and **J** showed a selective anti-tumor effect, suggesting that a therapeutic window could be achieved in patients, as they seemed to have a selective cytotoxic effect on rapidly proliferating cells over slowly proliferating normal cells, a property that would make them suitable to be used in anticancer therapies.

The results found in the breast cancer cell lines were especially interesting. The products inhibited more efficiently the proliferation of the cell lines which were HER2-positive. These results corroborated those described before, which suggested that drugs targeting CDK4 and CDK6 activity could be developed to specifically treat certain breast tumors that depended on CDK4 activity and were HER2-positive. (Reddy *et al.*, 2005). Thus, taking into account the data from the current study together with already published work, there is a strong rationale for clinical development of CDK4 and CDK6 inhibitors for combination with anti-HER2 therapy (trastuzumab or tamoxifen) (Finn *et al.*, 2009).

Furthermore, the COS-1 cell line, which has a constitutively form of inhibited pRb showed a resistance towards the treatment with the products **D**, **F** and **J**, which means that this inhibitors could be useful in cancer therapy in those tumors in which pRb is unaltered. This results suggest that our CDK4 and CDK6 inhibitors, despite their high IC_{50} in different cell lines, are good and selective inhibitors of the CDK4 and CDK6 kinases, and that the synthesis of new ester derivatives is necessary to improve their entry inside the cell.

Once inside the cell, all products behaved like CDK4 and CDK6 inhibitors and provoked the desired effect of decreasing pRb phosphorylation, arresting the cell cycle and provoking a slight apoptosis. All this meant that these products could target selectively CDK4 and CDK6 inside the cells and cause all these molecular effects. Therefore, the *in vitro* kinase assays, the cell-based proliferation assays and the molecular effects provoked by the products under study are good predictive evaluations of potency and efficacy of the products in cell systems and, in this project, they have indicated that a new family of D, F and J derivatives should be generated in order to complete this primary screening for CDK4 and CDK6 inhibitors discovery to be able to proceed into *in vivo* experiments. The results presented in this paper show that CDKs constitute interesting targets for anticancer therapy and it is expected that these inhibitors will have high practical applicability and usefulness in cancer treatment. However, it is important to take into account that for this study we have selected a specific area of interaction between CDK6 and p16^{INK4a} to design our compounds. The CDK6-p16^{INK4a} contact surface presents other groups of interaction that, if studied using similar methods, might bring new families of inhibitors in the near future. Nevertheless, the outcome of clinical trial results will decide the final beneficial effects of CDK inhibitors.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants SAF2008-00164 and CTQ2006-06588/BQU From the Ministerio de Ciencia e Innovación and personal financial support (FPU program) from the Ministerio de Educación y Ciencia, ISCIII-RTICC (RD06/0020/0046) from the Ministerio de Ciencia e Innovación, the Instituto de Salud Carlos III and the European Union FEDER funds (http://ec.europa.eu/regional_policy/funds/feder/index_es.htm). It has also received financial support from the Government of Catalonia (2005SGR00204). One of us (M. Z.) acknowledges the Generalitat de Catalunya for the predoctoral fellowship.

BIBLIOGRAPHY

- Arber, N., Doki, Y., Han, E.K., Sgambato, A., Zhou, P., Kim, N.H., Delohery, T., Klein, M.G., Holt, P.R., and Weinstein, I.B. (1997). Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res* **57**, 1569-1574.
- Balter, M., and Vogel, G. (2001). Nobel prize in physiology or medicine. Cycling toward Stockholm. *Science* **294**, 502-503.
- Barvian, M., Boschelli, D.H., Cossrow, J., Dobrusin, E., Fattaey, A., Fritsch, A., Fry, D., Harvey, P., Keller, P., Garrett, M., *et al.* (2000). Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J Med Chem* **43**, 4606-4616.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Comin-Anduix, B., Boros, L.G., Marin, S., Boren, J., Callol-Massot, C., Centelles, J.J., Torres, J.L., Agell, N., Bassilian, S., and Cascante, M. (2002). Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *J Biol Chem* **277**, 46408-46414.
- Craig, C., Kim, M., Ohri, E., Wersto, R., Katayose, D., Li, Z., Choi, Y.H., Mudahar, B., Srivastava, S., Seth, P., *et al.* (1998). Effects of adenovirus-mediated p16INK4A expression on cell cycle arrest are determined by endogenous p16 and Rb status in human cancer cells. *Oncogene* **16**, 265-272.
- Dai, Y., and Grant, S. (2003). Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* **3**, 362-370.
- Douglas, M.N., Anna, S., Monica, M., Alessandra, T., Lucrezia, M., Igea, D.A., Giuseppe, S., Alfonso, B., Daniela, L., Adriana, A., *et al.* (2005). In vitro and in vivo tumor growth inhibition by a p16-mimicking peptide in p16INK4A-defective, pRb-positive human melanoma cells. *J Cell Physiol* **202**, 922-928.
- Driscoll, B., Wu, L., Buckley, S., Hall, F.L., Anderson, K.D., and Warburton, D. (1997). Cyclin D1 antisense RNA destabilizes pRb and retards lung cancer cell growth. *Am J Physiol* **273**, L941-949.
- Finn, R.S., Dering, J., Conklin, D., Kalous, O., Cohen, D.J., Desai, A.J., Ginther, C., Atefi, M., Chen, I., Fowst, C., *et al.* (2009). PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res* **11**, R77.

- Fischer, P.M., and Gianella-Borradori, A. (2005). Recent progress in the discovery and development of cyclin-dependent kinase inhibitors, pp. 457-477.
- Frangioni, J.V., and Neel, B.G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* **210**, 179-187.
- Fry, D.W., Bedford, D.C., Harvey, P.H., Fritsch, A., Keller, P.R., Wu, Z., Dobrusin, E., Leopold, W.R., Fattaey, A., and Garrett, M.D. (2001). Cell cycle and biochemical effects of PD 0183812. A potent inhibitor of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *J Biol Chem* **276**, 16617-16623.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. In (New York, Laboratory Press), p. 469.
- Ho, A., and Dowdy, S.F. (2002). Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**, 47-52.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33-38, 27-38.
- Joshi, K.S., Rathos, M.J., Joshi, R.D., Sivakumar, M., Mascarenhas, M., Kamble, S., Lal, B., and Sharma, S. (2007). In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00. *Mol Cancer Ther* **6**, 918-925.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landis, M.W., Pawlyk, B.S., Li, T., Sicinski, P., and Hinds, P.W. (2006). Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* **9**, 13-22.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 222-231.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2006). Is Cyclin D1-CDK4 kinase a bona fide cancer target? *Cancer Cell* **9**, 2-4.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**, 153-166.
- Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J.J., Torres, J.L., and Cascante, M. (2003). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur J Nutr* **42**, 43-49.
- McInnes, C. (2008). Progress in the evaluation of CDK inhibitors as anti-tumor agents. *Drug Discovery Today* **13**, 875-881.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-291.
- Morgan, D.O., Fisher, R.P., Espinoza, F.H., Farrell, A., Nourse, J., Chamberlin, H., and Jin, P. (1998). Control of eukaryotic cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinases. *Cancer J Sci Am* **4 Suppl 1**, S77-83.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Moyer, M.P., Manzano, L.A., Merriman, R.L., Stauffer, J.S., and Tanzer, L.R. (1996). NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **32**, 315-317.

- Myohanen, S.K., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1998). Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* **58**, 591-593.
- Obaya, A.J., and Sedivy, J.M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **59**, 126-142.
- Ramos-Montoya, A., Lee, W.-N.P., Bassilian, S., Lim, S., Trebukhina, R.V., Kazhyna, M.V., Ciudad, C.J., Noé, V., Centelles, J.J., and Cascante, M. (2006). Pentose phosphate cycle oxidative and non-oxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* **119**, 2733-2741.
- Reddy, H.K., Mettus, R.V., Rane, S.G., Grana, X., Litvin, J., and Reddy, E.P. (2005). Cyclin-dependent kinase 4 expression is essential for neu-induced breast tumorigenesis. *Cancer Res* **65**, 10174-10178.
- Ruas, M., and Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* **1378**, F115-177.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* **3**, 696-700.
- Russo, A.A., Tong, L., Lee, J.-O., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1998). Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* **395**, 237-243.
- Schrump, D.S., Chen, A., and Consoli, U. (1996). Inhibition of lung cancer proliferation by antisense cyclin D. *Cancer Gene Ther* **3**, 131-135.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.
- Smith, D.B., and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Suzuki-Takahashi, I., Higashi, H., Yoshida, E., Nishimura, S., and Kitagawa, M. (1997). Effects of Exogenous p16INK4a on Growth of Cells with Various Status of Cell-Cycle Regulators. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **234**, 386-392.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (2003). Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* **3**, 233-245.
- Toogood, P.L., Harvey, P.J., Repine, J.T., Sheehan, D.J., VanderWel, S.N., Zhou, H., Keller, P.R., McNamara, D.J., Sherry, D., Zhu, T., *et al.* (2005). Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J Med Chem* **48**, 2388-2406.
- van den Heuvel, S., and Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**, 2050-2054.
- Villacanas, O., Perez, J.J., and Rubio-Martinez, J. (2002). Structural analysis of the inhibition of Cdk4 and Cdk6 by p16(INK4a) through molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn* **20**, 347-358.
- Yu, Q., Geng, Y., and Sicinski, P. (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* **411**, 1017-1021.
- Yu, Q., Sicinska, E., Geng, Y., Ahnstrom, M., Zagozdzon, A., Kong, Y., Gardner, H., Kiyokawa, H., Harris, L.N., Stal, O., *et al.* (2006). Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer Cell* **9**, 23-32.
- Zhu, G., Conner, S., Zhou, X., Shih, C., Brooks, H.B., Considine, E., Dempsey, J.A., Ogg, C., Patel, B., Schultz, R.M., *et al.* (2003a). Synthesis of quinolinyl/isoquinolinyl[a]pyrrolo [3,4-c] carbazoles as cyclin D1/CDK4 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 1231-1235.

Zhu, G., Conner, S.E., Zhou, X., Shih, C., Li, T., Anderson, B.D., Brooks, H.B., Campbell, R.M., Considine, E., Dempsey, J.A., *et al.* (2003b). Synthesis, structure-activity relationship, and biological studies of indolocarbazoles as potent cyclin D1-CDK4 inhibitors. *J Med Chem* **46**, 2027-2030.

Capítol 3

Disseny, síntesi i propietats antitumorals de nous inhibidors de CDKs

Miriam Zanuy¹, Marina Pararols², Bernat Auqué², Marta Cascante¹ i M. Dolors Pujol^{2*}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology, Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

² Department of Pharmacology and therapeutic Chemistry. Pharmacology Chemistry (CSIC associated Unit). University of Barcelona. Joan XXIII. 08028 Barcelona, Spain.

RESUM

En aquest informe es descriuen els anàlegs de calceïna dissenyat per explorar el farmacòfor i el seu efecte sobre l'activitat citotòxica i la selectivitat de CDK. Aquests compostos es van trobar interessants com antitumorals que tenen activitat antiproliferativa en línies cel·lulars de càncer humà. Diversos d'aquests compostos van mostrar inhibició de la fosforilació de pRb arrest en la fase G1 del cicle cel·lular. A més a més, es van estudiar les relacions estructura-activitat d'aquest compostos.

Chapter 3

Design, Synthesis and Anticancer Properties of New CDKs Inhibitors

Miriam Zanuy¹, Marina Pararols², Bernat Auqué², Marta Cascante¹ i M. Dolors Pujol^{2*}.

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology, Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

²Department of Pharmacology and therapeutic Chemistry. Pharmacology Chemistry (CSIC associated Unit). University of Barcelona. Joan XXIII. 08028 Barcelona, Spain.

^Ψ*Correspondence address:* MDolors Pujol, Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, University of Barcelona, Faculty of Pharmacy, Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain. Phone: 0034 934024534; Fax: 0034 934021886; E-mail: mdpujol@ub.edu.

RUNNING TITLE

CDKs Inhibitors

KEYWORDS

Apoptosi

CDKs inhibitors

Cell cycle

Retinoblastoma protein

ABBREVIATIONS

CDK: cyclin dependent kinase

CKI: CDK inhibitor

FACS: Fluorescence-activated cell sorter

FCS: Foetal calf serum

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

pRb: retinoblastoma protein

ABSTRACT

In this report we describe analogs of calcein designed to explore the pharmacophore and their effect on cytotoxic activity and CDK selectivity. These compounds were found to be interesting such as antitumor possessing good antiproliferative activity against human carcinoma cell lines. Several of these compounds showed inhibition of *pRb* phosphorylation and arrest tumor cells at the G₁ phase. Structure–activity relationships were also investigated.

INTRODUCTION

The cyclin dependent kinases (CDKs) are serine/threonine protein kinases that regulate the division cycle of eukaryotic cells, apoptosis, regulation of transcription, and differentiation. In general, a cyclin-dependent kinase is activated only by association with cyclin, forming a cyclin-dependent kinase complex (Gray (Damiens and Meijer, 2000; Gray *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 2002) Specific CDKs are involved in distinct phases of the cell cycle (**Table 1**). A cyclin-CDK complex is regulated by several kinases and phosphatases, including Wee, CDK-activating kinase (CAK) and Cdc25. CDK feeds back on Wee and Cdc25 to inhibit and enhance their respective activities, inhibitors of Cdc25 could be used as anticancer agents. Hartwell, L. H., Hunt, R. T. and Nurse, P. M. won the 2001 Nobel Prize in Medicine for their description of cyclin-dependent kinase mechanisms and its role in the regulation of the cell cycle. CDKs are considered a potential target for anti-cancer treatment, these kinases phosphorylated the retinoblastoma (Rb) tumor suppressor protein (Malumbres and Barbacid, 2006). The phosphorylated Rb causes the release of members of the transcription factors, E2F proteins. It is noteworthy that inhibition of CDK4 results in hyperphosphorylation of Rb and restricts the passage only to G₁ phase, whereas CDK2 regulates G₁ and also S phases (Dyson, 1998; Sandhu and Slingerland, 2000). Malumbres and col. have reported that knockdown of CDK4 in mammary tumor cells prevents tumor formation. These results suggest that selective inhibition of CDK4 could be a more valuable mechanism to cancer treatment than that of CDK2 (Malumbres and Barbacid, 2006). The 2-(*R*)-(1-Ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine (*Seliciclib*) inhibits CDK2/E, CDK2/A, CDK7 and CDK9 and are undergoing clinical trials (McInnes, 2008). CDK4 and CDK6 are closely related proteins with basically indistinguishable biochemical properties (Malumbres and Barbacid, 2005).

<i>Phase cell cycle</i>	<i>CDK</i>	<i>Cyclin</i>
G ₁	CDK2, CDK4, CDK6	D and E
S	CDK2	A and E
G ₂	CDK2, CDK1	A
M	CDK1	B

Table 1. CDKs, cyclin and cell cycle.

Intensive efforts have been addressed in recent years to identify novel inhibitors of several CDKs and are currently showing promising results in early clinical trials (Liu *et al.*, 2009). Until now a big number of compounds have been identified as CDK inhibitors and are non selective. We recently have been found that calcein (**Chart 1**), a fluorescein complex possess cytotoxic activity by several mechanism and have identified as CDKs inhibitor. Calcein show several toxic effects and its low solubility presented a challenge for clinical development. We report herein the design and synthesis of small and novel molecules analogues of *calcein*, their CDK inhibitory activity and cytotoxic potential against human cancer cell lines to verify our hypothesis that selective CDKs inhibitors will provide an effective treatment of cancer and CDK4 can be considered an attractive target for the identification of new anti-cancer agents.

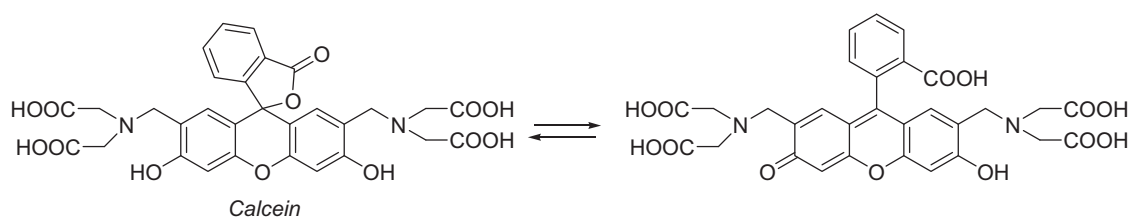


Chart 1. Chemical structures of *calcein*.

To our knowledge, the disubstituted lactones that we studied in this work have not previously incorporated into an antitumor structure. This manuscript describes the first full disclosure of our synthetic efforts in this area with 1-13 representative examples. Different modifications maintaining the same backbone were carried out, as those indicated in **Chart 2**: (a) modification of R substituent, (b) bioisosterism X = O or NH, and (c) cyclisation of the structure to xanthene system.

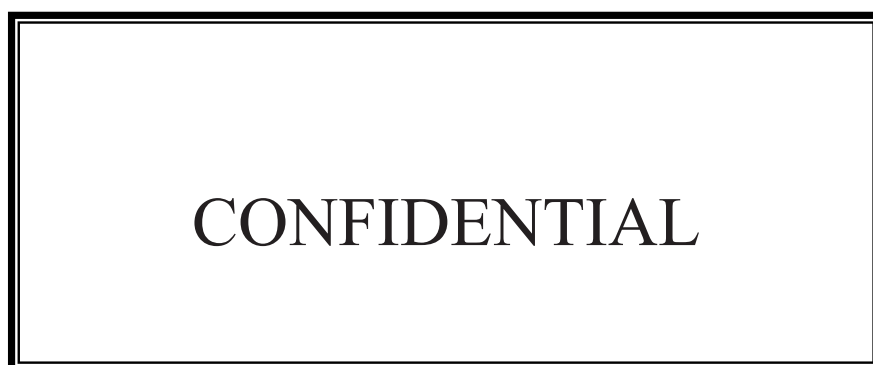


Chart 2. Design of compounds 1-13 from *calcein*.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry

The synthesis of the disubstituted lactones (**Table 2**) was accomplished according classical reaction conditions as indicated in **Scheme 1** and **2**. In our case phenolphthalein or fluoresceine was treated with the corresponding alkyl halides in basic media and stirred at 120 °C in distilled DMF. The reactions were monitored by thin-layer chromatography. In some cases the purification of the new compounds was very difficult due to their polarity. The chemical structure was confirmed by IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, MS and elemental analysis and purity of these final compounds exceeded 98%.

The alcohols **1**, **7** and **12** were prepared by nucleophilic substitution of 2-bromoethanol by the *bis*-phenol or *bis*-aniline derivatives in ethanol and KOH. The *bis*-nitrile **5** was prepared from **15** by alkylation with 2-chloroacetonitrile. Moreover **5** was the starting material for the preparation of the carboxylic acid **2** and the primary amine **3**. The hydrolysis of **5** by treatment with an acid resin at room temperature gives **2** while the catalytic hydrogenation of **5** at room temperature affords the amine **3**. The arylalkylethers **4** and **13** were performed in good yields from the corresponding phenolphthalein or fluoresceine by treatment with ethyl bromide in DMF using sodium ethoxyde as base. The tetradiol **8** and the aminoalcohols **9** and **10** were prepared from the intermediate epoxide obtained by treatment of **14** with epichloridrine in ethanol and K₂CO₃ stirring at room temperature. The hydrolysis of the intermediate epoxide with acid resin gives the tetradiol **8**, while the opening of the epoxide with methylamine or *N,N*-dimethylhydrazine give regioselectively the aminoalcohols **9** and **10** respectively. The intermediate aniline for the synthesis of compounds **6** and **7** was accomplished via cross-coupling from the corresponding trifluoromethanesulfonic using Pd[(*o*-tolil)₃P]₂Cl₂, (±)BINAP and Cs₂CO₃.

CONFIDENTIAL

Reagents and conditions:



CONFIDENTIAL

Scheme 1. Synthesis of 3,3-disubstituted lactones **1-11**.



CONFIDENTIAL

Scheme 2. Synthesis of spiro-compounds **12-13**.

The first attempt to synthesize the *bis*-stilbene **14** consists on the dibromination of the 1,4-dimethylnaphthalene **20** with NBS under light radiation by radicalary mechanism. Treatment of this dihalogenated intermediate **19** with butyllithium excess involving halogen—metal exchange and treatment of the dilithiated intermediate with the corresponding aldehyde provided the desired disubstituted naphthalene **14** in acceptable yield (**Scheme 3**). The stereochemistry of these alkenes was elucidated using NMR spectrometry. The coupling constant value of 16 Hz indicates de *E* stereochemistry of olefins.



CONFIDENTIAL

Scheme 3. Synthesis of diester **14**.

DISCUSSION

In this investigation, we synthesized some novel lactones that were expected to shown anticancer properties by inhibition of CDKs.

Noun	Compound	Formula	M.Weight	IC ₅₀ HCT116 (μ M)	IC ₅₀ NCM460 (μ M)	Cycle (HCT116) ^a	Cycle (HCT116) ^b
1		C ₂₄ H ₂₂ O ₆	406.43	13 ± 3.0	20 ± 4	43.96	24.47
2		C ₂₄ H ₁₈ O ₈	434.39	57 ± 3.0	N.T.	30.44	62.68
3		C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₄	404.46	185 ± 46	233 ± 38	36.52	37.71
4		C ₂₄ H ₂₂ O ₄	374.43	70 ± 2.9	105 ± 11	68.635	46.81
5		C ₂₄ H ₁₆ N ₂ O ₄	396.39	85 ± 13	289 ± 30	25.472	35.03
6		C ₂₈ H ₃₄ N ₄ O ₂	458.6	42 ± 10	76 ± 6.2	34.95	37.10
7		C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₄	404.46	43 ± 6.1	88 ± 5.4	66.46	52.18
8		C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₆	464.51	81 ± 17	226 ± 5.7	62.58	61.84
9		C ₈ N ₂ O ₂ H ₂₀	492.33	280 ± 19	> 500	N.T.	N.T.
10		C ₁₀ N ₄ O ₂ H ₂₆	550.33	200 ± 18	250 ± 21	N.T.	N.T.
11		C ₄₆ O ₆ N ₄ F ₂ H ₄₆	790.89	300 ± 11	255 ± 18	N.T.	N.T.
12		C ₂₄ H ₂₀ O ₇	420.41	800 ± 75	N.T.	30.59	N.T.
13		C ₂₄ H ₂₀ O ₅	388.41	285 ± 36	N.T.	34.91	49.82
14		C ₃₁ O ₈ H ₃₂	532.58	340 ± 33	>400	N.T.	N.T.

CONFIDENTIAL

Table 2. Biological activity of 1-14 compounds. Inhibition of HCT116 and NCM460 cell proliferation measured by MTT (*in vitro* biological assay).

(IC₅₀ values are the average of at least four determinations in triplicate obtained in independent experiments. Variation between replicates was less than 5%).

a Percentage of HCT116 cells arrested in G₁ cell cycle phase after 48 h of exposure to the indicated concentration of problem compound.

b Percentage of HCT116 cells arrested in G₁ cell cycle phase after 72 h of exposure to the indicated concentration of problem compound.

The percentage of not-treated HCT116 cells arrested in G₁ cell cycle phase after 48 or 72h was 32.99 and 35.47 respectively. (n.t.) not tested (considered not interesting due to poor effect on HCT116 cell lines).

In vitro experiments demonstrated that **12** and **13** compounds are the ones that have a lower antiproliferative activity; it is due to the fact that these compounds have the smallest conformational liberty in consequence of the ether cyclic and the tricycle group of the spiroxanthene system. The improvement that supposes the elimination of the cyclic ether it is show comparing the activity of the compounds **13** and **12** with the activity of **4** and **1**, respectively. At this point, it was decided did not develop more compounds with the pentacyclic structure and the study was focused on the derivatization of calcein without ether cycle.

The pentacyclic compounds show to have more activity in the tumor cell line HCT116. Compounds **4** and **5**, who contain more lipophilic substituents than the previous, have intermediate IC₅₀ values. The presence of non polar groups moves us away of the pharmacophor and it is corroborated for the high values of IC₅₀ of the compounds **9**, **10**, **11** and **14**.

The compounds with a major antiproliferative activity are the diol **1** and the hydroxyl derivates **7** and **8**. The substitution of the phenyl ethers to anilines from **7** and the hydroxyl groups as well as the presence of alcoholic groups arise the activity of the compounds. Finally, the diacid **2** have a pour antiproliferative activity although it could be because the high polarity of the compound that could make the way thought the cell membrane difficult.

The results show that all the assayed compounds have major activity on the tumor cell line HCT116 than on the non tumour cell line NCM460. This means that they are partially specific to the non-tumor cell line.

The products **1** and **3** are not interesting to the search of new antitumor agents. Whereas **5**, **8**, **4**, **6** and **7** showed selective activity on HCT116 cell line 3.5, 2.8, 1.5 and 2 μM respectively.

All the products, with the exemption of **5**, arrest the cell cycle on G₁ phase at 48 and 72 h. The comportment of each product is different and it's due to the different polarity of them. At 24 (dada not show) and 48 h the treatment with the compound **2** does not arrest the cell in G₁ phase but it happens at 72 h because the molecule is too polar (two carboxylic acids and the carbonyloxy group of the lactone) and has some difficulties to cross the cell membrane. Products **3** and **4** arrest the cell cycle in G₁ phase and it is proportional at the dose that the cells

are treated with the products (data not shown). Finally, compounds **7** and **8** showed a significant G₁ cell cycle arrest as it is make for CDK4 and CDK6 inhibitors.

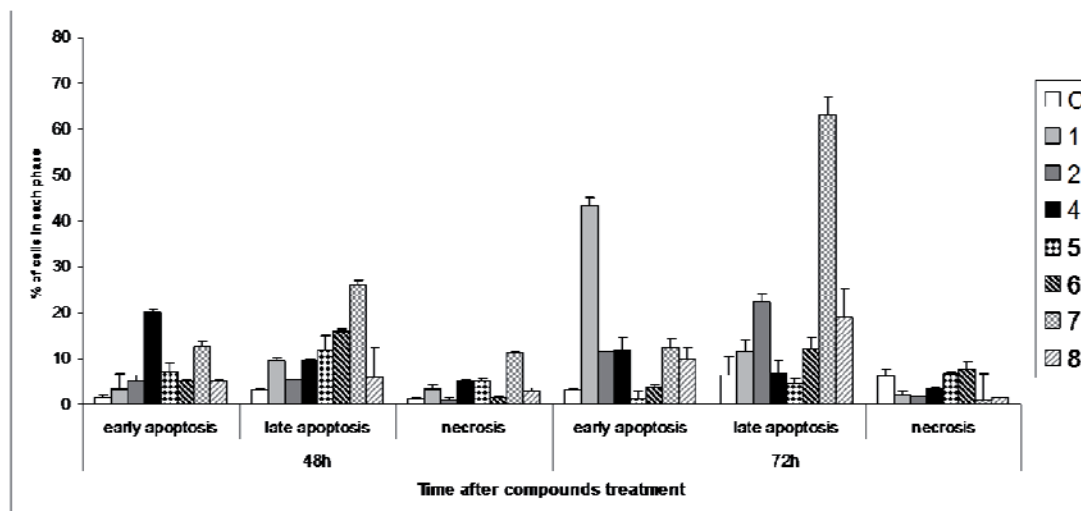


Figure 1. Apoptosis of HCT116 cell line at 48 and 72 h measured by FACS after an exposure of the IC₅₀ at 72 h of the compounds.

The number of cells in apoptosis has been assessed by flow cytometry analysis of Annexin V-FITC staining. At the respective IC₅₀ concentrations, the compounds induce significantly early and late apoptosis as a consequence G₁ phase arrest. Concretely, the effect of the **2**, **7** and **8** compounds is notably higher than the effect of the other compounds that correlate with the effect of these products arresting with more efficiency the cell cycle in G₁ Phase. It is also known that the Ser-780 residue on Rb is specifically phosphorylated by CDK4. The inhibition of CDK4 enzyme will result in the inhibition of Rb phosphorylation on Ser-780 and cell cycle arrest in the G₁ phase (Brugarolas *et al.*, 1999).

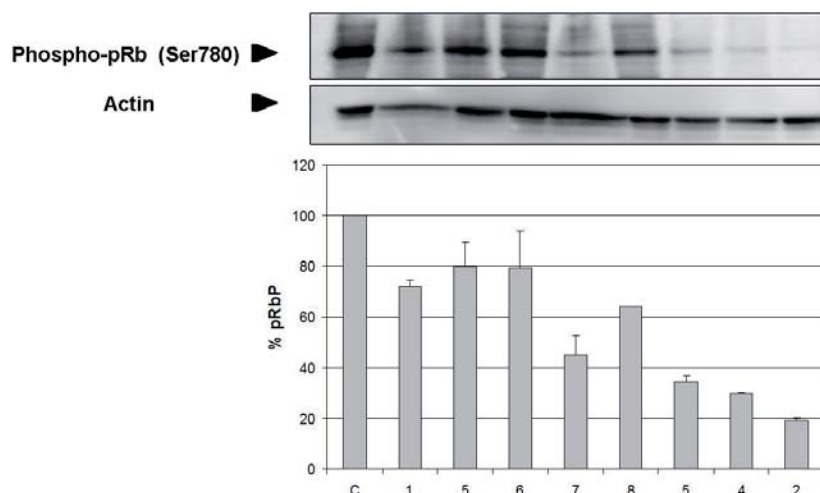


Figure 2. Phosphorylation of pRb ser780. HCT116 cells were treated with IC₅₀ of compounds for 48 h and the extracts were blotted specifically for Phosphoserine780 of pRb. In the figure, all the compounds

clearly decrease such phosphorylation after 48 h of exposition, especially dramatic by **2**, **4** and **7** compounds.

HCT116 colon carcinoma cell line was treated with IC_{50} of each compound of 72h at 48 h. The results show a decrease of phosphorylation of Ser780 of pRb. This decrease was more extremely with **1**, **5**, **6** and **8** compounds.

To investigate whether cell death produced by the most active compounds (**1**, **2**, **4**, **7** and **8**) are consequence that they are potential inhibitors of CDK4 and CDK6, immunoprecipitations were performed followed by kinase assays in the presence or absence of the products.

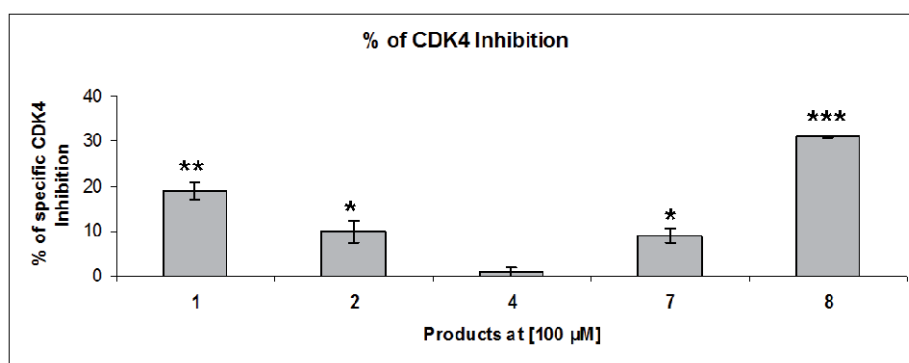


Figure 3. CDK4 kinase assay at 100 μ M of most active compounds. Staurosporine at 1.3×10^{-7} was used as positive control of CDK4 inhibition. A single asterisk (*) indicates $p < 0.05$, double asterisks (**) indicate $p < 0.01$ whereas triple asterisks (***) indicate $p < 0.001$. The experiment was performed 2 times (Mean + SD; $n = 2$).

Only compound **8** shows inhibition between 25% and 50%, which is indicative of weak to moderate effects on CDK4 activity. But we hypothesized that the assay kinase performance could have some problems. The products have some solubility and hydrolysis problems due to the assay conditions. Their lactone could be opened and that means that the new structure did not inhibit the CDK4 enzyme.

CONCLUSION

We have described the synthetic approaches for a class of substituted lactones from readily available starting materials. These compounds exemplified by **5**, **7** and **8**, have been identified as interesting CDK4 inhibitors. In addition, these compounds have antiproliferative activities and act as cytotoxic agents with the ability to prevent cell progression. These new

results of structure-activity relation-ship of these series provide valuable information for the design of CDk4 inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Section

Chemistry. Melting points were obtained on an MFB-595010M Gallenkamp apparatus in open capillary tubes and are uncorrected. IR spectra were obtained using a FTIR Perkin-Elmer 1600 Infrared Spectrophotometer. Only noteworthy IR absorptions are listed (cm^{-1}). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Varian Gemini-200 (200 and 50.3 MHz respectively) or Varian Gemini-300 (300 and 75.5 MHz) Instrument using CDCl_3 as solvent with tetramethylsilane as internal standard or $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. Other ^1H NMR spectra and heterocorrelation ^1H - ^{13}C (HMQC and HMBC) experiments were recorded on a Varian VXR-500 (500 MHz). Mass spectra were recorded on a Hewlett-Packard 5988-A. Column chromatography was performed with silica gel (E. Merck, 70-230 mesh). Reactions were monitored by TLC using 0.25 mm silica gel F-254 (E. Merck). Microanalysis was determined on a Carlo Erba-1106 analyser. All reagents were of commercially quality or were purified before use. Organic solvents were of analytical grade or were purified by standard procedures. Commercial products were obtained from Sigma-Aldrich.

General Procedure.

CONFIDENTIAL

Biological Experimental

Cell culture. For the performance of the experiments, human colon adenocarcinoma HCT116 cells (gift from Dr. Capellà (Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain)), were grown in DMEM: HAM F12 (1:1). The medium was supplemented with 10% FCS and penicillin (50 U/mL) and streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Additionally, the HCT116 medium was supplemented with glutamine (2 mM), pyruvic acid (1 mM) and no essential aminoacids (1%). NCM460 cells, obtained by a Material Transfer Agreement with INCELL is an epithelial cell line derived from the normal colon mucosa of a 68-year old Hispanic male (Moyer *et al.*, 1996). These cells were grown as a monolayer culture in M3Base medium (which contains growth supplements and antibiotics) supplemented with 10% heat-inactivated

foetal calf serum and 2.5 mM of D-glucose (final concentration 5 mM glucose). All cell cultures were carried out at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Cell growth inhibition. The assay was performed by a variation of the method described by Mosmann (Matito *et al.*, 2003; Mosmann, 1983; Ramos-Montoya *et al.*, 2006). Growing concentrations of the products were plated in 96-well-flat-bottomed microtitre plates where 1700 HCT116 and 10000 NCM-460 cells/well had been seeded 24 h before. After incubation for 72 hours, MTT dissolved in PBS at 1 mg/mL and sterile filtered was added to the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL. Following 1 hour of incubation, the generated formazan was dissolved with 100 µL of DMSO by well. The absorbance was measured on an ELISA plate reader (Merck ELISA System MIOS version 3.2.) at 550 nm. The concentrations that caused 50% of inhibition of cell growth (IC₅₀) were calculated.

Cell cycle analysis. In order to determine the proportion of cells in each cell cycle phase (G₁, S or G₂), cell cycle analysis was assessed with flow cytometry using a fluorescence-activated cell sorter (FACS). Cells were collected by centrifugation after detaching from the flasks using 0.025% trypsin-EDTA (Invitrogen). Then, approximately 500,000 cells were suspended in 0.5 mL phosphate buffer saline (PBS) followed by the addition of 4.5 mL 70% (v/v) ethanol. The cell suspensions were stored at -20 °C until processing as described (Matito *et al.*, 2003). Briefly, cells were stained in PBS containing 50 µg/mL propidium iodide, 10µg/mL DNase free RNase and 0.1% Triton® X-100. FACS analysis was carried out at 488 nm in an Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). Data of 12,000 cells were collected and analyzed using Multicycle Program (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). For this assay, 5 × 10⁴ HCT116 cells/well were plated in 6 well plates with 3 mL of medium. After 24 h, drugs were added and the cells were incubated for 48 or 72 h. The dose used was their IC₅₀ values. All experiments were performed three times with three replicates by experiment.

Apoptosis assay. Cells were treated as described in the cell cycle analysis section. After centrifugation, cells were washed in binding buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM sodium chloride, 2.5 mM calcium chloride) and suspended in the same buffer. Annexin V-FITC was added according to the Annexin V-FITC kit. Following 30 min of incubation at room temperature and in darkness, propidium iodide (PI) was added 1 min before FACS analysis at 20 µg/mL. Experiments were performed in triplicate. In each experiment, approximately 20 × 10³ cells were analyzed.

Gel electrophoresis and immunoblotting. Cells were lysed in a buffer containing 2% SDS, 67 mM Tris-HCl pH 6.8 and 10 mM EDTA and sonicated twice for 10 s (4 °C). Protein content was measured according to the Bradford procedure (Bradford, 1976), using bovine

serum albumin (BSA) as standard. The extracts were loaded in SDS-PAGE, as described by Laemmli (Laemmli, 1970). After electrophoresis the proteins were transferred to Immobilon-P strips for 2 h at 60 V. The sheets were preincubated in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.05% Tween 20 and 5% BSA for 1 h at room temperature, and then incubated for 1 h at room temperature in TBS, 0.05% Tween 20, 1% BSA and 0.5% defatted milk powder containing anti-phospho-Rb (Ser780) or anti-actin antibodies. After washing in TBS, 0.05% Tween 20 (three times, 10 min each), the sheets were incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (1: 2000 dilution) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 1 h at room temperature. After incubation, the sheets were washed twice in PBS, 0.05% Tween 20 and once in TBS. The reaction was visualized using ECL (Amersham).

Immunoprecipitation and kinase assays. For kinase assays, we collaborated with Cerep enterprise. For the kinase assays, Sf9 insect cells were used and the assay was performed as described by (Kim *et al.*, 2003). ATP + Ulight-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide was used as a substrate. The incubation time was 60 min at 22°C and the product of the reaction, phospho-Ulight-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide, was detected by LANCE method. In order to establish that our method for detecting possible inhibitions was correct, the effect of staurosporine, a CDK4 inhibitor, was tested at 1.3×10^{-7} molar concentration as a positive control for the following kinase assays.

Data analysis and statistical methods. *In vitro* experiments were carried out using three cultures each time for each treatment and then repeated three times. Statistical analyses were performed using the parametric unpaired, two-tailed independent sample *t* test with 95 and 99% confidence intervals. $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) were considered to indicate significant differences in cell cycle or apoptosis in HCT116 and NCM460 cell cultures treated with different drugs.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their sincere gratitude to the Ministerio de Ciencia y Tecnología (CTQ2007-60614/BQU), and the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain (2005-SGR-00180) for the financial support. One of us (M. Z.) acknowledges the Generalitat de Catalunya for the predoctoral fellowship. This study was also supported by grants SAF2008- 490 00164 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and ISCIII-RTICC (RD06/0020/0046) from the Spanish government, from the European Union FEDER funds and from the European Commission (FP7) Etherpaths KBBE-grant agreement no.222639. It has also received financial support from the Government of Catalonia (2005SGR00204).

BIBLIOGRAPHY

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brugarolas, J., Moberg, K., Boyd, S.D., Taya, Y., Jacks, T., and Lees, J.A. (1999). Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after \hat{I}^3 -irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1002-1007.
- Damiens, E., and Meijer, L. (2000). [Chemical inhibitors of cyclic-dependent kinases: preclinical and clinical study]. *Pathologie-biologie* **48**, 340-351.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & development* **12**, 2245-2262.
- Gray, N., Detivaud, L., Doerig, C., and Meijer, L. (1999). ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Current medicinal chemistry* **6**, 859-875.
- Kim, D.M., Yang, K., and Yang, B.S. (2003). Biochemical characterizations reveal different properties between CDK4/cyclin D1 and CDK2/cyclin A. *Experimental & molecular medicine* **35**, 421-430.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Liu, N., Fang, H., Li, Y., and Xu, W. (2009). Recent research in selective cyclin-dependent kinase 4 inhibitors for anti-cancer treatment. *Current medicinal chemistry* **16**, 4869-4888.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 630-641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2006). Is Cyclin D1-CDK4 kinase a bona fide cancer target? *Cancer Cell* **9**, 2-4.
- Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J.J., Torres, J.L., and Cascante, M. (2003). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur J Nutr* **42**, 43-49.
- McInnes, C. (2008). Progress in the evaluation of CDK inhibitors as anti-tumor agents. *Drug Discovery Today* **13**, 875-881.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Moyer, M.P., Manzano, L.A., Merriman, R.L., Stauffer, J.S., and Tanzer, L.R. (1996). NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **32**, 315-317.
- Ortega, F., Acerenza, L., Westerhoff, H.V., Mas, F., and Cascante, M. (2002). Product dependence and bifunctionality compromise the ultrasensitivity of signal transduction cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1170-1175.
- Ramos-Montoya, A., Lee, W.-N.P., Bassilian, S., Lim, S., Trebukhina, R.V., Kazhyna, M.V., Ciudad, C.J., Noé, V., Centelles, J.J., and Cascante, M. (2006). Pentose phosphate cycle oxidative and non-oxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* **119**, 2733-2741.
- Sandhu, C., and Slingerland, J. (2000). Deregulation of the cell cycle in cancer. *Cancer detection and prevention* **24**, 107-118.

Capítol 4

FOXO3a intervé en els efectes antitumorals de l'àcid metilselenínic

Miriam Zanuy¹, Teresa W. Fan², Angel R. Nebreda³, Link Wolfgang Link⁴ i Marta Cascante^{1*}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, CSIC associated unit, Faculty of Biology, University of Barcelona, Biomedicine Institute of the University of Barcelona (IBUB), Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

² Department of Chemistry, University of Louisville, Louisville, Kentucky 40292, USA.

³ Signalling and Cell cycle group, Spanish National Cancer Research Centre CNIO, Madrid, Spain

⁴ Experimental Therapeutics programme, Spanish National Cancer Research Centre CNIO, Madrid, Spain

RESUM

El seleni ha mostrat ser efectiu reduint el risc d'incidència de molts càncers en assajos clínics, entre ells el de pulmó. Recentment, s'ha descrit que els efectes antiproliferatius i proapoptòtics en cèl·lules canceroses associats a l'àcid metilselenínic (MSeA) venen mediat per la fosforilació de la proteïna Akt. També s'ha demostrat que els inhibidors de la via PI3K/Akt sensibilitzen les cèl·lules tumorals amb alts nivells basals de Akt a l'apoptosi induïda pel MSeA. A més a més, els canvis en el perfil metabòlic induïts pel MSeA en cèl·lules de carcinoma de pulmó A-549 indueixen un entramat metabòlic oposat a aquell induït per l'activació de la via PI3K, reforçant la idea que els efectes antitumorals de l'àcid metilselenínic estan mediat per la inhibició de la via PI3K. Malgrat tot, el mecanisme exacte pel qual el seleni inhibeix la via PI3K encara no ha estat totalment elucidat. Així, un millor enteniment de les dianes cel·lulars del MSeA implicades en aquesta via ens permetrà obtenir informació sobre el mecanisme d'acció i ajudarà a optimitzar l'ús del MSeA en teràpies combinades amb inhibidors de la via PI3K.

En aquest estudi hem demostrat que en cèl·lules tractades amb 5 μ M de MSeA, transloquen FOXO3a al nucli després de 1,5 hores de tractament i aquesta translocació persisteix durant 24h. El trencament de les cadenes senzilles del DNA, la disminució de la producció de ROS, l'arrest del cicle cel·lular acompanyat d'una apoptosi significant són esdeveniments que es donen posteriorment, a les 24, 48 i 72h. Així doncs, els nostres resultats suggereixen que FOXO3a és un mediador rellevant de l'acció del MSeA. Aquesta nova evidència del mecanisme d'acció del MSeA obre noves portes a la investigació de les propietats antitumorals i quimiopreventives del seleni i optimitza el disseny de teràpies combinades amb inhibidors de la via PI3K.

Chapter 4

FOXO3a mediates the antitumor effects of methylseleninic acid

Miriam Zanuy¹, Teresa W. Fan², Angel R. Nebreda³, Wolfgang Link⁴ and Marta Cascante^{1*}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, CSIC associated unit, Faculty of Biology, University of Barcelona, Biomedicine Institute of the University of Barcelona (IBUB), Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

² Department of Chemistry, University of Louisville, Louisville, Kentucky 40292, USA.

³ Signalling and Cell cycle group, Spanish National Cancer Research Centre CNIO, Madrid, Spain

⁴ Experimental Therapeutics programme, Spanish National Cancer Research Centre CNIO, Madrid, Spain

**Correspondence address:* Marta Cascante, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology (Edifici Nou), Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Phone: 0034 934021593; Fax: 0034 934021559; E-mail: martacascante@ub.edu

RUNNING TITLE

Effects of MSeA on A-549 cell line.

KEYWORDS

Apoptosis

Cell cycle

FOXO

Methylseleninic acid

Metabolic profile

PI3K

ABBREVIATIONS

MSeA: Methylseleninic Acid

ROS: Reactive oxygen species

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

ABSTRACT

Selenium (Se) has been shown in clinical trials to be effective in reducing the risk of different cancers including lung carcinoma. Recently, it has been described that methylseleninic acid (MSeA) antiproliferative and pro-apoptotic activities in cancer cells could be mediated by the dephosphorylation of Akt. It has been also reported that PI3K/Akt inhibitors greatly sensitized cancer cells, which have high basal activities of Akt, to apoptosis induced by MSeA. Moreover, profiling of metabolic changes induced by MSeA in A-549 lung carcinoma cells showed that MSeA induces a metabolic fingerprint opposite to that induced by PI3K activation reinforcing the idea that MSeA antitumor effects are mediated by the inhibition of PI3K pathway. However, the full mechanism by which selenium inhibits the PI3K pathway and deactivates Akt is still not fully elucidated. A better understanding of the downstream cellular targets of MSeA will provide information on its mechanism of action and will help to optimize its use in combined therapies with PI3K inhibitors.

In this paper we demonstrate that in cells treated with 5 μ M of MSeA, FOXO3a translocates to the nucleus after 1.5h and that this translocation persists after 24h. Single strand break of DNA, decrease in ROS production and cell cycle arrest in G1 accompanied with induction of statistically significant apoptosis are late events occurring at 24, 48 and 72h. Together our findings suggest that FOXO3a is a relevant mediator of the antitumor effects of MSeA. This new evidence on the mechanism of action of MSeA can open new avenues in exploiting the chemopreventive and antitumor properties of selenium and in the optimal design of combined therapies with PI3K/Akt inhibitors.

INTRODUCTION

Cancer is a multifactorial disease that progresses to malignancy in a multistep process that implies the acquisition of several characteristics at genomic, proteomic and metabolomic level (Hanahan and Weinberg, 2000). The trace element selenium (Se) in various chemical forms is widely recognized to possess both essential nutritional and toxic (e.g., teratogenic) activities (Ganther, 1999; Schrauzer, 2009). A major effort has been launched to elucidate the antioxidant and chemopreventive role of Se as a dietary supplement. Se compounds such as Ebselen (Jacob *et al.*, 1998) and methylseleninic acid (MSeA) have also been studied as potential anticancer agents. The nutritional requirement for Se stems from the need of the incorporation of selenocysteine (the 21st essential aminoacid) into various selenoproteins (Stadtman, 2000). Moreover, several selenoenzymes, including thioredoxin reductase (TrxR) and glutathione peroxidase (GPx), may be associated with cancer development and progression by modulating cell proliferation, transformation and migration (Arner and Holmgren, 2000; Ganther, 1999; Mustacich and Powis, 2000).

A number of studies, including several clinical trials, have shown that at supranutritional levels Se compounds (such as MSeA or selenomethionine) or some transformation products inhibit proliferation of cancer cells, induce tumor cell apoptosis, suppress tumor formation and metastasis in animal models and reduce the risk of prostate, lung, breast, and colorectal cancers (the top four death-causing cancers) in humans (Clark *et al.*, 1998; Ganther, 1999; Ip, 1998; Tanaka *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1997)

It has been described that methylselenol precursor is a potent inhibitor of the growth and survival of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and that this antiproliferative effect could be reached through PI3K pathway (Wang *et al.*, 2001). Moreover, it has also been described using prostate cancer cells LNCaP (high basal Akt activity) and DU145 (low basal Akt activity) that Akt play an important role in regulating apoptosis sensitivity of these cells to MSeA (Hu *et al.*, 2005).

Moreover, using a metabolic and isotopomer profiling approach, Fan and collaborators (Fan *et al.*, 2006) reported that several metabolites, including lactate, glutamine, glutamate, other aminoacids and glutathione, are depleted by MSeA treatment at 48h indicating multiple perturbations of the central metabolic networks in A-549 lung cancer cells. These studies showed also that MSeA affects the metabolic profile of A-549 cells by reducing the flux through glycolysis, TCA cycle and PPP. Interestingly, the decreased fluxes by MSeA treatment are those that are increased when PI3K pathway is activated (Robey and Hay, 2009), reinforcing the hypothesis that MSeA must target any of the key steps of this signalling pathway. However, the molecular mechanism of action of MSeA is still not fully elucidated.

In this study, using U2foxRELOC cells stably expressing GFP–FOXO fusion protein, we demonstrated that FOXO3a translocates to the nucleus after 1.5h treatment of cells with 5 μ M of MSeA and remains there until the end of the assay (24h). These findings provide a molecular mechanism to the cytotoxicity, apoptosis, ROS detoxification and cell cycle arrest that we observed in A-549 cells and permit to conclude that FOXO3a is a relevant mediator of MSeA antitumor effects.

Moreover, since it has been described that cisplatin antitumor effects are enhanced when it is combined with FOXO nuclear export inhibitors (Fernandez de Mattos *et al.*, 2008), we hypothesize that combined treatment of MSeA with cisplatin could be a promising new strategy in cancer therapy.

MATERIALS AND METHODS

All products were purchased from Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA), unless otherwise specified.

Chemicals. MSeA was supplied by Dr. Fan (University of Louisville, KY, USA).

Antibiotic (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin), Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS), Trypsin EDTA solution C (0.05% trypsin –0.02% EDTA) were obtained from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemet, Israel). Foetal Calf Serum (FCS) was purchased by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Cell culture. For the performance of the experiments, human lung carcinoma A-549 cells from ATCC were grown in RPMI medium. RPMI-1640 medium (with L-glutamine, without Glucose and Sodium Bicarbonate) was solved in 1000 mL of double processed tissue culture water. 26.7 mL of sodium bicarbonate solution [7.5%w/v] was added for each litre of final volume of medium. The pH was adjusted at 7.2 and 10 mM of D-Glucose was added. The solution was sterilized by 0.22 microns filtration. The medium was supplemented with 10% heat-inactivated FCS and penicillin (50 U/mL) and streptomycin (50 μ g/mL). Cell cultures were carried out at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Cell growth inhibition. The assay was performed by a variation of the method described by Mosmann (Matito *et al.*, 2003; Mosmann, 1983; Ramos-Montoya *et al.*, 2006). Growing concentrations of the product were plated in 96-well-flat-bottomed microtitre plates where 2000 A-549 cells/well had been seeded 24h before. Medium with MSeA exposed to the cells for >24h caused a depletion of MSeA activity, so treatment media was refreshed every 24h. After incubation for 24, 48 or 72 hours, MTT dissolved in PBS at 1 mg/mL and sterile filtered was added to the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL. Following 1 hour of incubation, the

generated formazan was dissolved with 100 μ L of DMSO per well. The absorbance was measured on an ELISA plate reader (Merck ELISA System MIOS version 3.2.) at 550 nm. Concentrations that caused 20 and 50% of inhibition of cell growth (IC₂₀ and IC₅₀, respectively) were calculated.

Cell cycle analysis. In order to determine the proportion of cells in each cell cycle phase (G1, S or G2), cell cycle analysis was assessed by flow cytometry using a fluorescence-activated cell sorter (FACS). Cells were collected by centrifugation after detaching from the flasks using 0.025% trypsin-EDTA (Invitrogen). Then, approximately 500,000 cells were resuspended in 0.5 mL phosphate buffer saline (PBS) followed by the addition of 4.5 mL 70% (v/v) ethanol. The cell suspensions were stored at -20 °C until processing as described (Matito *et al.*, 2003). Briefly, cells were stained in PBS containing 50 mg/mL propidium iodide, 0,2 mg/mL DNase free RNase (Roche diagnostic (Mannheim, Germany)) and 0.1% Triton® X-100. FACS analysis was carried out at 488 nm in an Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). Data of 12,000 cells were collected and analyzed using Multicycle program (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). For this assay, 5×10^4 A-549 cells/well were plated in 6 well plates with 3 mL of medium. After 24 hours, MSeA was added and the cells were incubated for 24, 48 and 72 hours. Both adherent and detached cells were collected for analysis. All experiments were performed three times with three replicates per experiment.

Apoptosis assay. Cells were treated as described in the cell cycle analysis section. After centrifugation, cells were washed in binding buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM sodium chloride, 2.5 mM calcium chloride) and resuspended in the same buffer. Annexin V-FITC was added according to the Annexin V-FITC kit (Bender System MedSystem, Viena, Austria). Following 30 min of incubation at room temperature in darkness, propidium iodide (PI) was added at 20 μ g/mL 1 min before FACS analysis. Experiments were performed in triplicate. 20×10^3 cells were approximately analyzed in each experiment.

Apoptosis was also assessed using bisbenzimidazole Hoechst and analyzed by Fluorescence-Microscope. Cells were cultured in 6-well flat bottomed microtiter plates containing 2 mL of cell suspension. The number of cells was determined by calculation according to the number of cells/wells in 96-well plates (5,000). After 24 h of incubation at 37°C with 5% CO₂, MSeA was added at its ^{72h}IC₅₀ concentration. Following 24 h of incubation in the absence or presence of the indicated drug, cells were harvested by mild trypsinization, collected by centrifugation and fixed with paraformaldehyde at 3.7% for 10 minutes at -20°C. Cells were washed with PBS, Triton-X at 0.5% was added for 5 min at 4°C and cells were stained with 50 ng/mL Hoechst 33258 dye for 15 min and then placed onto slides, coverslips were mounted with Mowiol 4-88. Chromatin condensation was visualized by fluorescence microscopy.

Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE). IC₅₀ of MSeA was prepared and added to the cell cultures. A positive control with hydrogen peroxide 100 µM in PBS was included.

The comet assay was carried out after the 24 hours of treatment with the synthetic compounds. The technique was applied according to (Tice *et al.*, 2000). Briefly, 30 µL of cell suspension (6.25 X 10⁵ cells/mL) were mixed with 140 µL of 1% low-melting-point agarose and 70 µL were spread onto pre-coated microscope slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) (1% of normal-melting-point agarose). Glass cover slips (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) were placed on the gels, which were allowed to set at 4 °C. Then the cover slip was removed and the cells embedded in agarose were lysed for 1 hour by immersion of the slides in 2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Trizma-HCl, pH 10 and 1% Triton® X-100 at 4°C. The slides then were placed on a horizontal gel electrophoresis tank and the DNA was allowed to unwind for 40 min in freshly prepared alkaline electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM Na₂-EDTA, pH > 13). Electrophoresis was carried out in the same buffer for 30 min at 25 V (about 0.8 V/cm across the gels and approximately 300 mA) in an ice bath condition. The slides were rinsed 3 times (5 minutes) with 400 mM Trizma (pH 7.5) to neutralize the excess alkali. Then the slides were washed in water (10 minutes) and with 25 µL of DAPI, covered with a cover slip and coded before microscopic analysis. DAPI stained nuclei were evaluated with a Nikon Eclipse TE 300 fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). A total of 100 comets on each gel were visually scored and classified as belonging to one of five classes according to the tail intensity. Each comet class was given a value between 0 and 4: (0) = undamaged and (4) = maximum damage. Total score was calculated by the following equation: (percentage of cells in class 0 x 0) + (percentage of cells in class 1 x 1) + (percentage of cells in class 2 x 2) + (percentage of cells in class 3 x 3) + (percentage of cells in class 4 x 4). Consequently, the total score was in the range from 0 to 400. Experiments were performed in triplicate.

Protein concentration determination. To determine the protein concentration of extracts obtained from A-549 cells treated with the MSeA, bicinchoninic acid (BCA) assay protein kit (Pierce, Rockford, IL, USA) was used. A BSA (bovine serum albumin) standard curve with dilutions in triplicate from 125 to 2000 µg/mL was performed. Absorbance at 550 nm was measured on an ELISA plate reader (Sunrise Tecan, Barcelona, Spain). Protein concentration was obtained by interpolation from standard curve.

Determination of Intracellular ROS levels. To visualize intracellular ROS levels, proliferating cells were grown on 9 cm² plates to 70% confluence, washed once with warm PBS, and incubated with 5 µM 5,6-chloromethyl-2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCF-DA, Invitrogen) in PBS supplemented with 5.5 mM glucose. After 10 min at 37°C, PBS was replaced with complete culture medium, and cells were trypsinized and

resuspended thoroughly with 1 mL of PBS, aprotinine (1000x), CM-H₂DCF-DA (50 μ M) and propidium iodide (PI, 20 μ g/mL). Intracellular ROS levels were visualized by using an Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA) at 488 nm (Nicke *et al.*, 2005). Data of 12,000 cells were collected and analyzed using Multicycle program (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA).

Generation and maintenance of U2foxRELOC cells. U2OS osteosarcoma cells obtained from the ATCC were cultivated as indicated by the provider. These cells were transfected at confluence with the plasmid containing the GFP–FOXO3a fusion protein (a gift from T. Finkel) (Zanella *et al.*, 2007). Selection was performed with G418 (1 mg/mL, Calbiochem) for one week and the resistant colonies were then cultured selecting those that best expressed the reporter by FACS, as well as the most homogeneous population. The selected clones, designated as U2foxRELOC were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 0.1% antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) antimycoplasm (plasmocin (25 μ g/mL)), and 100 mg/mL of G418.

Compound administration and relocalization assay. The U2fox- RELOC-based assay was formatted in 96-well plates and the workflow was automated. All liquid handling for compound treatment, washing, fixing, and staining steps was performed by a robotic workstation (Rosado *et al.*, 2008). Clonal U2foxRELOC cells were seeded at a density of 1.0×10^5 cells/mL, in black-walled clear-bottomed 96-well microplates (BD Biosciences), in a final volume of 200 μ L/well by using a multidrop automatic dispenser. Cells were allowed to attach for 12 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, and MSeA was then automatically administered (5 μ M) to the assay plates in 2 μ L by using a robotic workstation (Biomek 1000, Beckman) for 1.5, 3, 6, 11 or 24 hours. 10 μ M of LY294002 at 1.5 hours was used as a positive control of FOXO translocation to the nuclei and a Vehicle (PBS) as a negative control of FOXO translocation to the nuclei. Treated cells were then incubated for 1 h, washed twice with PBS and fixed in paraformaldehyde (100 mL, 6%). Fixed cells were washed twice with PBS and stained with DAPI (Invitrogen) for 20 min at RT to define the nucleus. The DAPI solution was removed by aspiration and the plates were washed twice with PBS and stored in the dark at 48°C before analysis.

Relocalization assay readout and data analysis. Assay plates were read on the BD PathwayR 415 Bioimager equipped with a 488/10 nm EGFP excitation filter, a 380/10 nm DAPI excitation filter, a 515 LP nm EGFP emission filter, and a 435 LP nm DAPI emission filter. Images were acquired in the DAPI and GFP channels of each well by using 20Q dry objective. The cells were photographed by using a BD Pathway HT cell-imaging platform.

Data was exported from the BD Pathway Bioimager as text files and imported into the data analysis software BD Image Data Explorer for processing.

Based on this procedure we calculated the percentage of cells per well exhibiting nuclear translocation. Compounds, as MSeA, that induced nuclear accumulation of the fluorescent reporter above 60% of the signal obtained from wells treated with 20 μM LY294002 (a PI3K/Akt inhibitor) were considered as hits.

Data analysis and statistical methods. *In vitro* experiments were carried out using three cultures each time for each treatment and then repeated three times. Statistical analyses were performed using the parametric unpaired, two-tailed independent sample t test with 99.9, 99 and 95 % confidence intervals. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were considered to indicate significant differences between treated and not treated cell lines.

RESULTS

MSeA inhibits human lung carcinoma A-549 cell proliferation.

We examined the effect of MSeA on human lung carcinoma A-549 cell proliferation using the MTT assay. Significant dose-dependent growth inhibition was observed in this cell line after treatment with MSeA for 48h and 72h (Figure. 1).

Concentrations of MSeA required for 20% and 50% growth inhibition after 72h of treatment ($^{72\text{h}}\text{IC}_{20}$ and $^{72\text{h}}\text{IC}_{50}$) were $0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and $1.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$, respectively.

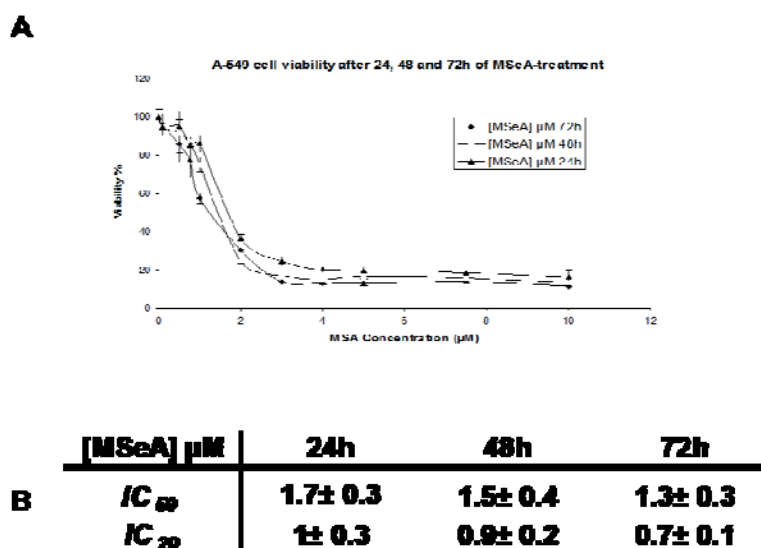


Figure. 1. Growth inhibition of MSeA on A-549 lung cancer cells after 24, 48 and 72h measured by MTT assay. A. Exponentially growing cells were treated with the indicated concentration of MSeA for

24, 48 and 72 h. The assay was carried out using six replicates and repeated three times. Points, mean \pm SD. **B.** IC₂₀ and IC₅₀ values of MSeA on A-549 at different times.

MSeA provokes a G1 arrest and induces apoptosis in A-549 cell line.

A-549 cells treated with MSeA at ^{72h}IC₅₀ concentration showed an increase in the population in G0/G1 phases after 24 h of treatment (27% with ^{72h}IC₅₀) and after 72 h of treatment as compared to control cells (41% with ^{72h}IC₅₀). A concomitant decrease was also observed in the percentage of cells in the S phase after 24 h of treatment (19% with ^{72h}IC₅₀) and after 72 h of treatment with respect to the untreated cells (38% with ^{72h}IC₅₀), suggesting a G0/G1 arrest (Figure 2). A decrease in the percentage of cells in the G2 phase was also observed at ^{72h}IC₅₀ of MSeA at all times.

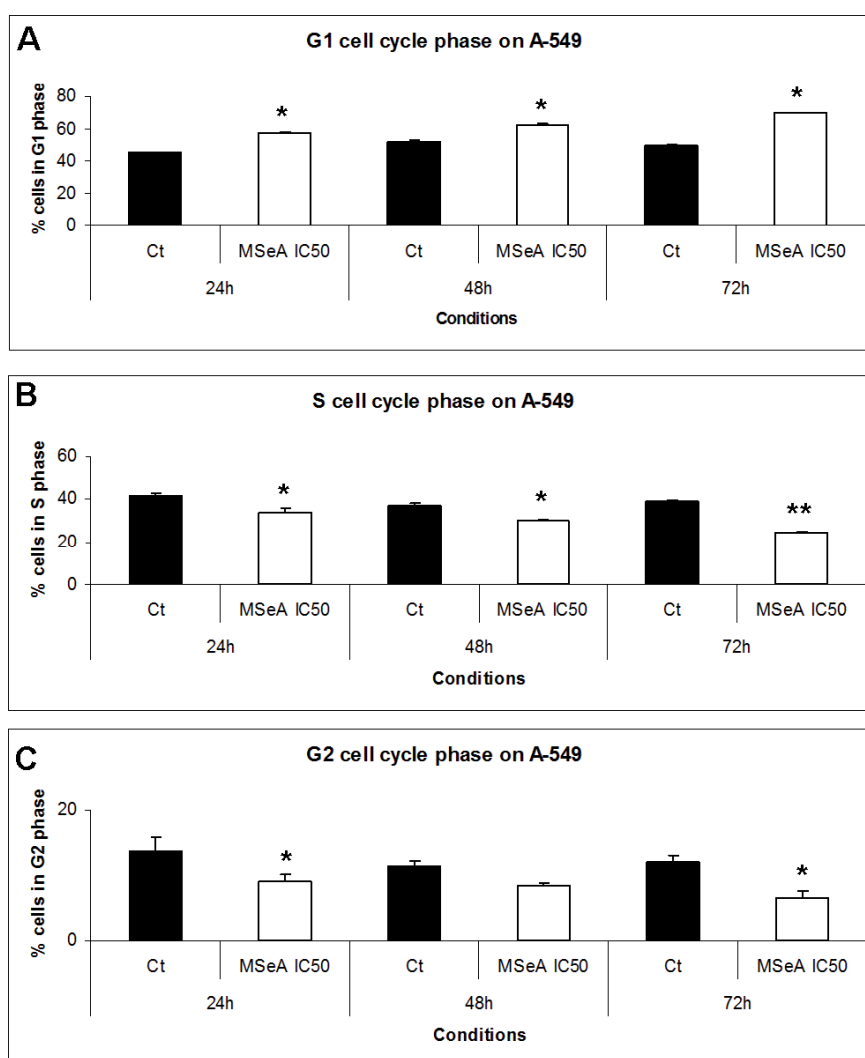


Figure 2. Cell cycle analysis of MSeA treated cells. A-549 cells were treated for 24, 48, 72 hours at 37°C with ^{72h}IC₅₀ concentration. **A.** MSeA effect on G1 phase of A-549 cell cycle. **B.** MSeA effect on S phase of A-549 cell cycle. **C.** MSeA effect on G2 phase of A-549 cell cycle. Cell cycle analysis was

conducted after propidium iodide staining. Values represent mean \pm SD of three independent experiments. Statistical significant differences with $p < 0.05$ (*) or $p < 0.01$ (**) as compared to control cells.

Apoptosis was assessed in A-549 cells after 24, 48 and 72h after treatment with MSeA at the same concentration that for the analysis of cell cycle. FACS analysis using annexin V-FITC staining and PI accumulation was performed to differentiate early apoptotic cells (annexin V⁺ and PI⁻) from late apoptotic/necrotic cells (annexin V⁺ and PI⁺). Results showed that treatment of A-549 cells MSeA (IC₅₀ concentration) produced 4.79 % of apoptotic cells (2.86 % early apoptosis plus 1.93 % late apoptosis) (Figure 3). Altogether, MSeA appears to arrest A-549 cell cycle in G0/G1 phase and causes a slight apoptosis (Figures 2 and 3).

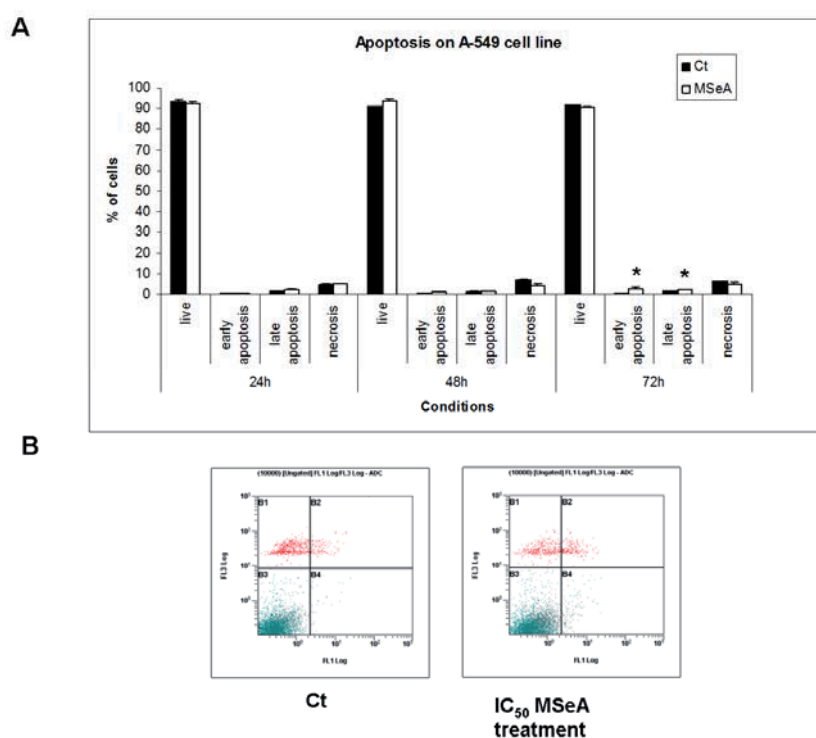


Figure 3. Apoptosis assay. **A.** Flow cytometry analysis of Annexin V-FITC staining and propidium iodide accumulation after exposure of A-549 cells to MSeA (^{72h}IC₅₀ concentration) for 24, 48 and 72 hours. **B.** Cells were incubated with ^{72h}IC₅₀ MSeA during 72h. Early apoptosis (PI⁻/FITC⁺, right bottom quadrant) and late apoptosis (PI⁺/FITC⁺, right upper quadrant). Values are expressed as mean \pm SE of five experiments in duplicate. Statistical significant differences with $p < 0.05$ (*) or $p < 0.01$ (**) as compared to control cells. PI staining at 488 nm is represented on the y axis and annexin V-FITC staining at 488 nm on the x axis.

To check the apoptotic effect of MSeA a Hoescht staining experiment was performed. The results showed apoptotic bodies in A-549 cells when they were treated with $^{72\text{h}}\text{IC}_{50}$ concentration of MSeA during 24h (Figure 4) and single strand break of DNA was observed in COMET assay (Figure 5).

Assessment of Hoechst on A-549 cells was performed after 72 hours of incubation with $^{72\text{h}}\text{IC}_{50}$ MSeA. Results showed that, MSeA induced apoptotic bodies after 72 hours of treatment (Figure 4). Moreover, single strand break of DNA was observed in COMET assay after 24h with $^{72\text{h}}\text{IC}_{50}$ MSeA treatment (Figure 5).

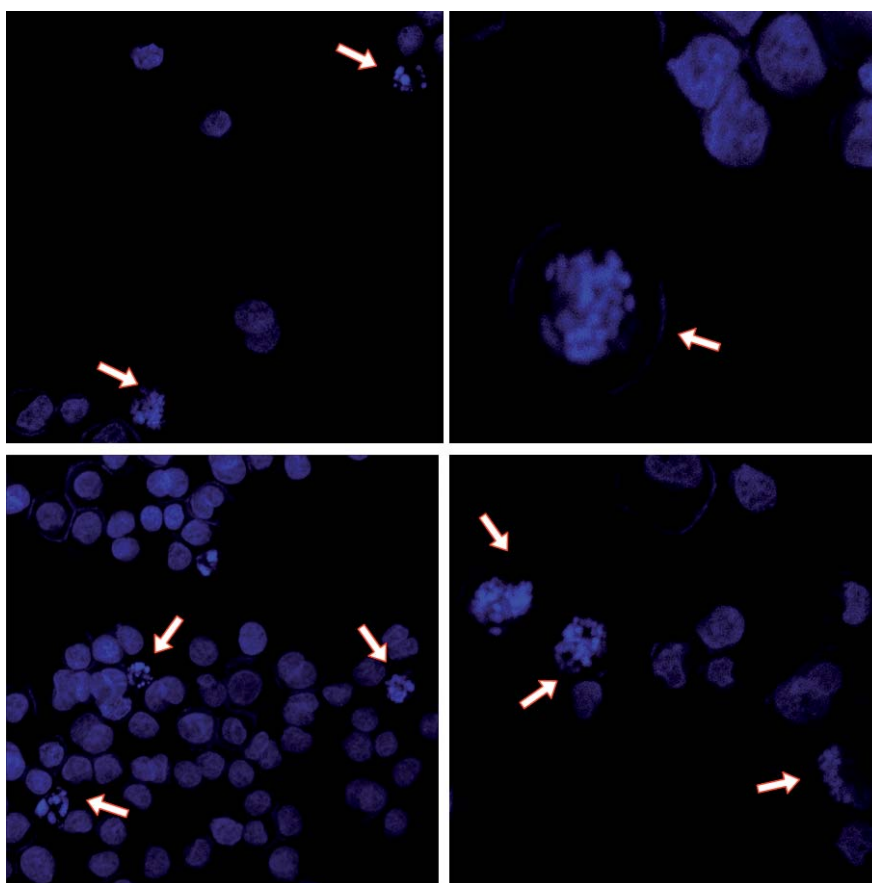


Figure 4. Apoptosis induction in A-549 cells after 72h of MSeA treatment. The arrows indicate the apoptotic bodies of A-549 cells. DAPI stained nuclei were evaluated with a fluorescence microscope (200 and 400X).

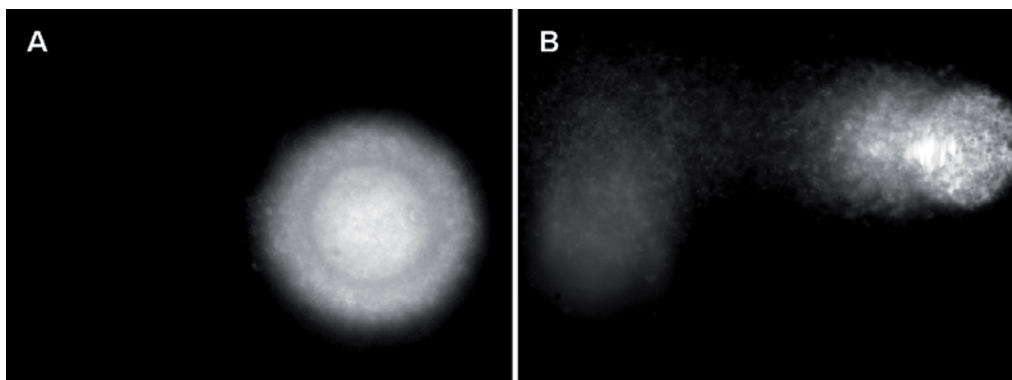


Figure 5. Effect of $^{72h}IC_{50}$ MSeA after 24h on the DNA tail of A-549 cells. **A.** Induction of single strand breaks (SSB) by vehicle. **B.** Induction of single strand breaks (SSB) by $^{72h}IC_{50}$ MSeA. Total Comet score of treated and untreated cells were 199 and 74, respectively.

U2foxRELOC cells respond to MSeA translocating FOXO to the nuclei.

Taking into account the arrest of cell cycle (G1), apoptosis induction, the metabolic effects of MSeA on A-549 cells (Fan *et al.*, 2006) and their correlation with those described for the PI3K inhibition (Robey and Hay, 2009) and the described effects of MSeA on PI3K pathway, we evaluated if MSeA caused the activation and translocation of FOXO transcription factors, which play a key role in cell proliferation and metabolism.

To generate a system suitable to monitor nuclear–cytoplasmic shuttling of FOXO protein in a high-throughput-screening (HTS) format, the research group of Dr. Link in the *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas* (CNIO, Madrid) stably transfected a GFP–FOXO3a reporter plasmid into U2OS cells and prepared cell clones.

U2foxRELOC cells were treated with MSeA. In the untreated cells, the GFP fusion protein was present in both the cytoplasm and nucleus in U2foxRELOC cells, although with significantly more GFP in the cytoplasm than in the nucleus. On the contrary, when these cells were exposed to 10 μ M MSeA for 4 h, almost all the GFP–FOXO3a translocated to the nucleus. Furthermore, when U2OS cells were treated with 5 μ M of MSeA, FOXO transcription factors translocated to the nuclei at 1.5h and this effect was maintained during the time (24h more) (Figure 6). This effect was not very clear neither after only 1h of exposure nor at a lower concentration (1 μ M) after 4h.

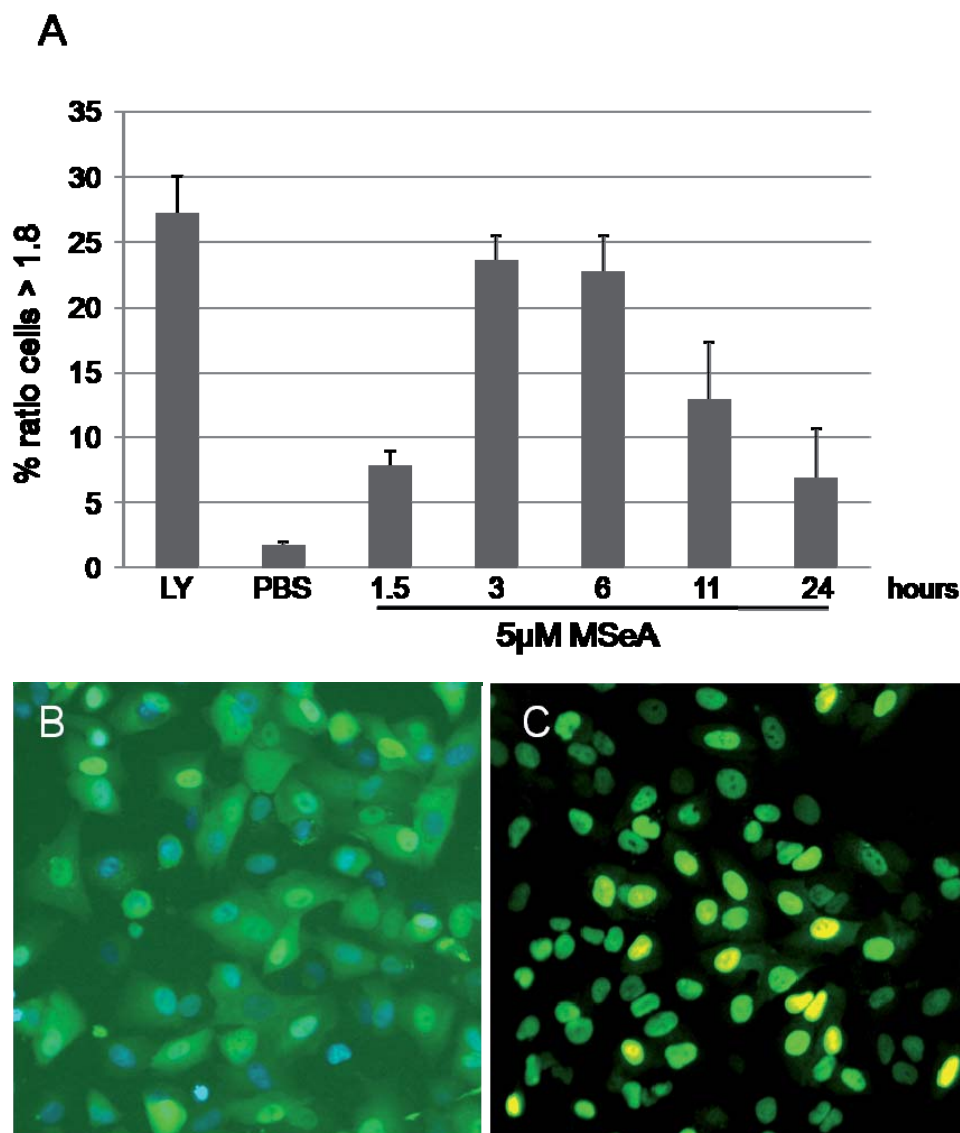


Figure 6. Translocation of GFP–FOXO following MSeA treatment. U2foxRELOC cells stably expressing GFP–FOXO fusion protein were treated with 10µM LY294002 or vehicle (PBS) for 1.5 hours or with 5µM MSeA for 1.5, 3, 6, 11 or 24 hours. **A.** Bar graphs show the percentage of the cells in each well exhibiting nuclear/cytoplasmic (Nuc/Cyt) ratios of fluorescence intensity greater than 1.8. **B. and C.** Representative images of cells taken by using the high-throughput format of the U2foxRELOC system. Images corresponding to fixed and DAPI-stained U2foxRELOC cells exposed to vehicle for 1.5 hours (**B**) or to 5µM MSeA for 3 hours (**C**) are shown.

MSeA causes ROS detoxification.

FOXO proteins have been reported to allow detoxification of reactive oxygen species (ROS) by upregulating free radical scavenging enzymes, including manganese superoxide dismutase (MnSOD) and catalase (Kops *et al.*, 2002; Nemoto and Finkel, 2002; Ramaswamy *et al.*, 2002). FOXO transcription factors control two aspects of cellular resistance to stress: repair

of damages caused by ROS and detoxification of ROS (Greer and Brunet, 2005). Taking into account that MSeA causes FOXO3a translocation to the nucleus, we measured levels of ROS in A-549 cells. The results show that MSeA treatment ($^{72h}IC_{50}$) caused a decrease in the levels of ROS (Figure 7). This decrease was statistically significant after 48h of treatment. This detoxification activity confers to MSeA the capacity to promote cell resistance to stress making it useful as a drug in chemotherapy due to the increased resistance of tumor cells to the toxicity generated as a consequence of chemotherapy (Han *et al.*, 2008).

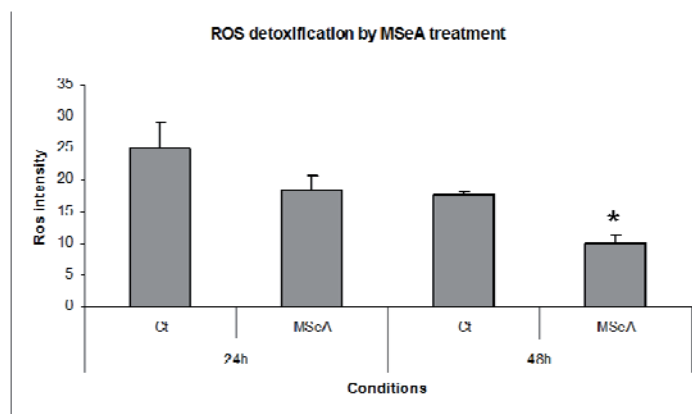


Figure 7. ROS detoxification by MSeA treatment. Treatment for 24 and 48h with the $^{72h}IC_{50}$ MSeA decreases ROS levels in A-549 cells. This decrease was only significant at 48h (* $p < 0.05$) concluding that one of the possible molecular mechanism of action could be the translocation of FOXO to the nuclei and its effect on ROS concentration.

DISCUSSION

Of all the human cancer intervention studies that have been completed to date, the selenium trial is by far one of the most successful (Micke *et al.*, 2009). Newly-published prospective studies on esophageal, gastric and lung cancer have reinforced the evidence of antitumor effects of MSeA, which is particularly strong for prostate cancer. Interventions with MSeA have shown benefit in reducing the risk of cancer incidence and mortality in all cancers combined, and specifically in liver, prostate, colorectal and lung cancers (Rayman, 2005).

It has been also described that tumor cells respond differently to selenium intervention with respect to molecular pathways such as modulation of the cell cycle and apoptotic process. Concretely, recent studies showed that MCF10AT1 and MCF10AT3B premalignant human breast cells after exposure to MSeA exhibited a dose- and time-dependent growth-inhibitory effect as well as apoptosis and cell cycle arrest (Dong *et al.*, 2002). Moreover, different prostate carcinoma cell lines respond distinctively to MSeA treatment (Hu *et al.*, 2005) depending on their basal PI3K/Akt activity and HUVEC cells suffer a potent inhibitory proliferation activity

from MSeA treatment that seems to be related with PI3K or components of this cell signaling pathway (Wang *et al.*, 2001). Taking all these evidence into account, it has been demonstrated that Akt plays an important role in MSeA antitumor effect and the different activation of PI3K signaling pathway in several cell lines determine the sensibility of MSeA to induce its antitumor effect.

The fact that MSeA molecular mechanism underlying its antitumor properties has not been fully elucidated until the present is a bottle neck in designing combined therapies with MSeA. In this study, we have described that lung carcinoma A-549 cells are very sensitive to MSeA treatment arresting cell cycle in G1 phase of cell cycle, decreasing intracellular ROS concentrations and undergoing apoptosis which is in accordance to the success of clinical trials with MSeA on lung cancer patients (Rayman, 2005). However, some studies have described MSeA as a prooxidant product at higher doses than that used in this present study (Fan *et al.*, 2006). This feature could be due to a dual action: at low concentrations MSeA could act as an antioxidant product, while at higher concentration it could act as a prooxidant compound (Lambert *et al.*, 2007). The essential trace element selenium can exert its antioxidant function mainly in the form of selenocysteine residues as an integral constituent of ROS-detoxifying selenoenzymes such as glutathione peroxidases (GPx), thioredoxin reductases (TrxR) and possibly selenoprotein P (SeP) (Steinbrenner and Sies, 2009).

We also showed that MSeA induces FOXO translocation to the nucleus at 1.5h at 5 μ M and this localization is maintained during the time (until 24h). This mechanism of action of MSeA could explain the rapid sensibility of A-549 cells to MSeA treatment. Moreover, we demonstrated that FOXO translocation at 1.5h is the early event that could cause the described molecular and metabolic effects of MSeA. Thus, we showed that PI3K molecular pathway, and more concretely FOXO3a translocation could be the molecular mechanism underlying inhibition of cell proliferation, disruption of tumor cell metabolic adaptations, induction of apoptosis, ROS detoxification and cell cycle arrest reported in A-549 cell line.

The identification of this new mechanism of action of MSeA could open new avenues to the design of new combined therapies. Concretely, in recent studies it has been proposed that one way to enhance cytotoxicity of cisplatin in sensitive cells and to overcome drug resistance in unresponsive cells is to target the PI3K/Akt/FOXO pathway with specific inhibitors in combination to cisplatin. In this sense, MSeA could be a successful candidate for this contribution because it translocates FOXO3a to the nucleus at 1.5h and this translocation remains until 24h which is the final point time of our experiments (Fernandez de Mattos *et al.*, 2008).

In summary, our data support a potent antiproliferative action of MSeA in micromolar range on A-549 cells, targeting a mechanism controlling G1 progression of the tumor cell cycle and provoking apoptosis. The targets of MSeA treatment are FOXO transcription factors, which detoxify and inhibit tumor cells and provoke a metabolic profile that is opposite with that associated to PI3K activation. In conclusion, these data suggest that the FOXO transcription factors translocation is an early event that could also act a molecular and metabolic level and could be used as a new pharmacological or therapeutic strategy to attack cancer cells and to combine with cisplatin to increase its effects in antitumor treatments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants SAF2008- 490 00164 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and ISCIII-RTICC (RD06/0020/0046) from the Spanish government, from the European Union FEDER funds and from the European Commission (FP7) Etherpaths KBBE-grant agreement no.222639. It has also received financial support from the Government of Catalonia (2005SGR00204). One of us (M. Z.) acknowledges the Generalitat de Catalunya for the predoctoral fellowship.

BIBLIOGRAPHY

- Arner, E.S., and Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 6102-6109.
- Clark, L.C., Dalkin, B., Krongrad, A., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Witherington, R., Herlong, J.H., Janosko, E., Carpenter, D., *et al.* (1998). Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *British journal of urology* **81**, 730-734.
- Dong, Y., Ganther, H.E., Stewart, C., and Ip, C. (2002). Identification of molecular targets associated with selenium-induced growth inhibition in human breast cells using cDNA microarrays. *Cancer Res* **62**, 708-714.
- Fan, T.W., Higashi, R.M., and Lane, A.N. (2006). Integrating metabolomics and transcriptomics for probing SE anticancer mechanisms. *Drug Metab Rev* **38**, 707-732.
- Fernandez de Mattos, S., Villalonga, P., Clardy, J., and Lam, E.W. (2008). FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* **7**, 3237-3246.
- Ganther, H.E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**, 1657-1666.
- Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**, 7410-7425.
- Han, Z.B., Ren, H., Zhao, H., Chi, Y., Chen, K., Zhou, B., Liu, Y.J., Zhang, L., Xu, B., Liu, B., *et al.* (2008). Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF). *Carcinogenesis* **29**, 1853-1861.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hu, H., Jiang, C., Li, G., and Lu, J. (2005). PKB/AKT and ERK regulation of caspase-mediated apoptosis by methylseleninic acid in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **26**, 1374-1381.
- Ip, C. (1998). Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention. *JNutr* **128**, 1845-1854.
- Jacob, C., Maret, W., and Vallee, B.L. (1998). Ebselen, a selenium-containing redox drug, releases zinc from metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 569-573.
- Kops, G.J., Medema, R.H., Glassford, J., Essers, M.A., Dijkers, P.F., Coffey, P.J., Lam, E.W., and Burgering, B.M. (2002). Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol* **22**, 2025-2036.
- Lambert, J.D., Sang, S., and Yang, C.S. (2007). Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem Res Toxicol* **20**, 583-585.
- Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J.J., Torres, J.L., and Cascante, M. (2003). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur J Nutr* **42**, 43-49.
- Micke, O., Schomburg, L., Buentzel, J., Kisters, K., and Muecke, R. (2009). Selenium in oncology: from chemistry to clinics. *Molecules* **14**, 3975-3988.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Mustacich, D., and Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. *Biochem J* **346 Pt 1**, 1-8.
- Nemoto, S., and Finkel, T. (2002). Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* **295**, 2450-2452.
- Nicke, B., Bastien, J., Khanna, S.J., Warne, P.H., Cowling, V., Cook, S.J., Peters, G., Delpuech, O., Schulze, A., Berns, K., *et al.* (2005). Involvement of MINK, a Ste20 family kinase, in Ras oncogene-induced growth arrest in human ovarian surface epithelial cells. *Molecular cell* **20**, 673-685.
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L., and Sellers, W.R. (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* **2**, 81-91.
- Ramos-Montoya, A., Lee, W.-N.P., Bassilian, S., Lim, S., Trebukhina, R.V., Kazhyna, M.V., Ciudad, C.J., Noé, V., Centelles, J.J., and Cascante, M. (2006). Pentose phosphate cycle oxidative and non-oxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* **119**, 2733-2741.
- Rayman, M.P. (2005). Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc* **64**, 527-542.
- Robey, R.B., and Hay, N. (2009). Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* **19**, 25-31.
- Rosado, A., Zanella, F., Garcia, B., Carnero, A., and Link, W. (2008). A dual-color fluorescence-based platform to identify selective inhibitors of Akt signaling. *PLoS one* **3**, e1823.
- Schrauzer, G.N. (2009). Selenium and selenium-antagonistic elements in nutritional cancer prevention. *Crit Rev Biotechnol* **29**, 10-17.
- Stadtman, T.C. (2000). Selenium biochemistry. Mammalian selenoenzymes. *Ann N Y Acad Sci* **899**, 399-402.

- Steinbrenner, H., and Sies, H. (2009). Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1478-1485.
- Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Kagami, S., and El-Bayoumy, K. (2000). Suppressing effects of dietary supplementation of the organoselenium 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and the Citrus antioxidant auroaptene on lung metastasis of melanoma cells in mice. *Cancer Res* **60**, 3713-3716.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., and Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* **35**, 206-221.
- Wang, Z., Jiang, C., Ganther, H., and Lu, J. (2001). Antimitogenic and proapoptotic activities of methylseleninic acid in vascular endothelial cells and associated effects on PI3K-AKT, ERK, JNK and p38 MAPK signaling. *Cancer Res* **61**, 7171-7178.
- Yan, L., Yee, J.A., Li, D., McGuire, M.H., and Thompson, L.U. (1998). Dietary flaxseed supplementation and experimental metastasis of melanoma cells in mice. *Cancer letters* **124**, 181-186.
- Yan, L., Yee, J.A., McGuire, M.H., and Graef, G.L. (1997). Effect of dietary supplementation of soybeans on experimental metastasis of melanoma cells in mice. *Nutrition and cancer* **29**, 1-6.
- Zanella, F., Rosado, A., Blanco, F., Henderson, B.R., Carnero, A., and Link, W. (2007). An HTS approach to screen for antagonists of the nuclear export machinery using high content cell-based assays. *Assay and drug development technologies* **5**, 333-341.

Capítol 5

Perfil metabòlic associat a la mutació V12 del gen *HRas* en fibroblasts de ratolí

Miriam Zanuy¹, Pedro de Atauri¹, Adrián Benito¹, Piero Crespo², Silvia Marin¹ and Marta Cascante^{1*}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology, Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

² Biomedicine and Biotechnology Institut of Cantabria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas - IDICAN – University of Cantabria, Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine, Santander, 39011 Cantabria, Spain

RESUM

Les diferents isoformes i la posició de mutacions puntuals en aquestes isoformes del gen *Ras* apareixen associades a fenotips diferents en els tumors humans. Les diferents isoformes de la proteïna Ras (H, N i K) sovint estan mutades en el càncer humà conferint un fenotip diferent i distintiu. Estudis anteriors (Vizan *et al.*, 2005) han descrit especificitat fenotípica a nivell metabòlic pels diferents transfectants *KRas* plantejant la qüestió de si les adaptacions metabòliques d'altres mutacions que afecten al gen *Ras* també depenen de cada isoforma. En aquest treball s'ha estudiat el perfil metabòlic de fibroblast de ratolí NIH-*HRas*-V12 per tal de trobar l'adaptació metabòlica associada a aquesta mutació, altament present en línies de cèl·lules tumorals de bufeta, en melanomes o en glioblastomes entre d'altres i que confereix un fenotip menys transformat que la mutació en *KRas*. Per aquest propòsit s'han incubat les cèl·lules amb el traçador [1,2-¹³C₂]-D-glucosa per tal de revelar la contribució relativa de les rutes implicades en el metabolisme del carboni. El canvi de patró en la distribució de ¹³C en determinats metabòlits proporciona informació simultània sobre la redistribució del flux de carboni a través de la via de les pentoses fosfat, la glicòlisi, el cicle dels àcids tricarboxílics i la síntesi d'àcids grassos. Els resultats obtinguts mostren que la transformació del fenotip de la mutació V12 en *HRas* correlaciona amb adaptacions metabòliques específiques que afecten a la via de les pentoses fosfat, l'activitat específica piruvat cinasa i el bescanvi de glutamat.

Chapter 5

Metabolic profile associated to the V12 *HRas* mutation in mouse fibroblasts

Miriam Zanuy¹, Pedro de Atauri¹, Adrián Benito¹, Piero Crespo², Silvia Marin¹ and Marta Cascante^{1*}.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology, Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

² Biomedicine and Biotechnology Institut of Cantabria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas - IDICAN – University of Cantabria, Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine, Santander, 39011 Cantabria, Spain.

[‡]**Correspondence address:** Marta Cascante, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology (Edifici Nou), Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Phone: 0034 934021593; Fax: 0034 934021559; E-mail: martacascante@ub.edu

RUNNING TITLE

HRas mutation-induced metabolic phenotype

KEYWORDS

Gas chromatography coupled to mass spectrometry

Glycolysis

KRas and *HRas*

Metabolic adaptation

Metabolic Fluxes

Mass Isotope Distribution Analysis (MIDA)

Metabolic profile

Pentose phosphate pathway

Specific codon mutation

TCA cycle

ABBREVIATIONS

GC/MS: Gas chromatography coupled to mass spectrometry

HRas-V12: NIH/3T3 human fibroblast with *HRas* codon 12 point mutation

MIDA: Mass Isotopomer Distribution Analysis

NIH/3T3: NIH/3T3 mouse fibroblast cell line

Ox/nonox: Oxidative non-oxidative ratio

PC: Pyruvate carboxylase

PDH: Pyruvate dehydrogenase

PPP: Pentose phosphate pathway

TCA: cycle Tricarboxylic acid

ABSTRACT

The different isoforms and the position of point mutations in the *Ras* gene appear associated with different phenotypes in human tumors. Ras protein has a lot of isoforms (H, N and K) and they are frequently mutated in human cancer conferring a different and distinctive phenotype. The previously reported (Vizan *et al.*, 2005) metabolic specificity shown by different *KRas* transfectants raises the question whether the metabolic adaptations of other mutations affecting the *Ras* gene are also specific for each isoform. In this study the metabolic profile of NIH-HRas-V12 mouse fibroblasts has been studied in order to find metabolic adaptation associated to this mutation, which is highly prevalent in different tumor cell lines as glioblastomas, melanomas and bladder cancers, and is a mutation that confers a less transforming phenotype than *KRas* mutation. [1,2-¹³C₂]-D-glucose is used as a tracer that can reveal the relative contributions of the major routes involved in the carbon metabolism. The change of pattern in the distribution of ¹³C in specific metabolic products provides simultaneous information on the redistribution of the carbon flux through pentose phosphate pathway, glycolysis, tricarboxylic acid cycle and fatty acid synthesis. The results shows that *HRas* mutation G12V correlates with specific metabolic adaptations that affect the pentose phosphate pathway, pyruvate dehydrogenase flux, pyruvate kinase activity and the exchange of glutamate.

INTRODUCTION

The Ras family of small GTPases - HRas, NRas and the two KRas isoforms, KRas4A and KRas4B - are some of the most studied proteins involved in signal transduction. They have a central role in mediating mitogenic signalling and, when mutated, in human cancer. Mutational activation of Ras proteins occurs in nearly 30% of human tumors (Urosevic *et al.*, 2009). Ras proteins predominantly localized on the inner leaflet of the plasma membrane and are switched on when a wide range of cell surface receptors become activated. Active Ras operates as an adaptor protein, recruiting effectors to membranes, where they can interact with other proteins and lipids to generate intracellular signals. Ras proteins are inactive when bound to GDP and become activated when a guanine nucleotide exchange factor (GEF) stimulates GDP dissociation, allowing rapid replacement by the more abundant GTP. Allosteric changes caused by GTP binding increases the affinity of Ras proteins for other effectors. This high interactivity between these proteins is reversed by the GTP hydrolysis stimulated by GTPase activating proteins (GAPs). *Ras* mutations interfere with the ability of GAPs to interact with Ras, producing constitutively active Ras proteins. Ras activation promotes cell proliferation, differentiation and survival amongst many other cell regulatory functions. Growth factor receptors are involved in the activation of Ras proteins (reviewed in (Malumbres and Barbacid, 2003)). Downstream, among the activated pathways, Raf/Mek/Erk, PI3K/PTEN/Akt, and RalGEF/Ral pathways have been the best characterized (Drosten *et al.*, 2010).

Ras isoforms might play a role in specifying distinct signalling outputs. A significant area of Ras research has been engaged trying to understand the mechanistic basis for these differences. H, K and NRas are ubiquitously expressed and possess almost complete sequence homology. Nevertheless, several evidences suggest isoform-specific signalling (Omerovic *et al.*, 2007). Thus, *KRas* mutation is highly prevalent in a broad spectrum of tumors; 50% of colon cancers and 90% of pancreatic cancers have mutated *KRas*, while *HRas* mutation is highly present in glioblastomas, melanomas, bladder tumors and Costello Syndrome showing a less transforming phenotype. Moreover, the molecular phenotype of each *Ras* mutation is specific for each isoform and point mutation. Thus, *KRas* mutation showed increased resistance of apoptosis, whereas K13 mutation is vulnerable to apoptosis (Vizan 2005). *HRas* is a more potent activator of PI3K, whereas *KRas* is a more potent Raf and Rac activator (Walsh and Bar-Sagi, 2001; Yan *et al.*, 1998). In this way, activation of each Ras isoform can be associated with distinct biochemical profiles, which may favour the selective activation of different Ras isoforms in human tumors. In some cases, activation of *HRas* may be favored in tumor cells that have already increased MAPK activity but present low levels of PI3K activity. On the other hand, in tumor cells with constitutively elevated PI3K activity, activation of *KRas* may be favored because it will result in coincident robust activation of the Raf/MAPK pathway. Studies

of human colorectal tumors enforce this hypothesis (Yan *et al.*, 1998). Interestingly, KRas proteins were more efficient to drive cell proliferation, transformed phenotype, and immortalization than HRas or NRas (Keller *et al.*, 2007), which indicates a less transformant phenotype of HRas.

Increasing evidences suggest that oncogenes may directly affect cell metabolism. The metabolic changes caused by oncogenes might confer a common advantage to many different types of cancers, allowing cells to survive and invade (Dang and Samenza, 1999). Ectopic expression of oncogenic Ras in immortalized cells has been found to: (i) increase glucose uptake and lactate production; (ii) increase ribose-5-phosphate, a glucose-derived anabolic precursor of DNA and RNA; and (iii) increase sensitivity to glycolytic inhibitors (Kole *et al.*, 1991; Racker *et al.*, 1985; Ramanathan *et al.*, 2005). But the precise downstream metabolic effects of Ras signalling have not been well established (Telang *et al.*, 2007). In our laboratory, previously we showed how different mutations in the same isoform – KRas – cause distinctive metabolic adaptations (Vizan *et al.*, 2005). In this work we elucidate the distinctive metabolic profile associated with the point mutation V12 in HRas. [1,2-¹³C₂]-glucose tracer labeling in combination with mass spectrometry (MS) is applied to evaluate the different distribution of metabolic fluxes through the main metabolic pathways. We observed a robust metabolic adaptation of the NIH-HRas-V12 cell line that affects mainly at pentose phosphate and glutamate/glutamine exchange levels. This study is complementary to the study of cell signalling and phenotype of HRas-V12 mutants, and it should help to develop new strategies to combat the specific metabolic adaptation that confers this mutation.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA), unless otherwise specified. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and antibiotic (10,000 U · mL⁻¹ penicillin, 10,000 µg · mL⁻¹ streptomycin) were obtained from Gibco-BRL (Eggenstein, Germany), Donor Bovine Serum, Geneticin© Selective Antibiotic and trypsin-EDTA solution C (0.05% trypsin-0.02% EDTA) from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). Sodium pyruvate was purchased from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemet, Israel). Stable [1,2-¹³C₂]-D-glucose isotope was obtained with >99% purity and 99% isotope enrichment for each position from Isotec Inc. (Miamisburg, OH).

Cell lines and culture conditions. The NIH/3T3 human fibroblast transfectants were used wild type and a containing a somatic (G:C→A:T) mutation at the first position of codon 12 in *HRas* (specifically, the mutation replaces the amino acid glycine with the amino acid valine at position 12 (Gly12Val or G12V)). Both lines were grown as a monolayer culture in minimum

essential medium (DMEM with L-glutamine -4mM-, without glucose and without sodium pyruvate) in the presence of 10% Donor Bovine Serum, 10 mM of D-glucose, 110 mg · ml⁻¹ Sodium pyruvate and 1% streptomycin/penicillin. Geneticin© Selective Antibiotic (final concentration: 750 µg · mL⁻¹) was used as a selective antibiotic in HRasV12 cells. Cell cultures were carried at 37 °C in 95% air, 5% CO₂ humidified environment.

Wild type NIH-3T3 fibroblast cultures were started with $3.5 \cdot 10^5$ cells and HRas-V12 cultures with $4 \cdot 10^5$ cells, achieved by using standard cell counting techniques. 24 h after seeding, cell medium was removed and fresh supplemented medium with [1,2-¹³C₂]-D-glucose (50% isotope enrichment). The cells were harvested 72 h after treatment. At the end of the incubations, cells were centrifuged (1,500 rpm, 5 minutes) and incubation medium and cell pellets were obtained.

Proliferation rate of the two cell lines is calculated as $\text{Ln}(\text{final number of cells} \cdot \text{initial number of cells}^{-1} \cdot \text{hour}^{-1})$.

Glucose, lactate, glutamate and glutamine consumption or production. From culture medium, glucose, glutamine, glutamate and lactate concentration were determined spectrophotometrically as previously described (Gutmann and Wahlefeld, 1974; Kunst *et al.*, 1984). Glucose, glutamate and glutamine concentrations were measured using a Cobas Mira Plus chemistry analyzer (HORIBA ABX, Montpellier, France), whereas lactate concentration was measured on an ELISA plate reader (Tecan Sunrise MR20-301, TECAN). All the concentrations were measured at the beginning and at the end of incubation time. Glucose and lactate concentrations were expressed as $\mu\text{mol} \cdot 10^6 \text{cells}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

Glutamate production was expressed as $\text{glutamate produced} \cdot 10^3 \text{cells}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Glutamine consumption was measured taking into account the glutamine degradation during the time and expressed as $\mu\text{mol glutamine consumption} \cdot 10^3 \text{cells}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

All these measurements were estimated in both cell lines after 48h at 75% of cell confluence.

Lactate isotopomeric analysis. To measure the isotopomer lactate distribution by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), this metabolite was extracted from the cell culture medium with ethyl acetate after acidification with chlorhydric acid, and derivatized to its propylamideheptafluorobutyric form. The m/z 328 (carbons 1–3 of lactate, chemical ionization) was monitored for the detection of m0 (corrected unlabeled species), m1 (lactate with one ¹³C atom), and m2 (lactate with two ¹³C atoms). Distribution of isotopomers of the formed lactate will be corrected using biochemical analysis. Lactate enrichment was calculated as $\Sigma m_n = m_1 + m_2 \cdot 2$. Glycolytic rate was calculated as $m_{2 \text{ lactate}} / (m_{2 \text{ glucose}} / 2)$.

RNA Ribose isotopomeric analysis. RNA ribose was isolated by acid hydrolysis of cellular RNA after Trizol (Invitrogen) purification of cell extracts. Ribose isolated from RNA was derivatized to its aldonitrile acetate form using hydroxylamine in pyridine and acetic anhydride. The ion cluster around the m/z 256 (carbons 1–5 of ribose, Chemical Ionization) was monitored (Lee *et al.*, 1998) to find the molar enrichment and positional distribution of ^{13}C labels in ribose. The oxidative *versus* non-oxidative ratio was measured as $\text{ox}/\text{nonox}=(m_1+m_3)/(m_2+m_3+2 \cdot m_4)$, since m_1 and m_3 need the oxidative branch of the PPP to be formed, whereas m_2 , m_3 and m_4 species require the non-oxidative branch (twice in m_4). Ribose enrichment was calculated as $\Sigma mn=m_1+m_2 \cdot 2+m_3 \cdot 3+m_4 \cdot 4+m_5 \cdot 5$.

Glutamate isotopomeric analysis. Glutamate was separated from the cell medium using ion-exchange chromatography as described elsewhere (Boren *et al.*, 2003). Glutamate was converted to its *n*-trifluoroacetyl-*n*-butyl derivative and the ion clusters m/z 198 (carbons 2–5, $\text{C}_2\text{-C}_5$, of glutamate, electron impact ionization, EI) and m/z 152 (carbons 2-4 of glutamate, electron impact ionization, EI) were monitored. Isotopomeric analysis of $\text{C}_2\text{-C}_5$ and $\text{C}_2\text{-C}_4$ fragments of glutamate was performed in order to estimate the relative contributions of pyruvate carboxylase (PC) and pyruvate dehydrogenase (PDH) to the TCA cycle (Boros *et al.*, 2002). Glutamate enrichment was calculated as $\Sigma mn=m_1+m_2 \cdot 2+m_3 \cdot 3+m_4 \cdot 4$ from $\text{C}_2\text{-C}_5$ glutamate fragment and PC+PDH contribution as m_2 from $\text{C}_2\text{-C}_5$ fragment.

Fatty acid analysis. Fatty acids were extracted by saponification of the Trizol cell extract after removal of the RNA-containing supernatant. Finally, extraction was performed using petroleum ether. Fatty acids were converted to their methylated derivative using 0.5 N methanolic HCl. Palmitate (C_{16}) was monitored at m/z 270 and stearate (C_{18}) at m/z 298. The enrichment of acetyl units in cells was determined using the mass isotopomer distribution analysis approach of different isotopomers of palmitate (Lee, 1996). The fraction of *de novo* fatty acids in comparison with total fatty acids was calculated with the formula $m_2/(8q \cdot (1-q) \cdot 7)$. Acetyl-CoA enrichment was calculated from $m_4/m_2=(n-1)/(2 \cdot (p/q))$, where n is the number of acetyl units, p the labeled fraction and q the unlabeled fraction ($p+q = 1$). The percentage of contribution is defined as the derived percentage of fatty acids from glucose and was calculated using the formula “ $q/\text{theoretical enrichment}$ ” (0.25 in this case).

Gas chromatography/mass spectrometry. Mass spectral data were obtained on a GCMS-QP2010 selective detector connected to a GC-2010 gas chromatograph from Shimadzu. The settings were as follows: GC inlet 250 °C (200 °C for lactate measurement), transfer line 280 °C, MS Quad 150°C. A DB-5MS capillary column (30 m length, 250 μm diameter and 0.25 μm film thickness) and BPX-70 capillary column were used for the analysis of ribose, glutamate, lactate and fatty acids.

Preparation of cell extracts for enzyme activity studies. Cell cultures were washed with PBS and detached (scrapped) from the flasks using lysis buffer (1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 0.02% Triton X-100, 0.02% sodium deoxycholate, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% sodium azide and 20 mM Tris-HCl, pH 7.5). Cells were homogenized using a laboratory sonicator (1/2 Liter Branson 200 Ultrasonic bath, 5 min, 40 kHz, 4 °C) and ultracentrifuged at 105000×g for 1 hour at 4°C. The supernatant was separated and used for the determination of enzyme activities using a Cobas Mira Plus chemistry analyzer (HORIBA ABX, Montpellier, France).

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49.) activity was measured as described (Tian *et al.*, 1998). Briefly, samples were added to a cuvette containing 0.5 mM NADP⁺ and 50 mM Tris-HCl, pH 7.6 at 37 °C. Reactions were initiated by the addition of glucose-6-phosphate (G6P) to a final concentration of 2 mM. The reduction of NADP⁺, which is directly proportional to G6PDH activity, was followed by the increase in absorbance at 340 nm. G6PDH specific activity was expressed as mU · mg protein⁻¹.

Hexokinase (HK, EC 2.7.1.1) activity was determined by a modification of the method described by (Grossbard and Schimke, 1966; Grossbard *et al.*, 1966). HK reaction was coupled to the release of NADPH by G6PDH after glucose activation by HK. Briefly, samples were added to a cuvette containing 2.96 mM NADP⁺, 14.8 mM ATP, 14.8 mM MgCl₂, 2.88 U/mL G6PDH and 50 mM Tris-HCl, pH 7.6 at 37 °C. Reactions were initiated by the addition of glucose to a final concentration of 10 mM. Absorbance changes were recorded at 340 nm due to NADPH formation. HK specific activity was expressed as mU · mg protein⁻¹.

Transketolase (TKT, EC 2.2.1.1.) activity was determined using the enzyme linked method described by Smeets and colleagues (Smeets *et al.*, 1971). Briefly, samples were added to a cuvette containing 5 mM MgCl₂, 0.2 U/ml triose phosphate isomerase, 0.2 mM NADH, 0.1 mM thiamine pyrophosphate (TPP) and 50 mM Tris-HCl, pH 7.6 at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of 300 µL substrate mixture (see below) per 1 mL of cuvette volume. The oxidation of NADH, which is directly proportional to TKT activity, was followed by the decrease in absorbance at 340 nm. The substrate mixture was prepared by dissolving 50 mM ribose-5-phosphate in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, and adding 0.05 IU ribulose-5-phosphate-3-epimerase and 0.25 IU phosphoriboisomerase. The substrate mixture was continuously stirred and heated for 1 hour at 37°C and then kept at -20 °C until use. The oxidation of NADH, which in this method is directly proportional to the TKT activity, was expressed as mU · mg protein⁻¹. (TKT specific activity).

Pyruvate kinase (PK, EC 2.7.1.40) activity was determined using a coupled reaction with the consumption of NADH by lactate dehydrogenase after pyruvate formation from

phosphoenolpyruvate (PEP) by PK. Briefly, samples were added to a cuvette containing 0.8 mM NADH, 1.6 mM ADP, 12.16 mM MgCl₂, 36.8 mM KCl, 5.28 mU/mL lactate dehydrogenase and 20 mM phosphate buffer, pH 7.2 at 37°C. Reactions were initiated by the addition of 3.52 mM of PEP. The changes in absorbance due to NADH decrease were recorded at 340 nm. PK specific activity was expressed as mU · mg protein⁻¹.

Lactate Dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) activity was measured as described (Bergmeyer, 1985) by the decrease of absorbance at 340 nm, which is directly proportional to NADH consumption. Briefly, samples were added to a cuvette containing 0.155 mg/mL of NADH and 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. Reaction was initiated by the addition of 0.24 mM pyruvate at 37 °C. LDH specific activity was expressed as mU · mg protein⁻¹.

Determination of protein concentration. Protein concentration of cell extracts was determined using the BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) to calculate the specific activity of the enzymes.

MgCl₂ was obtained from Panreac Quimica S.A. (Barcelona, Spain); Tris buffer salt was obtained from ICN Pharmaceuticals Inc. (Costa Mesa, CA).

Gel electrophoresis and immunoblotting. Cells were lysed in a buffer containing 2% SDS, 67 mM Tris-HCl pH 6.8 and 10 mM EDTA and sonicated twice for 10 s (4 °C). Protein content was measured according to the Lowry procedure. The extracts were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gel (Comin-Anduix *et al.*, 2002; Laemmli, 1970). Proteins were transferred to Immobilon-P strips and incubated in 5% BSA for 1 h at RT. Then strips were blotted with anti-G6PDH from goat (sc-46968) or anti-actin (60100) for 1 h at RT and incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 1 h at RT. After incubation the reaction was visualized using ECL (Amersham).

Data analysis and statistical methods. *In vitro* experiments were carried out using three cultures each time for each treatment and then repeated twice. Mass spectral analyses were carried out by three independent automatic injections of 1 µL of each sample by the automatic sampler and were accepted only if the standard sample deviation was less than 1% of the normalized peak intensity. Statistical analyses were performed using the parametric unpaired, two-tailed independent sample t test with 95%, 99% and 99.9 % confidence intervals. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) were considered to indicate significant differences in glucose carbon metabolism in NIH-3T3 fibroblasts and their derived transformant cell line (NIH-3T3 HRas-V12 fibroblasts).

RESULTS

HRas-V12 mutation does not alter glucose consumption and lactate production

Glucose consumption and lactate production were estimated in both cell lines. **Figure 1 A** shows that NIH-3T3 and HRas-V12 cells consumed and produced a similar quantity of glucose and lactate, respectively. Thus, the HRas-V12 mutation changed neither glucose consumption nor lactate production in this cell line.

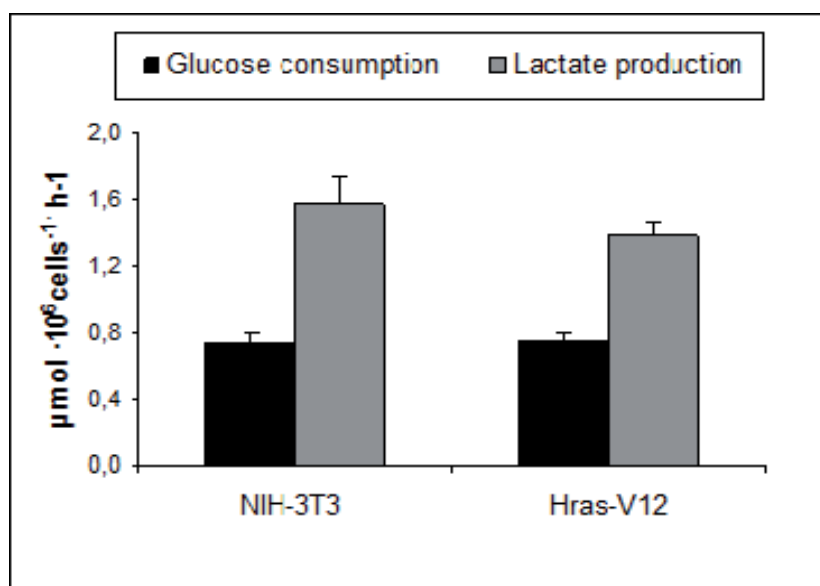


Figure 1. Glucose consumption and lactate production in NIH-3T3 and NIH-3T3 HRas-V12 cells at 48h.

Lactate is secreted to the medium and provides useful information about the relative contribution of glycolysis and pentose phosphate pathway (PPP). When [1,2-¹³C₂]-D-glucose is metabolized through glycolysis, m2 lactate is produced, whereas flux of labeled glucose through the oxidative and non-oxidative branches of the PPP results in m1 lactate (Lee, 2006). In **Table 1** lactate isotopomeric distribution for NIH-3T3 and HRas-V12 cells is shown. NIH-3T3 HRas-V12 cells presented a higher m2 lactate value respect to NIH-3T3 cells, indicating more lactate formation from glucose, which is corroborated by a increase in total ¹³C lactate enrichment (**Table1**), calculated as described in the *Material and Methods* section. Consequently, the glycolytic rate (being m2_{glucose} 49.7 %, data not shown) shown in **Figure 2** was slightly higher in the mutated cells than in the wild type ones. This fact is in accordance with the expected higher glycolytic rate of tumor cells (Vander Heiden *et al.*, 2009). This difference in glycolytic rate shows a tendency of *HRas* mutated cells, which correlates with the enhanced glycolytic rate described by (Telang *et al.*, 2007).

	m0	m1	m2	Σmn
NIH-3T3	0.769±0.002	0.013±0.001	0.218±0.004	0.449±0.007
HRas-V12	0.762±0.001	0.015±0.003	0.223±0.002	0.461±0.000

Table 1. Isotopomeric distribution in the formed lactate of each cell line after 48 hour of incubation with [1,2- $^{13}\text{C}_2$]-D-glucose. Total ^{13}C lactate enrichment from labeled glucose calculated as $\Sigma_{mn}=m1+2\times m2$ in NIH-3T3 and HRas-V12 cells.

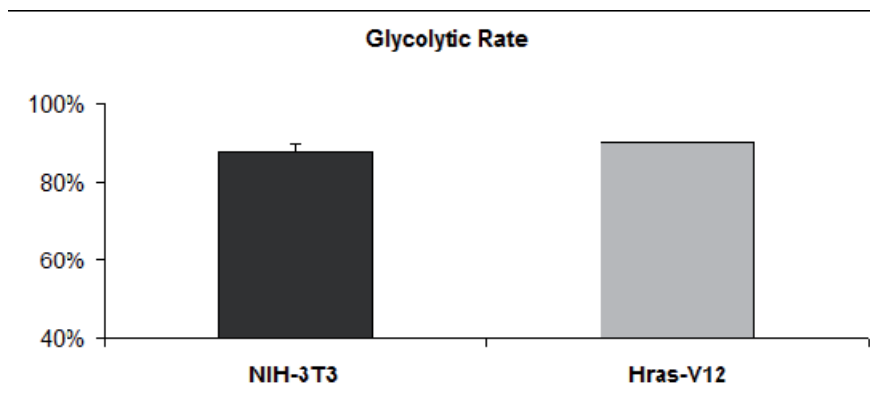


Figure 2. Glycolytic rate in NIH-3T3 and HRas-V12 expressed as $m_{2\text{lactate}}/(m_{2\text{glucose}}/2)$.

Moreover, HRas-V12 cells increased the m1 and m2 lactate values in comparison with NIH-3T3, which indicates a higher incorporation of label in lactate from glucose (**Table 1**). Thus, even lactate production was similar in both cell lines, ^{13}C isotopomer distribution showed that glucose metabolic network flux distribution is different between both cell lines and the mutated cells increase direct glucose oxidation and pentose recycling.

HK, LDH and PK activities were measured for the two cell lines (**Figure 3**). The results showed a similar activity of HK and LDH enzymes between both cell lines (**Figure 3 A and B**). Taking into account the results presented above, we concluded that metabolic adaptations could involve other relevant metabolic pathways of the cell, like PPP and the down part of glycolysis (Agudo-Ibáñez *et al.*, 2007). On the other hand, we have observed that the PK activity was higher in the mutated cell line than in the wild type cell line (**Figure 3 C**).

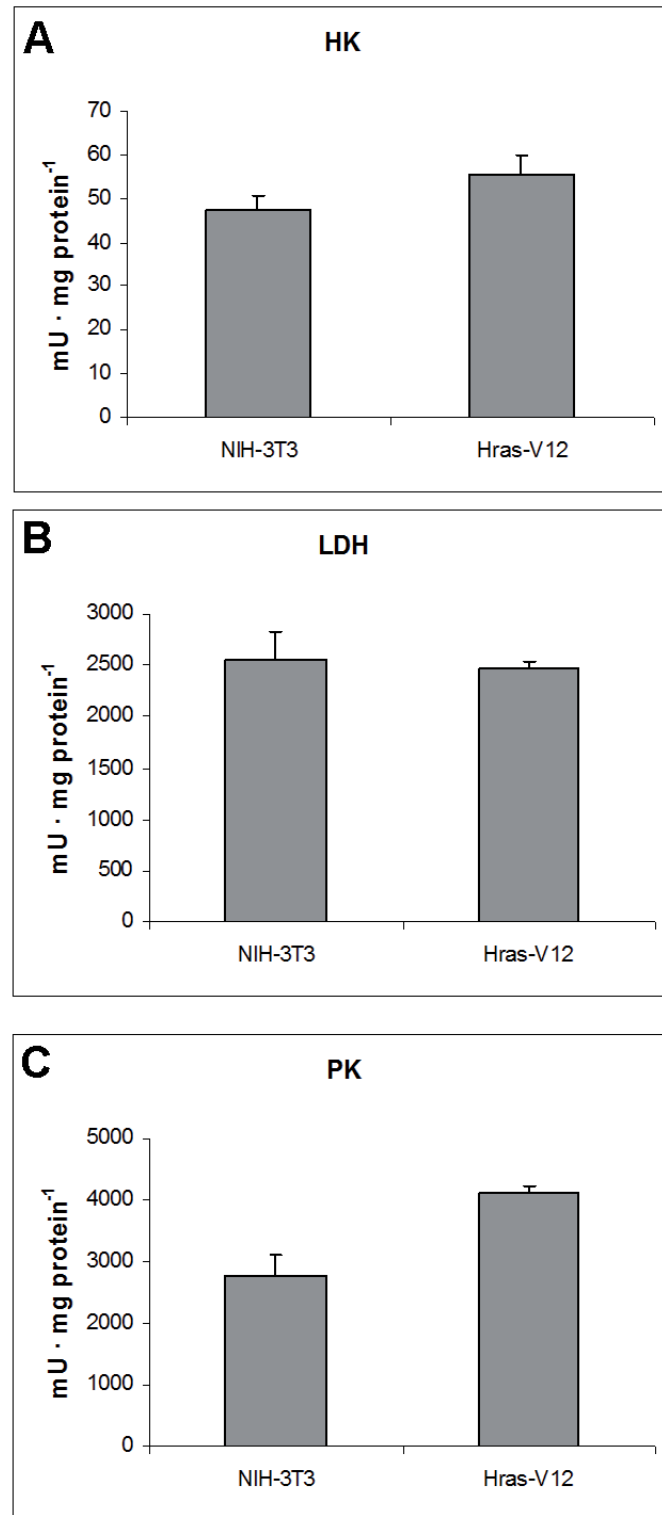


Figure 3. Normalized enzyme activity in NIH-3T3 and HRas-V12 expressed as mU · mg protein⁻¹. **A.** hexokinase specific activity; **B.** lactate dehydrogenase specific activity; **C.** piruvate kinase specific activity.

NIH-3T3 and HRas-V12 cells exhibit an active tricarboxylic acid cycle.

The TCA cycle was studied following two different approaches. First, glutamate and glutamine levels were quantified in both cell lines to determine the glutamine uptake and glutamate production/accumulation. HRas-V12 consumed 18.2% more glutamine than NIH-3T3 cells (**Figure 4**). Moreover, HRas-V12 cells produced $0.011 \pm 0.000 \mu\text{mol} \cdot 10^6 \text{ cells}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, while no glutamate was produced by NIH-3T3 (**Figure 4 A**). These results suggest that the mutation in V12 provoked an alteration in cells usage of glutamate/glutamine.

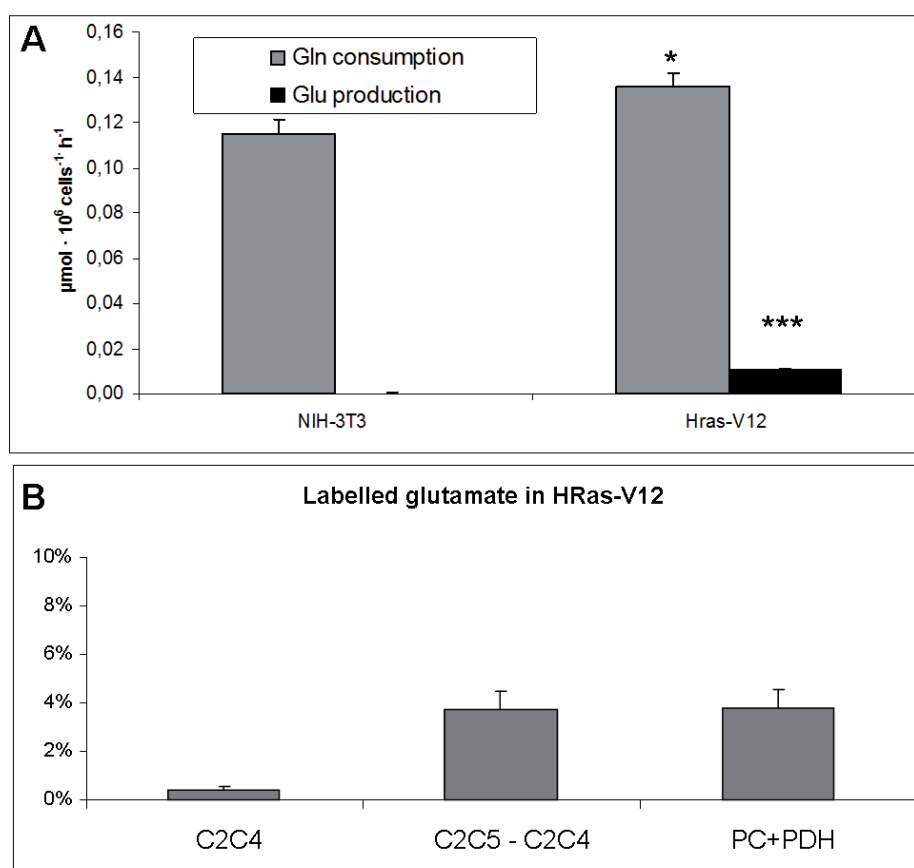


Figure 4. A. Determination of glutamate production and glutamine consumption in NIH-3T3 and HRas-V12. **B.** ^{13}C labelled $\text{C}_2\text{-C}_4$ and $(\text{C}_2\text{-C}_5)\text{-}(\text{C}_2\text{-C}_4)$ glutamate and contribution of PC and PDH ($\text{m}_2 \text{C}_2\text{-C}_4 + \text{m}_2 \text{C}_2\text{-C}_5$) in HRas-V12 cells. $p < 0.05$ (*) and $p < 0.001$ (***) were considered to indicate statistic significant differences between NIH-3T3 and HRas-V12.

On the other hand, another approach to study the TCA cycle was measurement of ^{13}C label in glutamate, which reflects the utilization of TCA cycle, both related to glucose metabolism or glutamine uptake. The more glucose is oxidized through mitochondrial respiratory chain, the more label in glutamate that will be found; oppositely, the more glutamine is consumed from the media the less label that will be present in glutamate due to carbon

dilution. Incorporation of ^{13}C in glutamate was studied in NIH-3T3 and HRas-V12 cells and label incorporation in the $\text{C}_2\text{-C}_5$ glutamate fragment was found only in the mutated cells. Concretely, we observed that in HRas-V12 cells Σmn was 0.12 ± 0.01 . This indicates a high contribution of glucose carbons to the TCA cycle in HRas-V12.

From the levels of m2 isotopomers of the $\text{C}_2\text{-C}_4$ and the $\text{C}_2\text{-C}_5$ fragments and ^{13}C label enrichment in the $\text{C}_2\text{-C}_5$ fragment we estimated the preference of the mutated HRas-V12 cells to introduce pyruvate into the mitochondria using pyruvate dehydrogenase (PDH) or pyruvate carboxylase (PC) pathways: since glycolysis formed two-labeled-carbon pyruvate that could enter to the TCA cycle via PC for anabolic purposes or via PDH, the position of labeled carbons in m2 secreted glutamate could allow us to distinguish the preferential route of carbon use by employing electron impact (EI) mode of the mass spectrometer. PC enzyme use was approximately zero in HRas-V12 cell line, indicating that this anabolic futile cycle is not used due to the fact that the glutamine from de media supplies the intermediaries of the TCA cycle. Therefore, total ^{13}C glutamate enrichment, labelled $\text{C}_2\text{-C}_4$, $(\text{C}_2\text{-C}_5)\text{-}(\text{C}_2\text{-C}_4)$ glutamate and PC and PDH contribution (**Figure 4 B**) led us to hypothesize that pyruvate goes mainly into the mitochondria through PDH in the HRas-V12 cell line.

The HRas-V12 cells present a higher synthesis of fatty acids.

Incubation with labelled glucose showed an increase in the incorporation of labelled acetyl-CoA into palmitate and stearate synthesis in the mutated cells compared to wild type cells (**Figure 5 A**), indicating a higher *de novo* fatty acids synthesis in HRas-V12 cells (**Figure 5 B**). Furthermore, the percentage of glucose that generates acetyl-CoA is higher in HRas-V12 than in NIH-3T3 cells for both fatty acids (stearate and palmitate) (**Figure 5 C**). The ratio between palmitate and stearate (0.65 ± 0.03 to NIH-3T3 and 0.79 ± 0.02 to HRas-V12) indicated that the synthesis of long chain fatty acids is produced through chain elongation from palmitate, since during cell culture time cells would not have time enough to synthesize *de novo* long chain fatty acids.

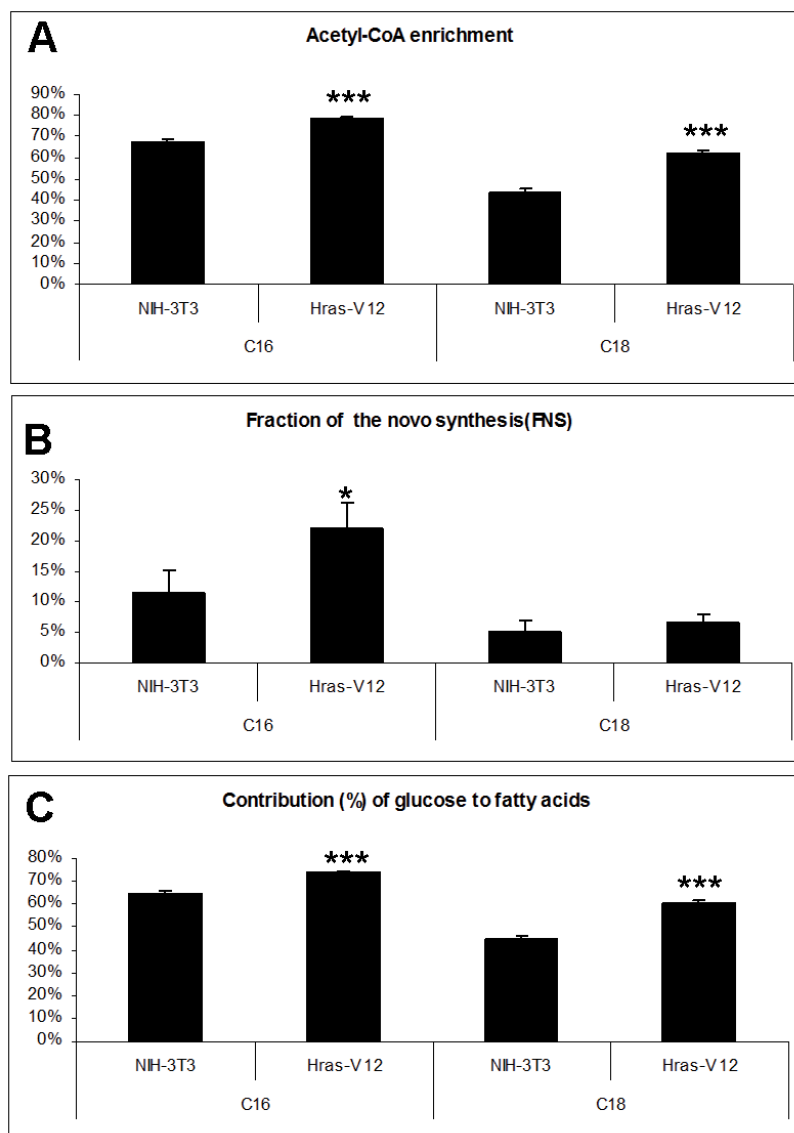


Figure 5. ^{13}C incorporation on fatty acids. **A.** Acetyl-CoA enrichment on palmitate and stearate in NIH-3T3 and HRas cells after 48h of incubation with $[1,2]\text{-}^{13}\text{C}_2\text{-D-glucose}$. **B.** Percentage of contribution that correlates with the percentage of palmitate and stearate that come from glucose. **C.** Fraction of *de novo* synthesis of palmitate and stearate respect to the whole fatty acid fraction. C16: palmitate; C18: stearate. $p < 0.05$ (*) and $p < 0.001$ (***) were considered to indicate statistic significant differences between NIH-3T3 and HRas-V12.

The pentose phosphate pathway is differently used in NIH-3T3 and HRas-V12 cells.

The proliferation rate of the two cell lines was not statistically different (0.043 h^{-1} for NIH-3T3 and 0.044 h^{-1} for HRas-V12 cells). Consequently, their duplication time was considered similar (approximately 15h).

Label incorporation into ribose has m1 and m2 as the two isotopomers more abundant (Figure 6), although m3, m4 and m5 species are also formed. The resulting isotopomer

distribution showed that both cell lines incorporated approximately the same ^{13}C into RNA ribose ($\Sigma m = 50.8\%$ in NIH-3T3 and $\Sigma m = 49.7\%$ in HRas-V12). This would be in accordance with the fact that both cell lines have similar rates of proliferation, which implies similar requirements of nucleotides for generation of new cells.

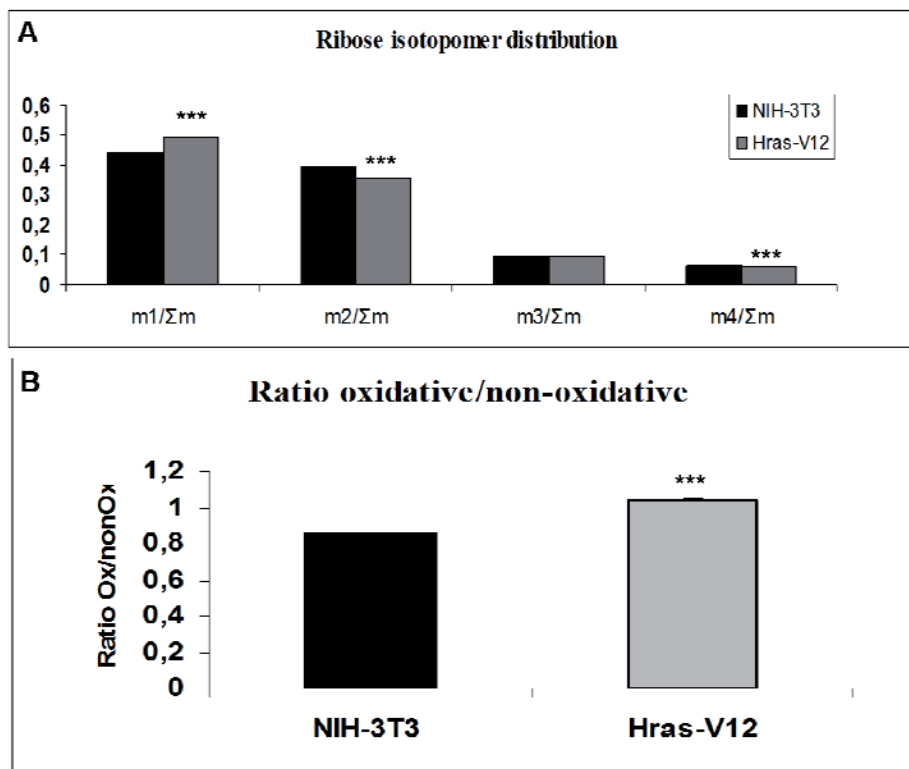


Figure 6. RNA ribose synthesis through the pentose cycle in NIH-3T3 and HRas-V12 cells. **A.** Incorporation of ^{13}C glucose into RNA ribose through direct oxidation is expressed as $m1/\Sigma m$, while the non-oxidative pentose phosphate pathway flux is indicated by $m2/\Sigma m$. **B.** The contribution of oxidative vs. non-oxidative branches of PPP was calculated from the isotopomeric distribution of RNA ribose as $\text{ox}/\text{nonox} = (m1+m3)/(m2+m3+2 \cdot m4)$. $p < 0.001$ (***) was considered to indicate statistic significant differences between NIH-3T3 and HRas-V12.

Figure 7A shows a graphical representation of the distribution of the different isotopomers of ribose $m1$, $m2$, $m3$ and $m4$ obtained from the labeled glucose label normalized with the summatory of the molar fractions of all the labeled species of ribose (Σm). $m2$ is originated from glucose that is converted to lactate directly by glycolysis, whereas $m1$ is originated from glucose metabolized by direct oxidation via the oxidative steps of the pentose phosphate pathways and then recycled to glycolysis via the non-oxidative pentose pathway. The HRas-V12 mutation brought along an increase of $m1/\Sigma m$ and an opposite decrease of $m2/\Sigma m$. This increase in $m1/\Sigma m$ and the drop of $m2/\Sigma m$ indicated an increased contribution of the oxidative pentose phosphate pathway flux in lactate synthesis.

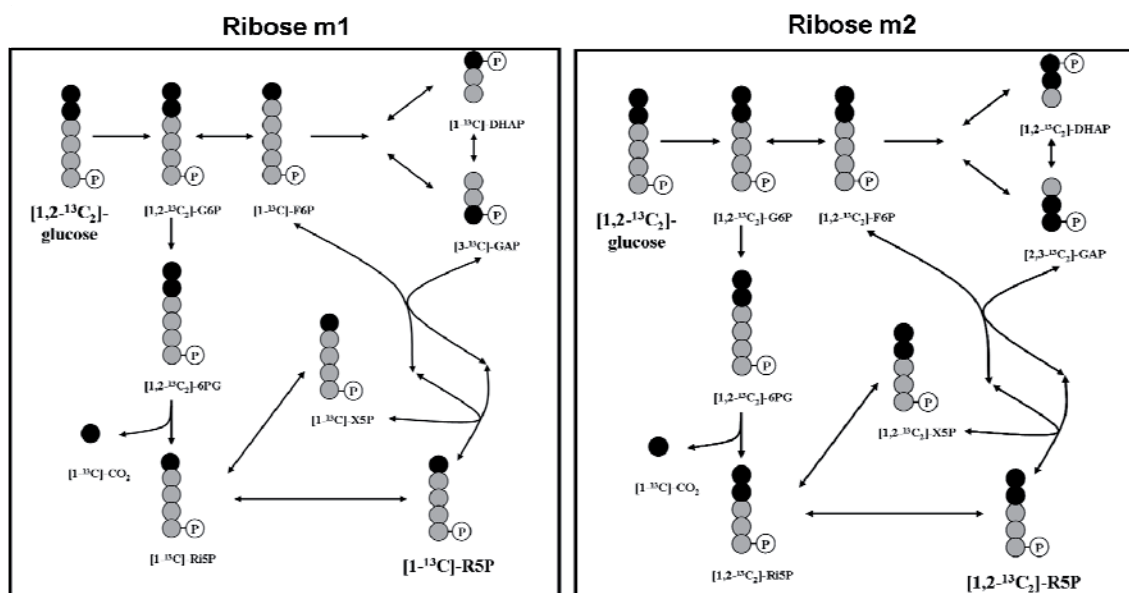


Figure 7. Schematic representation of labelled m1 and m2 ribose in the pentose phosphate pathway. m2 species correspond to those generated through the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway while m1 species are those produced through the oxidative branch of the pentose phosphate pathway. G6P: glucose-6-phosphate; F6P: fructose-6-phosphate; DHAP: dihydroxyacetone phosphate; GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; 6PG: 6-phosphoglycerate; CO₂: carbon dioxide; R5P: ribose-5-phosphate; X5P: xylulose-5-phosphate.

	m1	m2	m3	m4	m5
NIH-3T3	0.2247±0.0009	0.2005±0.0007	0.0484±0.0003	0.0338±0.0002	0.0008±0.0002
Hras-V12	0.2445±0.0014	0.1762±0.0014	0.0477±0.0008	0.02827±0.0004	0.0007±0.0001

	m1/Σm	m2/Σm	m3/Σm	m4/Σm	m5/Σm
NIH-3T3	0.4421± 0.0008	0.3946± 0.0007	0.0952± 0.0006	0.0664± 0.0002	0.0016±0.0003
Hras-V12	0.4915± 0.0027	0.3543± 0.0021	0.0959± 0.0016	0.0568± 0.0009	0.0014±0.0003

Table 2. Ribose isotopomer distribution of ¹³C enrichment, expressed with respect a total ribose of one, in NIH-3T3 and NIH-3T3-HRas-V12 cells, and incorporation of ¹³C glucose into RNA ribose through direct oxidation $m1/\Sigma m$ or via the non-oxidative PPP pathway $m2/\Sigma m$.

The ratio between fluxes through oxidative and non-oxidative branches of PPP (ox/nonox) can be estimated from the data in **Table 2**. The unbalance of ox/nonox ratio in favor of the oxidative pathway has been described as a robust characteristic of tumor metabolic adaptation that can be overwhelmed with drug combination, being a potential target for anticancer therapy (Ramos-Montoya *et al.*, 2006). **Figure 6 B** shows that the ox/nonox ratio in NIH-3T3 cells was lower than in HRas-V12 cells. These results showed that the mutated cells had not a higher synthesis of pentose phosphates *de novo* when compared to their wild type counterparts, but the use of the oxidative and non-oxidative branches of PPP for the synthesis of

these pentoses is different in both cell lines. **Figure 6 A** and **Table 2** show a higher dependence on the oxidative pathway of PPP in mutated cell line. To analyze this difference in ribose label incorporation and its correlation with a change in enzyme pattern profile of the cells, the activity of the main enzymes from the oxidative and non-oxidative branches of PPP, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and transketolase (TKT), respectively, was studied. **Figure 8** shows a significant higher activity of G6PDH in HRas-V12 and the significant decrease of TKT activity in this mutated cell line. Western blot assay was used to elucidate if the G6PDH activity change was due to an increase of total protein. **Figure 9** shows that in both cell lines the protein level of the G6PDH enzyme was similar, indicating that the higher activity of the rate-limiting enzyme of the oxidative pathway (G6PDH) may not be due to an increase in the enzyme expression levels, but instead to post-translational changes.

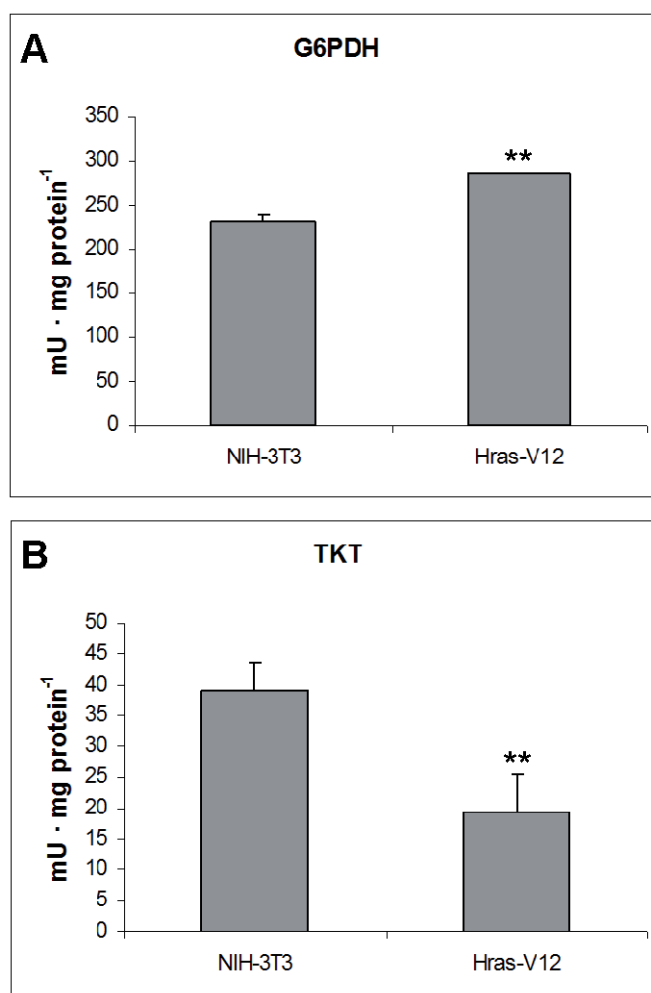


Figure 8. Normalized enzyme activity on NIH-3T3 and NIH-3T3-HRas-V12 expressed as mU · mg protein⁻¹. **A.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity; **B.** Transketolase activity. $p < 0.01$ (**). was considered to indicate statistical significant differences between NIH-3T3 and HRas-V12.

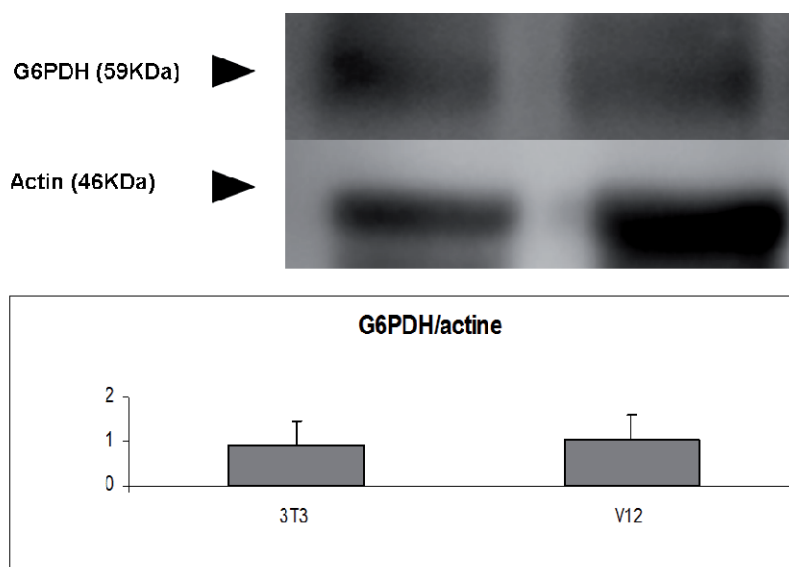


Figure 9. Western blot analysis and quantification in extracts of NIH-3T3 and HRas-V12 cells. Actin expression was used as loading control.

Drawing a complete picture of the flux distribution

In **Figure 10A** is shown the scheme of the whole network under study, which is accounting to the more relevant reactions. Reaction steps A to T are accounting to glycolysis, pentose-phosphate, and TCA cycle enzyme catalysed reactions. Some reactions are neglected and grouped into blocks –e.g. reaction step I accounting to the block from glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase to enolase – and others are assumed to be involved in rapid equilibriums – e.g. glucose-6-phosphate isomerase. Metabolites are combined into pools: a first pool for hexose-phosphates (HexP) accounting for G6P and F6P; a second pool for pentose-phosphates (PenP) accounting for R5P, Rb5P, and X5P; a third pool for triose-phosphates (TrisP) accounting for DHAP and GAP; and a fourth pool accounting for oxaloacetate (OAA) and malate (Mal). The rest of metabolic intermediaries are glucose (Glc), ribose (Rib), lactate (Lac), glutamate (Glu), glutamine (Gln), fructose-1,6-bisphosphate (FBP), sedoheptulose-7-phosphate (S7P), erythrose-4-phosphate (E4P), phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate (Pyr), acetyl-CoA (ACoA), citrate (Cit), 2-oxoglutarate (α KG), and succinate (Suc). Assuming steady-state conditions, the stoichiometry is constraining the dependences among fluxes:

$$J_A - J_B - J_C - J_{Hb} + J_{Hf} - J_{Ib} + J_{If} = 0$$

$$J_B - J_D + 2J_{Gb} - 2J_{Gf} + J_{Hb} - J_{Hf} = 0$$

$$J_C - J_E = 0$$

$$\begin{aligned}
 2J_E - J_{Gb} + J_{Gf} - J_{Hb} + J_{Hf} + J_{Ib} - J_{If} - J_F &= 0 \\
 J_{Hb} - J_{Hf} - J_{Ib} + J_{If} &= 0 \\
 -J_{Gb} + J_{Gf} + J_{Ib} - J_{If} &= 0 \\
 J_F - J_K &= 0 \\
 J_K - J_L + J_R - J_S - J_T &= 0 \\
 J_L - J_M - J_Y &= 0 \\
 J_M - J_N &= 0 \\
 J_N - J_O + J_U &= 0 \\
 J_O - J_P &= 0 \\
 -J_M + J_P - J_R + J_S - J_Z &= 0
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

were J_{Gf} , J_{Hf} , J_{If} and J_{Gb} , J_{Hb} , J_{Ib} are the forward (J_{if}) and backward (J_{ib}) fluxes through the reversible reactions $J_G = J_{Gf} - J_{Gb}$, $J_H = J_{Hf} - J_{Hb}$, and $J_I = J_{If} - J_{Ib}$. The stoichiometry and the measured system input and output fluxes - glucose consumption (J_A) and glutamate-glutamine consumption J_U , and lactate production J_T - are constraints limiting the space of solutions for the internal metabolic fluxes and the additional outputs (J_D , J_Y , J_Z) to Rib. Additional constrains are based in the isotopomer-based analysis. Isotopomer abundances of lactate provide the ratio of fluxes through PPP J_B with respect to the carbon flow descending through glycolysis J_C (Lee *et al.*, 1998): $J_B/J_C = 3 \cdot (m1/m2)/(3+(m1/m2)) = 0.037$ (non-transfectants) or 0.064 (HRas-V12 transfectants). Isotopomer abundances of ribose (RNA) provide the ratio of fluxes through oxidative J_B and non-oxidative PPP $2 \cdot J_{Gb} + J_{Hb}$ (Boros *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1998): $J_B/(2 \cdot J_{Gb} + J_{Hb}) = (m1+m3)/(m2+m3+2 \cdot m4) = 0.86$ (non-transfectants) or 1.04 (HRas-V12 transfectants). Finally, isotopomer abundances of C₂-C₄ and C₂-C₅ fragments of glutamate - which are only significant for HRas-V12 transfectants - provide the relative contributions of PC J_S and PDH J_L to the TCA cycle (Boros *et al.*, 2003; Lee, 1996; Marin *et al.*, 2003): $J_S/J_L = m2[C_2-C_4] / (m2[C_2-C_5] - m2[C_2-C_4]) = 0.13$ (HRas-V12 transfectants).

However, the available measurements are not enough and the system is undetermined. An interval constraint satisfaction approach has been recently proposed to be applicable when the available measurements are insufficient and/or uncertain and the complete flux distribution cannot be uniquely calculated (Llaneras and Pico, 2007; Llaneras *et al.*, 2009). Lower and upper bounds are assigned to all fluxes. Measured J_A , J_T , and J_U are set to have fixed values, same lower and upper limits, corresponding to the mean value measured (**Figure 1 and 4A**). Lower

DISCUSSION

Different metabolic adaptations have been reported for two specific mutations associated to the KRas isoform and with respect to the non-mutated form (Vizan *et al.*, 2005). The metabolic adaptation of a mutated form of the HRas isoform is here analyzed. We have used stable isotope-labeled glucose tracer technology and an *in vitro* HRas-V12 transfected NIH-3T3 cell model. This cell model expresses increased levels of codon 12 valine. The results demonstrated significantly different patterns of metabolic activities. These significantly different metabolic profiles, including different patterns of substrate utilization, could explain the observed differences in malignant phenotypes. Our results show that HRas-V12 cells mainly route glucose to anaerobic glycolysis like non-mutated NIH-3T3. On the one hand, glucose uptake and lactate production are shown to be similar, which is in accordance to the fact that normal non-immortalized human bronchial epithelial cells supplemented with growth factors have similar rates in glucose consumption and lactate production to the HRas-V12 transformed human bronchial epithelial cells (Telang *et al.*, 2006).

On the other hand, using the tracer based metabolomics approach that permits to account for fluxes distribution in glucose metabolic network, we demonstrate that do exist differences at various levels, such as increase in PPP, in fatty acid synthesis, in PK activity and in glutamate uptake.

The ^{13}C labeled lactate (m1) indicates that HRas-V12 cells use the oxidative branch of the PPP more than NIH-3T3. These results are in accordance with those described previously by our group, in which we demonstrated that the unbalance between the oxidative and non-oxidative branches of the PPP is necessary to maintain the metabolic efficiency of cancer cells to grow and proliferate (Ramos-Montoya *et al.*, 2006). G6PDH and TKT enzymes have been shown to share the control of the flux throughout the PPP in various mammalian cells (Berthon *et al.*, 1992; Sabate *et al.*, 1995; Schuster *et al.*, 1999). Therefore, changes in their activities in response to a mutation in *HRas* gene are likely to influence the synthesis of nucleic acid ribose in NIH-3T3. The proliferation rate is similar in both mutated and non-mutated cells; however our results suggest a slightly increase of the synthesis *de novo* of nucleotides. In this context, the unbalance between the oxidative and non-oxidative branches of the PPP could be the key for the transformant phenotype due to the HRas-V12 mutation. Accordingly, our results show that the activities of G6PDH and TKT differ in both cell lines. HRas-V12 cell line has an increased G6PDH activity and a decreased TKT activity, suggesting that the mutated cell line is using more the oxidative pathway in order to obtain nucleotides. This unbalance in the usage of the branches of the PPP is a feature from cancer cells that provides them a metabolic efficiency to proliferate (**Figure 11**). Moreover, with this metabolic adaptation HRas-V12 could obtain more reducing power (NADPH) to anabolic processes, such as fatty acid synthesis, which is increased

in this cell line compared with non-mutated NIH-3T3. The NADPH is used to neutralize ROS production in the mitochondria, due to the fact that this HRas-V12 cells have an increased TCA cycle (Salvemini *et al.*, 1999). Moreover, the increased activity of G6PDH correlates with an increased resistance of apoptosis (Li *et al.*, 2009), which could explain the progression mechanism of the HRas-V12 tumor cells that consist in being more immortal more than be more proliferant.

The observed increase in fatty acid synthesis might correlate with the increased Akt activity in cell lines with an active PI3K pathway (those which normally have *HRas* mutated) (Carón *et al.*, 2005). In cells where PI3K pathway is active, citrate generated in the mitochondrial TCA cycle is exported to the cytoplasm, where it is utilized for acetyl-coA generation by ATP-citrate lyase, which is directly phosphorylated and activated by Akt. By increasing citrate utilization, Akt may help to drive TCA cycle flux, in addition to providing precursors for lipid biosynthesis for new membrane generation (Robey and Hay, 2009).

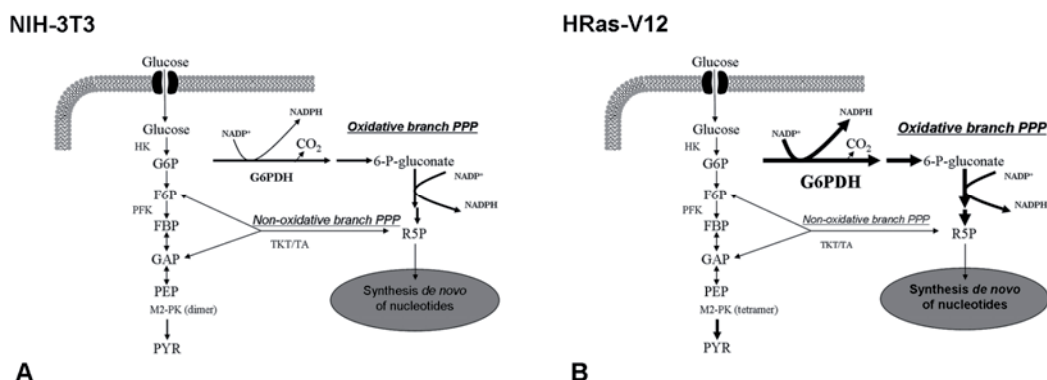


Figure 11. Diagrams comparing PPP metabolism. The main fluxes in PPP metabolic pathway are represented. **A.** Metabolic pathways in non-mutated NIH-3T3 cells, **B.** Metabolic pathways in HRas-V12 mutated cells. Thicker arrows indicate higher fluxes and thinner arrows indicate decreased fluxes. TA, transaldolase.

In addition to the increase of G6PDH and the decrease of TKT specific activities, one more enzyme activity – piruvate kinase (PK) - has been shown to be significantly modified. Although the fluxes through glycolysis (J_A , J_C) are similar in both cells lines, the flux through PK (J_K) is slightly increased in HRas-V12 cell line (**Figure 10**). This fact could be explained by changes in the equilibrium between the dimeric and the tetrameric forms of this enzyme. Thus, the dimeric form has lower affinity for its substrate, PEP, and leads to accumulation of intermediate products that would be derived to the synthesis of nucleic acids, phospholipids and amino acids at the expense of ATP production (Mazurek *et al.*, 2005), (Christofk *et al.*, 2008). Contrarily, the tetrameric form binds efficiently to PEP to conclude the glycolytic pathway.

NIH-3T3 cell line has a dimeric form of PK, which has less affinity to PEP and permit glycolytic intermediary accumulation. These intermediaries are rerouting through the PPP cycle increasing the TKT activity. On the other hand, mutated cell line, with a tetrameric form of M2-PK has high affinity to PEP and does not permit glycolytic intermediaries accumulation which could explain the lower TKT activity showed by NIH-3T3 cells.

Also, the value of the flux from Pyr to the TCA cycle is uncertain in both cell lines (Figure 10) due to the fact that we do not have measures about the possible outputs affecting the TCA cycle. Moreover, although in non-mutated cells there was not labeled glutamate (Figure 4A), the presence of labeled glutamate in HRas-V12 mutated cells demonstrated that they use PDH to enter Pyr to the mitochondria. Additionally, the low flux through PC (**Figure 4B**) shows that these mutant cells do not use this enzyme as an anabolic enzyme, because although they present very active mitochondria, the TCA cycle intermediaries are supplied by those generated from the degradation of glutamine. However, both non-transfected NIH-3T3 and HRas-V12 transfected cells significantly imported glutamine to produce glutamate, which is then driven to the mitochondria. In this process it is also released ammonium that is used to other cellular processes, such as ammination of 5-phosphoribosyl pyrophosphate for the *de novo* synthesis of nucleotides. Glutamate enters mitochondria and is easily interconverted to α -ketoglutarate that is used to generate reducing power and as a source of carbons to bind with acetyl-CoA generated from the higher activity of PDH and to generate citrate, which is excreted from the mitochondria in order to do fatty acids synthesis. Equally, α -ketoglutarate from mitochondria is interconverted to glutamate that can be excreted out of mitochondria. When ^{13}C labelled glucose is used, the presence of ^{13}C in glutamate isolated from the media indicates that mitochondria have an excess of intermediaries of TCA cycle, which is buffered excreting ^{13}C labeled glutamate to the media. Thus, the presence of labeled molecules of glutamate in the media of HRas-V12 mutated cells indicates that these cells did not need all the glutamate that is available, suggesting that the higher glutamine consumption is due to the higher need of ammonia to anabolic processes of these cells compared to non-mutated NIH-3T3 cells. However, NIH-3T3 cells are using all the glutamate formed from glutamine as in this case glutamate is required by the mitochondria (**Figure 12**).

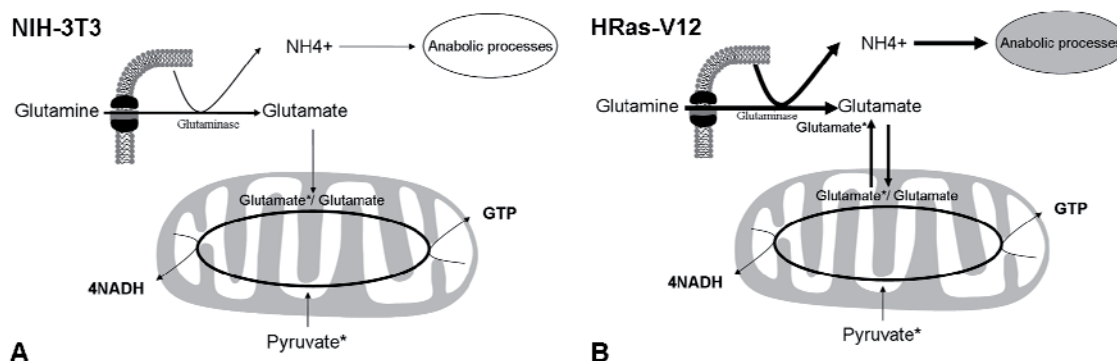


Figure 12. Diagrams comparing the use of glutamine/glutamate. Fluxes of glutamine and glutamate exchange are represented. **A.** Metabolic pathways in non-mutated NIH-3T3 cells, **B.** Metabolic pathways in HRas-V12 mutated cells. Thicker arrows indicate higher fluxes and thinner arrows indicate decreased fluxes. (*) labeled molecules.

We conclude that the specificity of phenotypic transformations in HRas-V12 mutants are related not only to altered signaling pathways but also to distinct alterations in metabolic profiles, which - as manifestations of gene expression - provide metabolic *fingerprints* that could be associated with the different tumor phenotypes. Thus, HRas-V12 mutants, with a less transforming phenotype (Keller *et al.*, 2007), could avoid cell death showing a robust metabolism characterized by increasing oxidative ribose synthesis, glutamine degradation to glutamate releasing ammonia to help nucleotides synthesis and fatty acid synthesis. This metabolic profile as quite similar at that showed for Kras mutants in codon 12 for Vizan and collaborators researchers (Vizan *et al.*, 2005), concluding that the mutation in codon 12 is highly biosynthetic. The present study not only shows that metabolomics can be a powerful tool in understanding mechanisms underlying different tumor phenotypes, but also shows that metabolic profiles may be used to identify aggressive tumors, in a manner complementary to the predictive tools providing proteomic and genomic profiles.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants SAF2008- 490 00164 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and ISCIII-RTICC (RD06/0020/0046) from the Spanish government, from the European Union FEDER funds and from the European Commission (FP7) Etherpaths KBBE-grant agreement no.222639. It has also received financial support from the Government of Catalonia (2005SGR00204). One of us (M. Z.) acknowledges the Generalitat de Catalunya for the predoctoral fellowship.

BIBLIOGRAPHY

- Agudo-Ibáñez, L., Núñez, F., Calvo, F., Berenjano, I.M., Bustelo, X.R., and Crespo, P. (2007). Transcriptomal profiling of site-specific Ras signals. *Cellular Signalling* **19**, 2264-2276.
- Bergmeyer, H.U., ed. (1985). *Methods of Enzymatic Analysis* (Weinheim, Verlag Dhemie).
- Berthon, H.A., Kuchel, P.W., and Nixon, P.F. (1992). High control coefficient of transketolase in the nonoxidative pentose phosphate pathway of human erythrocytes: NMR, antibody, and computer simulation studies. *Biochemistry* **31**, 12792-12798.
- Boren, J., Lee, W.N., Bassilian, S., Centelles, J.J., Lim, S., Ahmed, S., Boros, L.G., and Cascante, M. (2003). The stable isotope-based dynamic metabolic profile of butyrate-induced HT29 cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 28395-28402.
- Boros, L.G., Cascante, M., and Paul Lee, W.-N. (2002). Metabolic profiling of cell growth and death in cancer: applications in drug discovery. *Drug Discovery Today* **7**, 364-372.
- Boros, L.G., Steinkamp, M.P., Fleming, J.C., Lee, W.N., Cascante, M., and Neufeld, E.J. (2003). Defective RNA ribose synthesis in fibroblasts from patients with thiamine-responsive megaloblastic anemia (TRMA). *Blood* **102**, 3556-3561.
- Carón, R.W., Yacoub, A., Li, M., Zhu, X., Mitchell, C., Hong, Y., Hawkins, W., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Kozikowski, A.P., *et al.* (2005). Activated forms of H-RAS and K-RAS differentially regulate membrane association of PI3K, PDK-1, and AKT and the effect of therapeutic kinase inhibitors on cell survival. *Mol Cancer Ther* **4**, 257-270.
- Comin-Anduix, B., Boros, L.G., Marin, S., Boren, J., Callol-Massot, C., Centelles, J.J., Torres, J.L., Agell, N., Bassilian, S., and Cascante, M. (2002). Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 46408-46414.
- Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., and Cantley, L.C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452**, 230-233.
- Dang, C.V., and Samenza, G.L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends BioSci* **24**, 68 - 72.
- Drosten, M., Dhawahir, A., Sum, E.Y.M., Urosevic, J., Lechuga, C.G., Esteban, L.M., Castellano, E., Guerra, C., Santos, E., and Barbacid, M. (2010). Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *EMBO J advance online publication*.
- Grossbard, L., and Schimke, R.T. (1966). Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. *The Journal of biological chemistry* **241**, 3546-3560.
- Grossbard, L., Weksler, M., and Schimke, R.T. (1966). Electrophoretic properties and tissue distribution of multiple forms of hexokinase in various mammalian species. *Biochem Biophys Res Commun* **24**, 32-38.
- Gutmann, I., and Wahlefeld, A.W. (1974). *L-(+)-Lactate*. In *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer, ed. (NY, Academic Press), pp. 1464-1468.
- Keller, J.W., Franklin, J.L., Graves-Deal, R., Friedman, D.B., Whitwell, C.W., and Coffey, R.J. (2007). Oncogenic KRAS provides a uniquely powerful and variable oncogenic contribution among RAS family members in the colonic epithelium. *J Cell Physiol* **210**, 740-749.

- Kole, H.K., Resnick, R.J., Van Doren, M., and Racker, E. (1991). Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in ras-transformed rat-1 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **286**, 586-590.
- Kunst, A., Draeger, B., and Ziegenhorn, J. (1984). *D-Glucose; UV-methods with hexolinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase*. In *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer, ed. (Weinheim, Verlag Chemie), pp. 163-172.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, W.N. (1996). Stable isotopes and mass isotopomer study of fatty acid and cholesterol synthesis. A review of the MIDA approach. *Adv Exp Med Biol* **399**, 95-114.
- Lee, W.N., Boros, L.G., Puigjaner, J., Bassilian, S., Lim, S., and Cascante, M. (1998). Mass isotopomer study of the nonoxidative pathways of the pentose cycle with [1,2-¹³C₂]glucose. *Am J Physiol* **274**, E843-851.
- Lee, W.N.P. (2006). Characterizing phenotype with tracer based metabolomics. *Metabolomics* **2**, 31-39.
- Li, D., Zhu, Y., Tang, Q., Lu, H., Li, H., Yang, Y., Li, Z., and Tong, S. (2009). A new G6PD knockdown tumor-cell line with reduced proliferation and increased susceptibility to oxidative stress. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* **24**, 81-90.
- Llaneras, F., and Pico, J. (2007). A procedure for the estimation over time of metabolic fluxes in scenarios where measurements are uncertain and/or insufficient. *BMC Bioinformatics* **8**, 421.
- Llaneras, F., Sala, A., and Pico, J. (2009). A possibilistic framework for constraint-based metabolic flux analysis. *BMC Systems Biology* **3**, 79.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**, 459-465.
- Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., Lee, W.-N.P., Boros, L.G., Fernandez-Novell, J.M., Centelles, J.J., Medrano, A., Rodriguez-Gil, J.E., and Cascante, M. (2003). Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Letters* **554**, 342-346.
- Mazurek, S., Boschek, C.B., Hugo, F., and Eigenbrodt, E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* **15**, 300-308.
- Omerovic, J., Laude, A., and Prior, I. (2007). Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 2575-2589.
- Racker, E., Resnick, R.J., and Feldman, R. (1985). Glycolysis and methylaminoisobutyrate uptake in rat-1 cells transfected with ras or myc oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 3535-3538.
- Ramanathan, A., Wang, C., and Schreiber, S.L. (2005). Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5992-5997.
- Ramos-Montoya, A., Lee, W.-N.P., Bassilian, S., Lim, S., Trebukhina, R.V., Kazhyna, M.V., Ciudad, C.J., Noé, V., Centelles, J.J., and Cascante, M. (2006). Pentose phosphate cycle oxidative and non-oxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* **119**, 2733-2741.
- Robey, R.B., and Hay, N. (2009). Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* **19**, 25-31.
- Sabate, L., Franco, R., Canela, E.I., Centelles, J.J., and Cascante, M. (1995). A model of the pentose phosphate pathway in rat liver cells. *Mol Cell Biochem* **142**, 9-17.

- Salvemini, F., Franze, A., Iervolino, A., Filosa, S., Salzano, S., and Ursini, M.V. (1999). Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *The Journal of biological chemistry* **274**, 2750-2757.
- Schuster, S., Dandekar, T., and Fell, D.A. (1999). Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends Biotechnol* **17**, 53-60.
- Smeets, E.H., Muller, H., and de Wael, J. (1971). A NADH-dependent transketolase assay in erythrocyte hemolysates. *Clin Chim Acta* **33**, 379-386.
- Telang, S., Lane, A.N., Nelson, K.K., Arumugam, S., and Chesney, J. (2007). The oncoprotein H-RasV12 increases mitochondrial metabolism. *Mol Cancer* **6**, 77.
- Telang, S., Yalcin, A., Clem, A.L., Bucala, R., Lane, A.N., Eaton, J.W., and Chesney, J. (2006). Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* **25**, 7225-7234.
- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.C., Tian, X., and Stanton, R.C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of biological chemistry* **273**, 10609-10617.
- Urosevic, J., Eleanor, Y.M.S., Victoria, M., Matthias, D., Alma, D., Mercedes, B., Amancio, C., and Mariano, B. (2009). Using cells devoid of RAS proteins as tools for drug discovery. *Mol Carcinog* **48**, 1038-1047.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029-1033.
- Vizan, P., Boros, L.G., Figueras, A., Capella, G., Mangués, R., Bassilian, S., Lim, S., Lee, W.N., and Cascante, M. (2005). K-ras codon-specific mutations produce distinctive metabolic phenotypes in NIH3T3 mice [corrected] fibroblasts. *Cancer Res* **65**, 5512-5515.
- Walsh, A.B., and Bar-Sagi, D. (2001). Differential Activation of the Rac Pathway by Ha-Ras and K-Ras. *JBiolChem* **276**, 15609-15615.
- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., and Hancock, J.F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* **273**, 24052-24056.



ANNEX

El treball realitzat durant el desenvolupament d'aquesta Tesi Doctoral ha contribuït a generar, a més a més d'aquesta memòria, dos publicacions més en revistes internacionals de prestigi reconegut i una més a punt de ser enviada. Encara que aquestes publicacions no formen part del gruix de la Tesi Doctoral, la seva relació directa amb ella és evident.

La primera publicació va ser editada per la revista *Analytical Chemistry*⁽¹⁾(Vizan *et al.*, 2007), amb un índex d'impacte de **5,712**. En aquest paper es desenvolupa un mètode experimental basat en l'ús de plataformes analítiques com el LC/MS per tal de quantificar els sucres fosfat. Aquest mètode ha estat utilitzat en el capítol 1 d'aquesta Tesis Doctoral.

L'autora de la present Tesi Doctoral també va col·laborar durant el procés experimental de l'article "*Metabolic adaptation and the sign of metabolic control coefficients in K-ras codon-specific mutations in mouse NIH3T3 cells*" pendent de publicació en *Molecular Systems Biology*, ajudant a fer les determinacions bioquímiques i enzimàtiques de fibroblasts de ratolí normals i amb una mutació puntual en el codó 12 i 13 de l'oncogèn *KRas*. El paper utilitza les dades experimentals per tal de completar el model predictiu i donar resultats de flux que defineixen els perfils metabòlics dels mutants estudiats. La revista *Molecular Systems Biology* té un índex d'impacte de **12,243**.

Per últim, durant el desenvolupament d'aquesta Tesi Doctoral s'ha ajudat a l'escriptura d'un *review* de metabolòmica amb títol "*Metabolic network adaptations in cancer as targets for novel therapies*" que està essent revisat per la revista *Biochemical Society Transactions* amb un índex d'impacte **2,979**.

A continuació s'adjunta 1 de les 3 publicacions esmentades:

⁽¹⁾ Vizan, P., Alcarraz-Vizán, G., Diaz-Moralli, S., Rodriguez-Prados, J.C., Zanuy, M., Centelles, J.J., Jauregui, O., and Cascante, M. (2007). Quantification of Intracellular Phosphorylated Carbohydrates in HT29 Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*.

Quantification of Intracellular Phosphorylated Carbohydrates in HT29 Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Using Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

Pedro Vizán,[†] Gema Alcarraz-Vizán,[†] Santiago Díaz-Moralli,[†] Juan Carlos Rodríguez-Prados,[†] Míriam Zanuy,[†] Josep J. Centelles,[†] Olga Jáuregui,[‡] and Marta Cascante^{*,†}

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology, Av Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain, and Scientific and Technical Services, University of Barcelona, Josep Samitier 1-5, 08028 Barcelona, Spain

The quantitative understanding of the role of sugar phosphates in regulating tumor energetic metabolism at the proteomic and genomic level is a prerequisite for an efficient rational design in combined drug chemotherapy. Therefore, it is necessary to determine accurately the concentration of the main sugar phosphate pools at the lower concentrations present in the often-limited volume of tumor cell samples. Taking as an example the human adenocarcinoma cell line HT29, we here report a fast and reliable quantitative method based on the use of liquid nitrogen, a weak acid extraction, and liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry to quantify simultaneously the intracellular concentration of sugar phosphate pools. The method was set up using standard addition curves. Thus, it is possible to identify and quantify hexose phosphate, pentose phosphate, and triose phosphate pools up to 0.02–0.10 ng· μ L⁻¹, depending on the analyte. The method developed was here used for the quantitative study of changes in phosphorylated carbohydrates of central carbon metabolism when high or low glucose concentration conditions are induced in vitro in the HT29 human colon adenocarcinoma cell line.

In the last fifteen years, functional genomic approaches (genomics, proteomics, and metabolomics) have become increasingly important in life sciences. The aim of these techniques is to elucidate the biological functioning of a cell or organism. In this regard, the concept of systems biology and the prospect of integrating transcriptomic, proteomic, and metabolomic data opens up exciting possibilities and work is evolving at a rapid pace.^{1–3}

Metabolomics is the potential study of all metabolites in a cell or biological system under a given set of conditions and provides an overview of the metabolic status and overall biochemical events associated with a cellular or biological system.⁴ Since metabolites are a product of gene expression and key components of the phenotype, the key issue in metabolomics is the translations of differences in metabolomes in phenotypic differences, providing a direct link between genome and phenome.⁵ Developments in informatics, flux analysis, and biochemical modeling are adding new dimensions to the field of metabolomics,^{6–10} one which is of direct relevance not only to fundamental biological studies but also to areas such as biomedicine and biotechnology.^{11–14}

The development of sensitive, quantitative, and robust^{15,16} analytical methods in the field of metabolomics is an important challenge. The wide range of compound classes and large range of metabolite concentrations do not permit the simultaneous determination of all the metabolites present in a sample,¹⁵ but great efforts have been performed, especially by the use of mass

- (3) Aderem, A. *Cell* 2005, 121, 511–513.
- (4) Fiehn, O. *Plant Mol. Biol.* 2002, 48, 155–171.
- (5) Cascante, M.; Boros, L. G.; Comin-Anduix, B.; de Atauri, P.; Centelles, J. J.; Lee, P. W. *Nat. Biotechnol.* 2002, 20, 243–249.
- (6) de Atauri, P.; Orrell, D.; Ramsey, S.; Bolouri, H. *Syst. Biol. (Stevenage)* 2004, 1, 28–40.
- (7) Selivanov, V. A.; Marin, S.; Lee, P. W.; Cascante, M. *Bioinformatics* 2006.
- (8) Lee, W. N. *Metabolomics* 2006, 2, 31–39.
- (9) Ishii, N.; Soga, T.; Nishioka, T.; Tomita, M. *Metabolomics* 2005, 1, 29–37.
- (10) Antoniewicz, M. R.; Stephanopoulos, G.; Kelleher, J. K. *Metabolomics* 2006, 2, 41–52.
- (11) van der Greef, J.; Hankemeier, T.; McBurney, R. N. *Pharmacogenomics* 2006, 7, 1087–1094.
- (12) Wang, M.; Lamers, R. J.; Korthout, H. A.; van Nesselrooij, J. H.; Witkamp, R. F.; van der Heijden, R.; Voshol, P. J.; Havekes, L. M.; Verpoorte, R.; van der Greef, J. *Phytother. Res.* 2005, 19, 173–182.
- (13) Oksman-Caldentey, K. M.; Saito, K. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005, 16, 174–179.
- (14) Trujillo, E.; Davis, C.; Milner, J. J. *Am. Diet. Assoc.* 2006, 106, 403–413.
- (15) Koek, M. M.; Muilwijk, B.; van der Werf, M. J.; Hankemeier, T. *Anal. Chem.* 2006, 78, 1272–1281.
- (16) van der Werf, M. J.; Jellema, R. H.; Hankemeier, T. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 32, 234–252.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: 34-934021593. Fax: 34-934021219. E-mail: martacascante@ub.edu.

[†] Department of Biochemistry and Molecular Biology.

[‡] Scientific and Technical Services.

(1) Kitano, H., Ed. *Foundations of Systems Biology*; The MIT Press: Cambridge, MA, 2001.

(2) Westerhoff, H. V.; Palsson, B. O. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 1249–1252.

spectrometry (MS) for high-throughput metabolite measurements^{17–19} because it permits the quantification of very similar substances in a fast and precise way.

Concretely, the simultaneous quantification of sugar phosphate pools is still difficult because of their low concentration, polarity, structural likeness, instability, and noncharacteristic UV absorption spectra.²⁰ Traditionally, enzymatic determinations were used to measure phosphorylated intermediates,²¹ but this approach requires laborious extract preparation, a large volume of sample for quantification, and does not allow the determination of more than a few metabolites simultaneously. In addition, the fast quenching of intracellular metabolism is a critical point for intracellular metabolite concentration due to the extremely high turnover and fine regulation control of central carbon metabolic pathways. Strategies based on rapid changes in pH and temperature are generally used for a rapid inactivation of metabolism. Thus, protocols based on cold methanol have been widely used in microorganisms and yeast; meanwhile, the use of liquid nitrogen for rapid freezing is more usual in plant and animal tissues.¹⁸ On the other hand, acidic procedures have been described for quenching as well as for extraction of sugar phosphates in eukaryotic cells,^{22,23} but these procedures are not always suitable because low pH requires neutralization or scavenging of undesirable species that may interfere with the detection method. The extraction protocol described in this study is especially designed to avoid the main problems reported above. Therefore, liquid nitrogen is here used for rapid freezing of in vitro cell cultures, which is a suitable way of stopping cell metabolism; at the same time, a straightforward extraction with a weak acid is developed in order to overcome the disadvantages caused by very low pH in cell extracts.

Substantial improvement on traditional enzymatic methods based on high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry has been developed, although these methods still present several limitations: Huck and colleagues²⁴ and Wamelink and colleagues²⁵ analyzed sugar phosphates in blood spots by liquid chromatography (LC)–tandem mass spectrometry (MS/MS) using an ion pair-loaded C₁₈ HPLC column with octylammonium acetate at pH 7.5 as mobile phase. Several coelutions were observed, and this type of eluent has the disadvantage of clearly interfering in subsequent LC–MS analysis. Another way of analyzing sugar phosphates is through the use of the β -cyclodextrin bonded stationary phase,^{20,26} where the main advantage is the compatibility of the LC mobile phase with the

mass spectrometer. A porous graphitic carbon column has also been tested for the analysis of sugar phosphates, the main benefit being that it can even separate isomers such as G6P and F6P; however, a clear disadvantage is the lengthy (300 min) cleaning procedure required for the column after 10 sample injections, as this prevents a large number of samples from being analyzed in a reasonable time. Anion-exchange high-performance liquid chromatography has also been applied to the analysis of sugar phosphates,^{27,28} but its incompatibility with an MS system renders the method not applicable in our case. Thus, despite the above-mentioned attempts, none of the published analytical methods for sugar phosphate quantification covers the full range of metabolite concentrations present in human cell lines and tissues. In order to overcome these limitations, this paper describes a method of extraction and analysis of sugar phosphate intermediates of glycolysis and the pentose phosphate pathway in the HT29 human colon adenocarcinoma cell line. Using a β -cyclodextrin column, this method reduces the chromatographic sample running time with reasonable peak separation and also improves the detection limits reported for sugar phosphates, thus permitting the detection of concentrations up to 20–100 ng·mL⁻¹, depending on the phosphate metabolite. This quantification under various relevant conditions would allow the role of sugar phosphates to be studied not only as intermediate metabolites in energetic metabolism but also as signaling molecules in gene transcription that trigger metabolic adaptation to different cellular processes such as proliferation or apoptosis.^{29–31}

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. D-Fructose 1,6-bisphosphate sodium salt (F1,6P₂), D-(+)-glucose 6-phosphate (G6P), D-fructose 6-phosphate disodium salt (F6P), D-ribose 5-phosphate (R5P), D-erythrose 4-phosphate (E4P), D/L-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP), dihydroxyacetone phosphate dilithium salt (DHAP), and phospho(enol)pyruvic acid mono(cyclohexylammonium) salt (PEP) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). D(-)-Ribose was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). D-Xylulose 5-phosphate (X5P) was obtained by chemical synthesis as previously described.³² Acetic acid, ammonium acetate, and acetonitrile were purchased from Panreac (Badalona, Spain).

Cell Culture Conditions. HT29 human colon adenocarcinoma cells (obtained from the American Type Culture Collection) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), 25 mmol·L⁻¹ D(+)-glucose, 4 mmol·L⁻¹ L-glutamine supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (PAA Laboratories, Pasching, Austria), and antibiotics: 100 units·mL⁻¹ penicillin and 100 μ g·mL⁻¹ streptomycin (Invitrogen, Paisley, UK) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Cell cultures were started in 150-cm² Petri dishes with the same number of cells. When they reached 80–90% of confluence, the medium was quickly removed and the dishes were frozen immediately in liquid nitrogen. For high glucose (HG) and

- (17) Dunn, W. B.; Bailey, N. J.; Johnson, H. E. *Analyst* **2005**, *130*, 606–625.
(18) Villas-Boas, S. G.; Mas, S.; Akesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 613–646.
(19) Tomita, M.; Nishioka, T., Eds. *Metabolomics: The Frontiers of Systems Biology*; Springer-Verlag: Tokyo, 2005.
(20) Buchholz, A.; Takors, R.; Wandrey, C. *Anal. Biochem.* **2001**, *295*, 129–137.
(21) Bergmeyer, H. U., Ed. *Methods of Enzymatic Analysis*; Verlag Chemie: Weinheim, 1985.
(22) Fernandez-Novell, J. M.; Arino, J.; Vilaro, S.; Bellido, D.; Guinovart, J. J. *Biochem. J.* **1992**, *288* (Pt 2), 497–501.
(23) Aiston, S.; Andersen, B.; Agius, L. *Diabetes* **2003**, *52*, 1333–1339.
(24) Huck, J. H.; Struys, E. A.; Verhoeven, N. M.; Jakobs, C.; van der Knaap, M. S. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1375–1380.
(25) Wamelink, M. M. C.; Struys, E. A.; Huck, J. H. J.; Roos, B.; van der Knaap, M. S.; Jakobs, C.; Verhoeven, N. M. *J. Chromatogr., B* **2005**, *823*, 18–25.
(26) Feurle, J.; Jomaa, H.; Wilhelm, M.; Gutsche, B.; Herderich, M. *J. Chromatogr., A* **1998**, *803*, 111–119.

- (27) Hull, S. R.; Montgomery, R. *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 49–54.
(28) Swezey, R. R. *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* **1995**, *669*, 171–176.
(29) Girard, J.; Ferre, P.; Foufelle, F. *Annu. Rev. Nutr.* **1997**, *17*, 325–352.
(30) Kabashima, T.; Kawaguchi, T.; Wadzinski, B. E.; Uyeda, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 5107–5112.
(31) Uyeda, K.; Repa, J. J. *Cell Metab.* **2006**, *4*, 107–110.
(32) Zimmermann, F. T.; Schneider, A.; Schorken, U.; Sprenger, G. A.; Fessner, W.-D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1643–1646.

Table 1. Molecular Weight, Retention Time, and MS/MS Features for Sugar Phosphates

metabolite	molecular weight	retention time (min)	MRM transition	DP (V)	CE (V)
Fructose-1,6-bisphosphate (F1,6P ₂)	340	2.80	339/97	-30	-25
HexoseP (G6P, F6P)	260	2.39	259/97	-30	-20
PentoseP (R5P, X5P)	230	2.56	229/97	-30	-20
Erythrose-4P (E4P)	200	2.41	199/97	-30	-20
TrioseP (DHAP, G3P)	170	2.49	169/97	-30	-20
Phosphoenol pyruvate (PEP)	170	3.05	167/97	-30	-20
Ribose	150	2.88	149/149	-20	-5

low glucose (LG) conditions, medium was removed when the cell culture reached 70% of confluence and fresh DMEM, supplemented as described above, was added containing 30 mmol·L⁻¹ or 5 mmol·L⁻¹ D(+)-glucose, respectively. After 6 h of incubation, medium was quickly removed and the dishes were frozen immediately in liquid nitrogen. All dishes with attached HT29 cells were frozen at -80 °C until further preparation and protein determination.

Cell Extraction for Sugar Phosphate Analysis. The 150-cm² Petri dish cell content at 80–90% of confluence was scraped, adding 3 × 1 mL of acetic acid 100 mmol·L⁻¹ at 4 °C. From the cell homogenate, 50 μL was split for protein determination by the BCA protein assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL); protein concentration of the extract should be up to 1 mg·mL⁻¹ to enable measurement of all metabolites tested up to the limit of quantification (LOQ), except for PEP, which would require 6 mg·mL⁻¹ due to its low concentration in the cell. Cell extract was then centrifuged at 4 °C, 0.4 rcf for 10 min. The pellet was discarded, and supernatant was filtered through 0.22-μm filter and frozen at -20 °C until injection. Calibrators (F1,6P₂, G6P, F6P, R5P, X5P, E4P, GAP, DHAP, PEP) diluted in extraction buffer were included in each batch of samples at the beginning of the cell extraction in increasing concentrations. The standard additions consisted of the following: 0.5, 1, 2, 3, 5, and 8 ng·μL⁻¹ F1,6P₂; 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5, and 4 ng·μL⁻¹ G6P and F6P; 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.25, and 2 ng·μL⁻¹ R5P, X5P, GAP, and DHAP; and 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1, and 1.6 ng·μL⁻¹ E4P and PEP. A mix of calibrators in increasing concentrations (the same used for addition curves) diluted in ammonium acetate 10 mmol·L⁻¹ pH 4.0 was also prepared and frozen at -20 °C until injection. Just before the extraction, 100 ng·μL⁻¹ D-ribose was added to each sample as internal standard.

HPLC-MS/MS Conditions. Chromatography was performed using an Agilent 1100 (Waldbronn, Germany) quaternary pump equipped with a refrigerated autosampler. A Nucleodex β-OH HPLC column, 200 × 4 mm i.d. (Panreac) with a binary gradient at a flow rate of 0.75 mL·min⁻¹ was used. Solvent A consisted of ammonium acetate 10 mmol·L⁻¹ pH 4.0. Solvent B consisted of acetonitrile. Before reaching the mass spectrometer, the flow was split (1:3). To reduce the residual matrix effect reaching the mass spectrometer, a divert valve (Valco, Houston, TX) drained off the LC eluent during the time that interferences were detected in order to avoid contamination of the mass spectrometer.

MS and MS/MS experiments were carried out on an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (PE Sciex, Concord, ON, Canada). All analyses were performed using the Turbo Ionspray source in negative ion mode with the following settings: capillary voltage -3500 V, nebulizer gas (N₂) 10 (arbitrary units), curtain

gas (N₂) 12 (arbitrary units), collision gas (N₂) 4 (arbitrary units), declustering potential (DP) -30 or -20 V (depending on the analyte; see Table 1), focusing potential -200 V, entrance potential -10 V, collision energy (CE) between -5 and -25 V (depending on the analyte, see Table 1); drying gas (N₂) was heated to 300 °C and introduced at a flow rate of 5000 cm³·min⁻¹. Table 1 provides a summary of MS/MS features. The data were acquired and processed using the Analyst 1.4 software package.

Prior to use, the instrument was checked to ensure it met the acceptance specifications defined by the manufacturer. The triple quadrupole mass spectrometer was calibrated with the Turbo Ionspray using a test mixture of poly(propylene glycol) obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA). The mass spectrometer was calibrated so that mass accuracy specifications and sensitivity were achieved over the entire mass range.

The MS and MS/MS parameters were optimized in infusion experiments. Capillary voltage, focusing potential, entrance potential, DP, and CE were optimized by infusing individual standard solutions (10 ng·μL⁻¹) in the LC mobile phase (A/B, 95:5) at a constant flow rate of 5 μL·min⁻¹ into the mass spectrometer using a model 11 syringe pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Nebulizer, curtain, collision, and auxiliary gas (N₂) flow rates, as well as temperature of the auxiliary gas were optimized in flow injection analysis experiments after the injection of 5 μL of standard solution of sugar phosphates (10 ng·μL⁻¹) into the LC-MS/MS system. The optimum values were those that gave maximum signal-to-noise ratios for all the multiple monitoring reaction (MRM) transitions.

Full-scan data acquisition was performed by scanning from *m/z* 100 to 600 in profile mode and using a cycle time of 2 s with a step size of 0.1 amu and a pause between each scan of 5 ms. In product ion scan experiments, MS/MS product ions were produced by collision-activated dissociation of selected precursor ions in the collision cell of the triple quadrupole mass spectrometer and analyzed using the second analyzer of the instrument. Thus, the MRM transitions (Q1/Q3) for the different sugar phosphates were as follows: F1,6P₂, 339/97; G6P,F6P, 259/97; R5P,X5P, 229/97; E4P, 199/97; DHAP,GAP, 169/97; PEP, 167/79; ribose, 149/149; the dwell time was 200 ms per transition. G6P and F6P (denominated HexoseP) coeluted and presented the same MRM transition. The same pattern was observed for R5P and X5P (PentoseP) and for DHAP and GAP (TrioseP).

RESULTS AND DISCUSSION

Adjustments for the Identification and Confirmation of Sugar Phosphates in HT29 Cell Extraction. Because of the high specificity of the MS/MS method, a complete chromato-

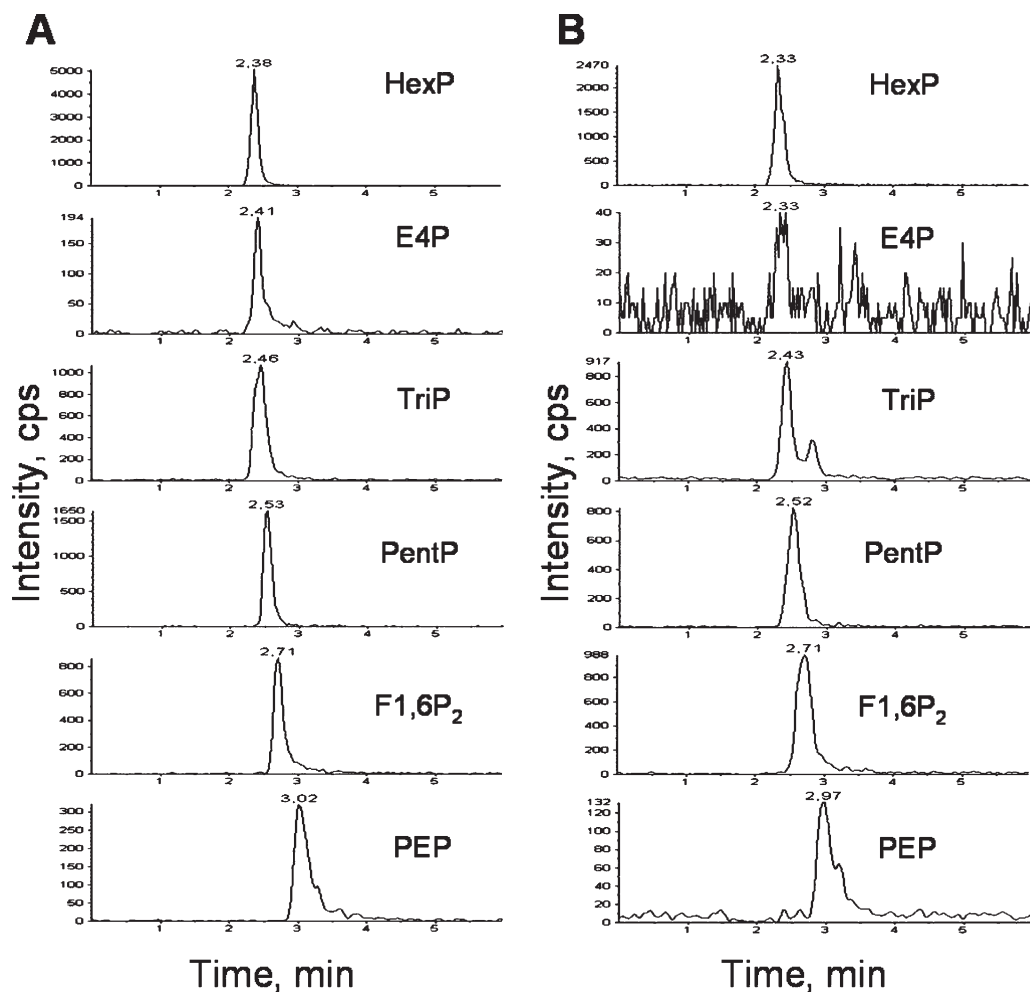


Figure 1. MRM trace chromatograms obtained from (A) standard solution ($3 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for F1,6P2 and HexP, $1.5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for PentP and TriP, and $0.6 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for E4P and PEP); and (B) HT29 extract sample prepared as described in the Experimental Section.

graphic separation of analytes and matrix is not essential. However, to achieve high-quality analytical data when the level of analytes is low, as occurs in biological samples, a sufficient retention of the analyte is preferred to minimize suppression and other matrix effects. In this way, several gradients and proportions of solvent A (ammonium acetate)/solvent B (acetonitrile) were tested. In order to improve metabolite separation in the HPLC column and reduce analysis time per injection, a broad range of solvent A (6 min to 100%) was selected, before introducing a rapidly increasing gradient of solvent B (3 min to 100%) in order to prepare the column for the next injection. Chromatographic effects of pH (from 3.3 to 4.9) and solvent A concentration (from 2.5 to 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) were also studied. Whereas pH did not cause significant differences in the separation of the metabolites, ammonium acetate concentration did affect the chromatographic behavior of peaks: increasing concentrations of solvent A produced better peak shapes and a shift in retention times. As a result, time of analysis decreased to 9 min. However, concentrations higher than 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ produced nonrecommendarable coelution of all sugar phosphates.

To identify the internal sugar phosphates in the HT29 cell line, several extraction procedures were tested using different proportions of ethanol/water, chlorhydric acid, perchloric acid, and acetic acid. Ethanolic extractions showed abnormal peak shapes and high noise, even when lyophilization of samples and redissolution

in ammonium acetate were performed before injection. Furthermore, strong acid extractions were discarded because they caused column damage. Preliminary examination of the MRM trace chromatogram from cell extract using acetic acid 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ revealed the presence of many sugar phosphates of interest compared with a calibrator mix (Figure 1).

Glucose and erythrose were tested as internal standards, but elution in the front rejected their use in order to avoid matrix suppression; ribose was chosen as the internal standard because of its similar chromatographic behavior to sugar phosphates (Table 1).

Method Characteristics. In order to set up a reliable and quantifiable method from HT29 cell extraction, quality parameters were determined for each metabolite.

Linearity. Linearity was tested for each metabolite using calibrators. The peak areas corrected by internal standard were plotted against the corresponding concentrations to obtain the regression curve. Correlation coefficients were in all cases $r^2 > 0.99$ and residual analyses were performed, proper values being considered as those in an accuracy range of 80–120% (Table 2). Thus, linearity range was (in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.5–8 for F1,6P2 and HexoseP, 0.25–4 for PentoseP and TrioseP, and 0.1–1.6 for E4P and PEP.

Sensitivity. The limit of detection (LOD) and LOQ were calculated by repeated injections of diluted solutions of each sugar

Table 2. Quality Parameters of LC–MS/MS Method for Each Metabolite^a

sugar phosphate	linearity range (ng·μL ⁻¹)	LOD (ng·μL ⁻¹)	LOQ (ng·μL ⁻¹)	run-to-run precision				day-to-day precision			
				nmol·mg _{prot} ⁻¹	CV (%)	rt (min)	CV (%)	nmol·mg _{prot} ⁻¹	CV (%)	rt (min)	CV (%)
F1,6P ₂	0.5–8	0.08	0.30	2.75	3.9	2.83	3.1	2.77	5.9	2.81	3.2
HexoseP (G6P, F6P)	0.5–8	0.02	0.07	2.08	3.6	2.40	3.9	2.14	4.3	2.39	3.6
PentoseP (R5P, X5P)	0.25–4	0.03	0.15	1.01	3.6	2.58	3.9	1.03	5.3	2.56	3.4
E4P	0.1–1.6	0.15	0.50	0.38	11.2	2.43	3.8	0.41	12.6	2.41	3.5
TrioseP (DHAP, G3P)	0.25–4	0.10	0.35	1.36	2.2	2.50	3.6	1.39	5.2	2.49	3.6
PEP	0.1–1.6	0.07	0.25	0.70	2.9	3.06	3.0	0.72	5.0	3.05	3.2

^a *n* = 10 for run-to-run precision and *n* = 30 for day-to-day precision.

phosphate. The LOD was estimated as the concentration of metabolite that generated a peak with an area at least 3 times higher than the baseline noise. LOQ was calculated at a signal-to-noise ratio of 10 for each compound (Table 2). This method offers better detection limits than others described previously for sugar phosphates.^{20,25} Thus, LOD was (in ng·μL⁻¹) 0.08 for F1,6P₂, 0.02 for HexoseP, 0.03 for PentoseP, 0.15 for E4P, and 0.1 for TrioseP and 0.07 for PEP; and LOQ was (in ng·μL⁻¹) 0.30 for F1,6P₂, 0.07 for HexoseP, 0.15 for PentoseP, 0.50 for E4P, 0.35 for TrioseP, and 0.25 for PEP.

Precision. Run-to-run and day-to-day precision (10 injections/day on three independent days) was estimated from one single sample for concentration (calculated from standard addition curves as described below) and retention time. Solvent blanks did not contain any of the target analytes, indicating no carryover effect between LC–MS/MS runs. Results are depicted in Table 2 for each sugar phosphate. The method developed showed a good precision (CV between 2.2 and 3.9%) except for E4P, since this metabolite showed worse peak shape and its LOD was considerably higher than other sugar phosphates studied.

Quantification of Sugar Phosphates in the HT29 Cell Line.

Sugar phosphates in cell extracts were identified by retention time and characteristic MRM transition. Quantification was accomplished via the MRM transition by the standard addition method. Standard solution of all analytes was prepared, and cell extracts were spiked with increasing amounts of this standard mix. Linear regression plots of the relationship analyte peak area/IS area versus analyte concentration/IS concentration were obtained. Since cell extract always contains baseline levels of sugar phosphates, both the quotient of areas and concentrations were corrected by the protein content of each sample or standard calculated by BCA protein assay (see Experimental Section). For each curve, appropriate weighting and residual analyses were performed in order to establish a calibration curve showing accuracy of 80–120% for each sugar phosphate.

Three samples for each culture condition were used to determine the concentration of identified sugar phosphates. Baseline sugar phosphate concentrations obtained under routine culture conditions (Table 3, first column) were compared with other reported values obtained with different methods and found to be in accordance with them.^{23,33–35} As can be seen, E4P was detectable but not quantifiable in HT29 cells under routine culture

Table 3. Calculated Content of Sugar Phosphates under Routine (25 mmol·L⁻¹), High (30 mmol·L⁻¹), and Low (5 mmol·L⁻¹) Glucose Concentration Conditions (*n* = 3 for Each Condition)

sugar phosphate	normal culture condition		high glucose concn		low glucose concn	
	nmol·mg _{prot} ⁻¹	SD	nmol·mg _{prot} ⁻¹	SD	nmol·mg _{prot} ⁻¹	SD
F1,6P ₂	2.34	0.14	2.30	0.14	2.03	0.21
HexoseP (G6P, F6P)	1.74	0.04	1.53	0.13	1.43	0.21
PentoseP (R5P, X5P)	0.99	0.05	0.87	0.08	1.55	0.09
E4P	nq		nq		nq	
TrioseP (DHAP, G3P)	1.39	0.10	1.11	0.16	1.19	0.23
PEP	0.23	0.03	0.20	0.02	0.30	0.10

conditions. The HexoseP pool was higher than the PentoseP or TrioseP pools, but the F1,6P₂ concentration was the highest.

Two more cell conditions were performed and quantified in order to study the reliability of the method and analyze internal metabolite redistribution under high (30 mmol·L⁻¹) or low (5 mmol·L⁻¹) glucose concentration conditions. The data are summarized in Table 3 (second and third columns). Since glucose concentration (25 mmol·L⁻¹) of routine culture conditions for HT29 is similar to that considered as high glucose concentration, we did not observe significant changes between normal culture conditions and the high glucose concentration condition, which demonstrates the reliability and precision of the quantification method when sample treatment is similar. Interestingly, high glucose concentration condition did show a significant decrease in the PentoseP pool with respect to low glucose concentration condition. In this regard, the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, the enzyme that catalyzes the first step of the oxidative pathway of the pentose phosphate pathway, has been reported to be decreased under hyperglycemic conditions.^{36,37} Worthy of note, the remaining sugar phosphates measured for low glucose concentration conditions, which are directly linked to glycolysis, showed no differences when the glucose concentration was decreased drastically with respect to normal culture

(35) Marin, S.; Lee, W. N.; Bassilian, S.; Lim, S.; Boros, L. G.; Centelles, J. J.; Fernandez-Novell, J. M.; Guinovart, J. J.; Cascante, M. *Biochem J.* **2004**, *381*, 287–294.

(36) Diaz-Flores, M.; Ibanez-Hernandez, M. A.; Galvan, R. E.; Gutierrez, M.; Duran-Reyes, G.; Medina-Navarro, R.; Pascoe-Lira, D.; Ortega-Camarillo, C.; Vilar-Rojas, C.; Cruz, M.; Baiza-Gutman, L. A. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2601–2607.

(37) Zhang, Z.; Apse, K.; Pang, J.; Stanton, R. C. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40042–40047.

(33) Albe, K. R.; Butler, M. H.; Wright, B. E. *J. Theor. Biol.* **1990**, *143*, 163–195.

(34) Bosca, L.; Corredor, C. *Trends Biochem. Sci.* **1984**, *9*, 372–373.

conditions, indicating that regulation of glycolysis is a critical point in maintaining the robustness of the tumor-associated metabolic pattern.

CONCLUSIONS

This study has shown that an LC–MS/MS method could be successfully applied to the quantification of the main intracellular sugar phosphates in the HT29 human adenocarcinoma cell line. The results demonstrated that metabolites (F1,6P₂, G6P, F6P, X5P, R5P, E4P, GAP, DHAP, PEP) could still be analyzed from an intracellular detection limit of 20–100 ng·mL⁻¹, depending on the analyte. As sugar phosphates in eukaryotic cells can act as signaling molecules inducing gene transcription, as well as intermediates in energetic metabolism, the high sensitivity of this method is especially relevant for the study of sugar phosphate behavior in cancer,³⁸ diabetes, and other multifactor diseases.

The combination of a simple and fast extraction procedure and the LC–MS/MS method reported here enables analysis of sugar phosphate pools at lower concentrations and more rapidly than do previously described methods. The relative standard deviation of this method is below 6% for all tested metabolites, except for E4P, which is less than 13%. A comparison with previous results in the literature confirmed the concentration determined by LC–MS/MS, thereby demonstrating the capability of the method to

simultaneously identify and quantify sugar phosphates in biological samples.

This methodology therefore represents a fast and reliable tool for the parallel quantification of hexose, pentose, and triose phosphate pools in eukaryotic cells. This could lead to new modeling approaches based on realistic in vivo concentration measurements of the most important reactants in the central glucose metabolism. Moreover, the intracellular metabolite concentration data may permit the understanding of many physiological processes, and their analysis after different disease conditions may enable metabolic therapeutic targets to be identified. Finally, these experimental data could be of general interest in terms of the role of sugar phosphates as molecules controlling the expression of key genes in glucose and lipid metabolism.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by Grants SAF2005-01626, RTICC (RD06/0020/0046) and personal financial support (FPU program) from the Spanish government and has received financial support from the government of Catalonia 2005SGR00204 and ITT program of the Work Community of Pyrenees (ITT2005-7/10.006). We are also grateful to Robin Rycroft of the Language Service for valuable assistance in the preparation of the manuscript. P.V. and G.A.-V. contributed equally to this work.

Received for review January 29, 2007. Accepted April 20, 2007.

AC070170V

(38) Ramos-Montoya, A.; Lee, W. N.; Bassilian, S.; Lim, S.; Trebukhina, R. V.; Kazhyna, M. V.; Ciudad, C. J.; Noe, V.; Centelles, J. J.; Cascante, M. *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 2733–41.