



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer
CSIC-Universidad de Salamanca

Relación entre la vía de transducción de señales ERK5 y la vía glutaminolítica en cáncer

TESIS DOCTORAL

YOLANDA MARÍA GUILLÉN PÉREZ

Dirigida por:

Dra. D.^a AZUCENA ESPARÍS OGANDO

Salamanca, noviembre 2021



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**



Dña. Azucena Esparís Ogando, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca e Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca,

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Relación entre la vía de transducción de señales ERK5 y la vía glutaminolítica en cáncer” presentada por la Licenciada en Bioquímica y Biología Dña. Yolanda María Guillén Pérez, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca e Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, centro mixto CSIC-Universidad de Salamanca, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca a 20 de octubre de 2021.

*Navegamos por la vida buscando respuestas
que nos permitan avanzar en el viaje,
en la esperanza de contribuir como tantos otros
que coinciden en la utopía final.*

Yolanda María Guillén Pérez

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS	v
INTRODUCCIÓN	1
1. PROTEÍNAS QUINASAS	3
1.1. Antecedentes y clasificación	4
1.2. Estructura de las proteínas quinasas.....	7
1.3. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinases-MAPK</i>)	9
1.3.1. ERK1/2.....	11
1.3.2. <i>Extra Regulated Kinase 5 (ERK5)</i>	15
Descubrimiento	15
Características moleculares.....	15
Estructuras de ERK5	17
Dominios funcionales de ERK5	19
Activación y regulación de ERK5	20
La fosforilación de ERK5 implica su localización subcelular	23
Expresión de ERK5 en tejidos y su implicación en procesos biológicos.....	26
ERK5 y tumorigénesis	29
ERK5 en el cáncer de páncreas	32
ERK5 en el cáncer de mama.....	34
ERK5 en el cáncer de pulmón	36
Papel de ERK5 en el metabolismo y en la mitocondria...	36
Inhibidores de MEK5 y ERK5	38
2. MITOCONDRIA. VISIÓN GENERAL	41
2.1. Metabolismo energético.....	43
3. LA GLUCÓLISIS Y EL EFECTO WARBURG	46
4. METABOLISMO DE LA GLUTAMINA	50
4.1. Glutamina en cáncer	51

5. GLUTAMINASA Y LA VÍA DE LA GLUTAMINOLISIS	52
5.1. Genes y transcritos de la glutaminasa	55
5.2. Estructura y características moleculares de GLS (KGA y GAC)...	58
5.3. Expresión de GLS (KGA/GAC) en tejidos normales.....	60
5.4. GLS (KGA/GAC) en la tumorigénesis	62
5.5. Inhibidores de GLS (KGA/GAC)	64
6. REPROGRAMACIÓN METABÓLICA EN EL CÁNCER DE PÁN- CREAS	66
 DIVULGACIÓN	 69
 BIBLIOGRAFÍA	 73
 FINANCIACIÓN	 93
 AGRADECIMIENTOS	 97

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACG	Su nombre deriva de PK <u>A</u> , PK <u>C</u> y PK <u>G</u>
ACLY	ATP-citrato liasa
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora 1 (<i>activating protein-1</i>)
APC/C-Cdh1	Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma (<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome</i>)
aPK	<i>atypical protein kinase</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BMK1	<i>Big MAPK-1</i>
c-AMP CREB	Elementos de respuesta a c-AMP (<i>c-AMP responde element binding</i>)
CAMK	<i>Calmodulin dependent protein kinase</i>
CCDS	<i>Consensus Coding Sequence Set</i>
CD	Dominio común de acoplamiento (<i>common docking domain</i>)
CDKi	Quinasas inhibitorias de ciclinas (<i>cyclin dependent kinase inhibitor</i>)
CDS	Secuencia codificante
CHX	Cicloheximida
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
CK2	<i>Casein kinase 2</i>
CMGC	Su nombre deriva de <u>C</u> DK, <u>M</u> APK, <u>G</u> SK y <u>C</u> DK-like Kinase
cov	Cobertura del alineamiento
CPT	Carnitina palmitoiltransferasa
CRISPR	<i>Clustered regulatory interspace short palindromic repeats</i>
CT-1	Cardiotrofina-1
CTLs	Linfocitos T citotóxicos (<i>Cytotoxic T-cells</i>)

DAPH	4,5-dianilinophthalimide
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DUSPs	Fosfatasas de doble especificidad (<i>dual specificity phosphatases</i>)
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	<i>Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
ePK	<i>eukaryotic protein kinase</i>
ERK1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (<i>Extracellular signal-regulated kinase-1/2</i>)
ERK5	<i>Extracellular signal-related kinase 5; MAPK7</i>
ETC	Cadena transportadora de electrones (<i>electron transport chain</i>)
ETS	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FADH₂	Flavina adenina dinucleótido reducido
FAK	Proteína quinasa de adhesión focal (<i>Focal Adhesion Kinase</i>)
FASN	Sintasa de ácidos grasos
FBS	Suero bovino fetal (<i>fetal bovine serum</i>)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (<i>fibroblast growth factor</i>)
FPKM_s	<i>Fragments Per Kilobase of exon per Million reads</i>
GAB	Isoenzima glutaminasa B
Gab1	<i>Grb2-associated binder 1</i>
GAC	Isoenzima glutaminasa C
GAM	Isoenzima glutaminasa de músculo
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)

GLS/GLS2	Genes glutaminasa
GLUD	Gen Glutamato deshidrogenasa
GOT1	Glutamato oxacelato transaminasa 1
GOT2	Glutamato oxacelato transaminasa 2
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G (<i>G protein-coupled receptors</i>)
Grb2	<i>Growth-factor-receptor-bound-2</i>
GS	Glutamina sintetasa
GSK-3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 β
GTP	Guanina trifosfato
HER2/ErB-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (<i>human epidermal growth factor receptor</i>)
HIF-1	Factor de transcripción inducible por hipoxia
iBAQ	<i>Intensity Based Absolute Quantification</i>
IF	Inmunofluorescencia
IKKα y IKKβ	<i>Inhibitor nuclear factor kappa-B kinase subunits alpha/beta</i>
JNK 1/2/3	<i>c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3</i>
KD	Dominio quinasa (<i>Kinase Domain</i>)
KGA	Isoenzima glutaminasa de tipo riñón (<i>K-type</i>)
KSR1	<i>Kinase suppressor of RAS1</i>
Lad	<i>Lck-adapter</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
LepR	Receptor de la leptina
LGA	Isoenzima glutaminasa tipo hígado
LIF	Factor de inhibición de leucemia
m-TOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)

MAPKK /MAP₂K /MEK	<i>(Meiosis-specific serine/threonine-protein kinase)</i> MAP quinasa quinasa (MAP Kinase Kinase)
MAPKKK/ MAP₃K	MAP quinasa quinasa quinasa (MAP Kinase Kinase Kinase)
MEF₂	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
MICOS	<i>Mitochondrial contact site and cristae organizing system</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NES	Señal de exportación nuclear (<i>nuclear export signal</i>)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>nerve growth factor</i>)
NLK	<i>Nemo-like kinase</i>
NLS	Señal de localización nuclear (<i>nuclear localization signal</i>)
NRG	Neuregulina (<i>neuregulin</i>)
OAA	Oxacelato
OPA	o-oftaldialdehído
ORF	Marco de lectura abierto (<i>open reading frame</i>)
OXPHOS	Fosforilación oxidativa (<i>oxidative phosphorylation</i>)
p. ej.	Por ejemplo
PAG	Glutaminasa activada por fosfato (<i>Phosphate-activated glutaminase</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>platelet derived growth factor</i>)
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDHK	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase</i>
Pi	Fosfato inorgánico
pid	Porcentaje de identidad
pLDDT	<i>Local distance difference test</i>
PLK₁	Quinasa serina/treonina polo-like kinase

PMS	<i>Phenazine methosulphate</i>
PTP-SL	Fosfatasa de tirosina [<i>striatal-enriched phosphatase (STEP)-like protein tyrosine phosphatase (PTP)</i>]
R.P.M.I	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RGC	<i>Receptor guanylyl cyclase</i>
RTK	Receptor de tirosina quinasa (<i>receptor tyrosine kinase</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
shARN	<i>short hairpin ARN</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
STE	<i>Homologs of yeast sterile</i>
TAD	Dominio de transactivación (<i>transactivation domain</i>)
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico (<i>tricarboxylic acid cycle</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TCF	Familia de factores de transcripción (<i>Ternary complex factor</i>)
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TK	<i>Tyrosine kinase</i>
TLK	<i>Tyrosine kinase-like</i>
TPM	Gen en transcritos por millón (<i>Transcripts Per Millon</i>)
Ub	Ubiquitina
UDP-GlcNac	Uridina difosfato N-acetilglucosamina
UTRs	Regiones no codificantes (<i>untranslated region</i>)
VDAC	Canales aniónicos dependientes de voltaje (<i>voltaje dependent anion channel</i>)
WB	<i>Western blot</i>

INTRODUCCIÓN

1. PROTEÍNAS QUINASAS

Las proteínas quinasas juegan un papel clave en diversas funciones celulares. En células eucariotas intervienen en la respuesta frente a estímulos externos (Hanks *et al.*, 1988). Mediante la modificación (activación) de su sustrato, desempeñan un papel esencial en vías de señalización, al transducir, amplificar e integrar señales involucradas en procesos como el ciclo celular, la apoptosis, la transcripción y el metabolismo (entre otros) (Kostich *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002).

Estas proteínas quinasas son enzimas fosfotransferasas (EC **2.7.x.x**) según la nomenclatura de las enzimas (EC, *Enzyme Commission*). Esta clasificación consta de cuatro números separados por puntos. El primer número, hace referencia a la reacción que cataliza, en este caso, el número **2** que corresponde al grupo de las transferasas. El siguiente número, el **7**, alude al subgrupo que se corresponde a la transferencia de grupos fosfatos. Las dos **x** siguientes indican que pueden pertenecer a diversos grupos. La primera **x**, se refiere a la subsubclase, que detalla que grupo funcional es el aceptor de la transferencia. La última **x** se refiere al tipo de sustrato de la reacción.

La proteínas quinasas catalizan una reacción reversible de fosforilación, donde se transfiere el fosfato en posición gamma (γ), desde el nucleótido ATP (adenosina trifosfato) o GTP (guanina trifosfato) a un grupo hidroxilo (-OH) de un residuo de serina, treonina o tirosina. Un cofactor como el catión divalente magnesio (Mg^{2+}) o el manganeso (Mn^{2+}) es necesario para que la catálisis se lleve a cabo (Adams, 2001). Este proceso actúa como un interruptor molecular, que activa o inactiva las funciones de las proteínas. La reacción es reversible y las encargadas de revertir la fosforilación, son las fosfatasas que eliminan el fosfato y de la proteína diana (Patterson *et al.*, 2013). Este proceso se muestra de una forma sencilla en la Figura 1.

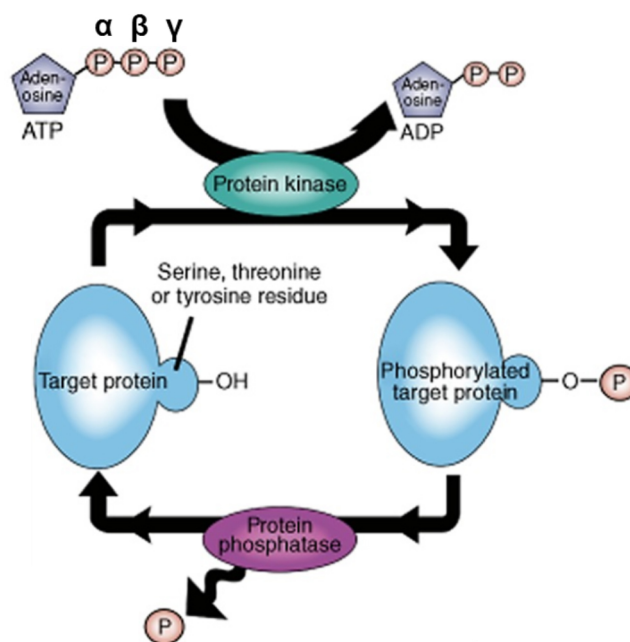


Figura 1. Reacción catalítica de fosforilación y desfosforilación de una proteína quinasa. Transferencia del fosfato en posición γ y del ATP al grupo hidroxilo de una serina, treonina o tirosina, de la proteína diana, formando un enlace covalente. El proceso de desfosforilación es llevado a cabo por las fosfatasas, que eliminan el fosfato en posición γ y de la proteína diana. Figura adaptada de (Patterson *et al.*, 2014).

1.1. Antecedentes y clasificación

Manning y colaboradores (2002), ampliaron los estudios existentes de las proteínas quinasa en eucariotas (ePK, *eukaryotic protein kinase*), gracias a la secuenciación del genoma humano. Identificaron 518 genes quinasa humanas no redundantes (denominado *kinoma*), esto supone el 1,7 % de todos los genes humanos. Descubrieron 71 genes, 106 pseudogenes (son genes no funcionales que poseen secuencias similares a los genes quinasa) y 56 genes donde se ampliaron o corrigieron las secuencias existentes. Para ello, emplearon genotecas públicas y privadas con cADNs y ETS (*Expressed Sequence Tag*).

El criterio que siguieron para la clasificación de las proteínas quinasa fue en base al dominio catalítico de las proteínas quinasa, caracterizado por Hanks y colaboradores (1988). De los 518 genes, 478 compartían un dominio quinasa eucariota conservado de 250 a 300 aminoácidos. Los restantes genes, un número de 40, presentaron actividad quinasa pero carecían de la secuencia característica de los dominios quinasa eucariotas, denominados aPK (*atypical protein kinase*).

Las proteínas quinasas en eucariotas, se clasificaron en ocho grupos, basado en la similitud de la secuencia dentro del dominio quinasa (Figura 2): **TK** (*tyrosine kinase*, 32 miembros), **TLK** (*tyrosine kinase-like*, 43 miembros), **STE** (*homologs of yeast sterile*, 47 miembros), **CK1** (*casein kinase 1*, 12 miembros), **ACG** (su nombre deriva de PKA, PKC y PKG, 63 miembros), **CAMK** (*calmodulin dependent protein kinase*, 76 miembros), **CMGC** (su nombre deriva de los grupos que incluye, **CDK**, **MAPK**, **GSK** y **CDK-like Kinase**, 61 miembros) y **RGC** (*receptor guanylyl cyclase*, 5 miembros) (Duong-Ly y Peterson, 2013).

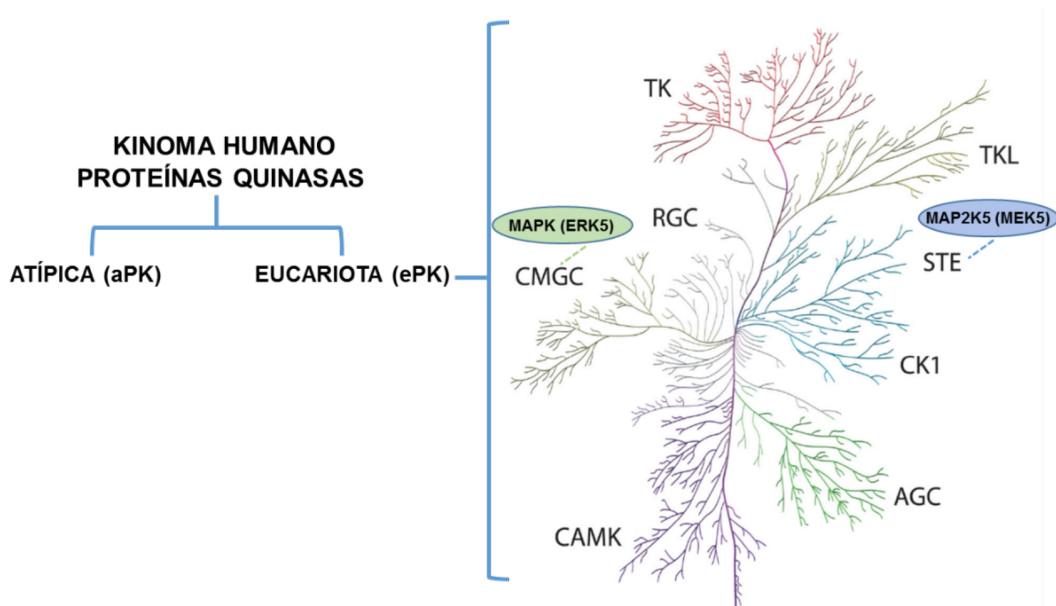


Figura 2. Dendrograma del kinoma humano de las proteínas quinasas eucariotas (ePK). Cada rama representa un grupo, etiquetado con su nombre. Las dos formas ovaladas identifican a la MAPK (ERK5) y a la MAP2K5 (MEK5) en los grupos CMGC y STE respectivamente, que son dos proteínas clave para el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Figura adaptada de (Duong-Ly y Peterson, 2013).

De los ocho grupos de las quinasas eucariotas que se muestra en la Figura 2, se describe a continuación los grupos donde están situadas ERK5 (*Extracellular signal-related kinase 5*) y MEK5 (*Meiosis-specific serine/threonine-protein kinase*) (Duong-Ly y Peterson, 2013; Roskoki, 2015), por ser proteínas quinasas objeto de esta Tesis Doctoral.

STE (*homologs of yeast sterile*) Este grupo se clasifica en tres familias basada en su homología a las quinasas ST20 (MAP4K), STE11 (MAP3K) Y STE 7 (MAP2K), identificadas en levaduras. Este grupo está relacionado con la cascada

de señalización de las MAPK del grupo CMGC. Las STE son las iniciadoras de la señalización corriente abajo de las MAPKKK, es decir, esta fosforila a su MAPKK y esta a su vez, fosforila a su MAPK. A este grupo pertenece la MAP2K5/MEK5 (Figura 2). También se incluye en el grupo STE (entre otras) a MAP2K1/MEK1, MAP2K2/MEK2 y MAP2K7/MEK7. Este grupo comprende 47 miembros.

CMGC Este grupo comprende las CDKs (*cyclin-dependent kinases*), las MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), GSK (*glycogen synthase kinases*) y las CDKs-like kinases. Las MAPK tienen un papel muy importante en muchos procesos celulares como se verá en el apartado 1.3. Dentro de las MAPK, está el grupo de ERK (*extracellular signal-related kinase*) que dentro del conjunto de CMGC están englobadas por ERK1,2-ERK3-ERK4-ERK5. Esta última, se puede observar situada en el dendograma de la Figura 2. En total este apartado comprende 61 miembros de quinasas.

Además de los ocho grupos quinasas eucariotas, hay que añadir un grupo llamados “otros”, que engloba 83 miembros y que carecen de suficiente similitud de secuencia con los ocho grupos pero presentan elementos conservados. Algún ejemplo de este grupo es CK2 (*casein kinase 2*) y IKK α y IKK β (*inhibitor nuclear factor kappa-B kinase subunits alpha/beta*).

El otro gran grupo dentro del kinoma humano son las aPK (*atypical protein kinase*). Son aquellas que tienen actividad quinasa pero su dominio es distinto a las ePK (Duong-Ly y Peterson, 2013). En este apartado se incluyen entre otros a m-TOR (*mammalian target of rapamycin*) y PDHK (*pyruvate dehydrogenase kinase*).

Finalmente, se puede considerar otro grupo de quinasas que se llamaron *Lipid kinases* (quinasas de lípidos) que fosforilan a lípidos. Dentro de este grupo se encuentran las quinasas de esfingolípidos como la familia de las quinasas DAG (diacilglicerol). Otra gran familia son las fosfoinositidina quinasas, siendo las PI3K de clase I las que son en su mayoría activadas por receptores tirosina quinasa (RTK). Este grupo está formado por 20 miembros (Duong-Ly y Peterson, 2013).

1.2. Estructura de las proteínas quinasas

La primera aproximación para dilucidar el dominio catalítico de las proteínas quinasas en eucariotas, fue en la era pregenómica, donde tres investigadores ilustres como Hunter, Quinn y Hanks hallaron 12 subdominios conservados, que numeraron con números romanos (Hanks, 2003).

La importancia de las proteínas quinasas tanto en procesos biológicos como patológicos, ha conllevado a la identificación de la estructura de muchas de ellas. Mediante la cristalografía se ha establecido la función de los subdominios y su relación con la estructura y por tanto, determinar la función de la proteína (Taylor y Korney, 2011). La primera quinasa descubierta por difracción de rayos X fue la subunidad C (catalítica) de la PKA, y para describir la arquitectura de los dominios quinasa se utilizarán dos figuras (Figura 3A y Figura 3B), una corresponde a la PKA, puesto que su dominio central (*core*) es compartida por la mayoría de las quinasas (Adams, 2001) y la segunda figura que corresponde a la descripción de los 12 subdominios de Hanks y Hunter (1995).

El dominio catalítico consta de dos lóbulos llamados N-terminal y C-terminal por su posición dentro del dominio (Figura 3A y 3B). Ambos están unidos por una región llamada bisagra, que permite el movimiento de los dos lóbulos. El dominio N está formado por cuatro subdominios (I, II, III y IV), esto se corresponde con cinco láminas beta antiparalelas (β_1 - β_5). Todas ellas, contribuyen de distinta manera para unir el ATP. En el subdominio I existe un bucle (*loop*) rico en glicina, situado entre la lámina β_1 y β_2 , con una secuencia consenso (GXGXXG). Este bucle, se pliega sobre el ATP y orienta el fosfato gamma o beta en una conformación adecuada para la catálisis. En el subdominio II existe una lisina en la lámina β_3 , que juega un papel esencial en la función catalítica. En este subdominio también hay una hélice alfa, llamada α C-hélice que tiene un papel esencial en la transición entre el estado activo e inactivo de la quinasa. En el dominio IV, está el lazo α C- β_4 que está anclado al lóbulo C. El subdominio V une al lóbulo N-terminal y C-terminal e incluye la lámina β_5 .

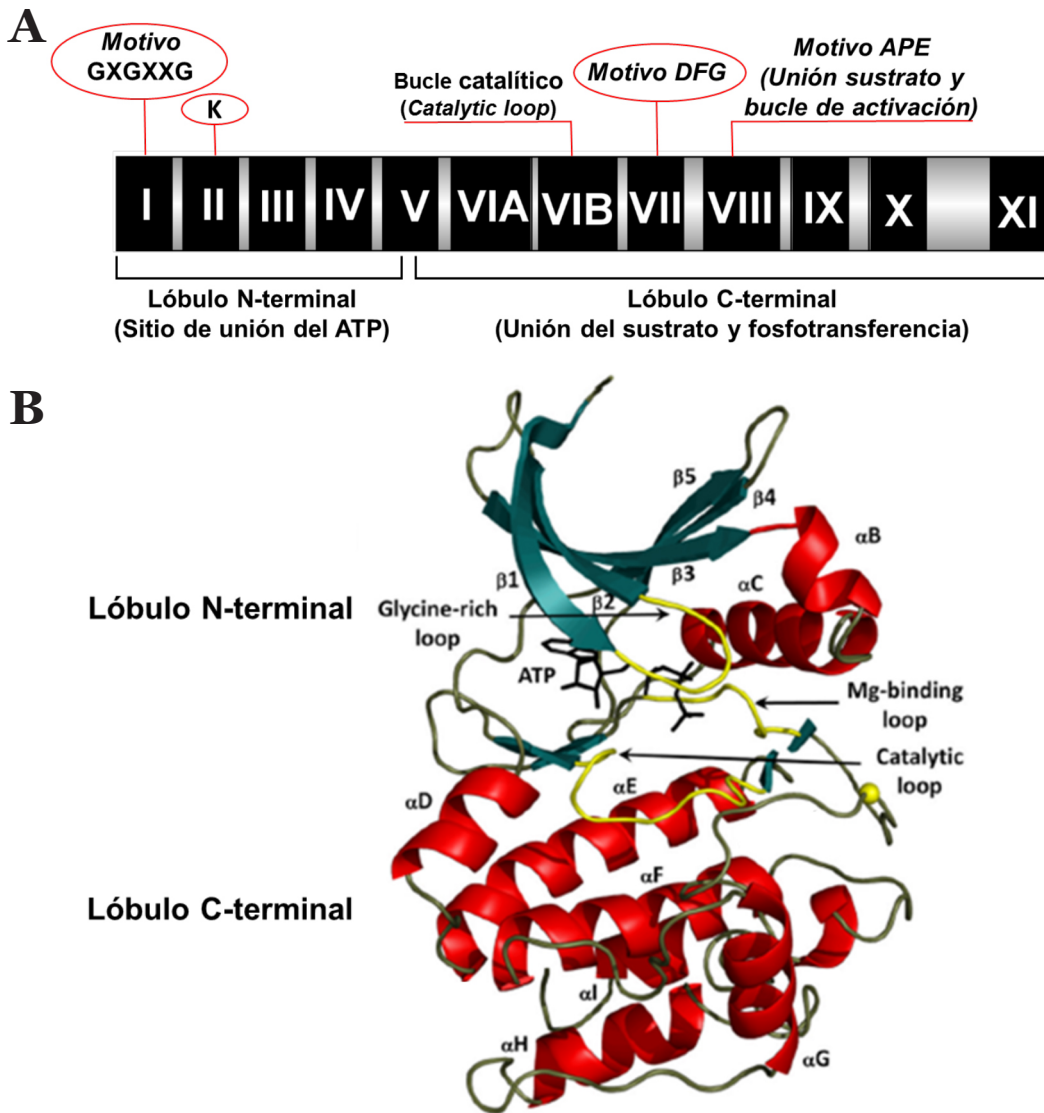


Figura 3. Estructura de las proteínas quinasas en subdominios y estructura tridimensional del dominio catalítico. Se dividen en dos lóbulos N-terminal y C-terminal. **(A)** Subdominios catalíticos de la proteína quinasa en eucariotas (ePK). Los motivos están numerados con números romanos y en cada uno de ellos se representan los elementos más relevantes. Figura adaptada de (Hanks, 2003). **(B)** El lóbulo N-terminal está compuesto por cinco láminas beta (color turquesa) junto con la hélice α -C (color rojo). El lóbulo C-terminal está compuesto por las seis hélices alfa (color rojo) y los bucles catalíticos más relevantes (color amarillo). Figura adaptada de (Taylor y Kornev, 2011).

Por su parte el lóbulo C está formado por seis hélices alfa (α D- α I) y una lámina beta que comprende cuatro láminas beta cortas (β 6- β 9) (no apreciables en la Figura 3B). El subdominio VIB está formado por las láminas cortas β 6- β 7 que incluyen gran parte de la maquinaria catalítica asociada a la transferencia del fosfato del ATP al sustrato (*catalytic loop*). El subdominio VII, corresponde a las láminas cortas β 8- β 9 que flanquea el motivo DFG conservado (casi siempre es Asp-Phe-

Gly) donde la Asp 184 (en el caso de la PKA) es esencial para reconocer uno de los iones de Mg^{2+} unidos al ATP. En el subdominio VIII, se localiza el motivo APE (Ala-Pro-Gly) donde se une el sustrato en el bucle de activación (*activation loop*), este último se localiza desde el motivo DFG hasta el principio de la hélice α -F. El subdominio IX, corresponde con la hélice α -F que estabiliza el bucle catalítico. El subdominio X, corresponde con la hélice α -G y es el peor de los conservados. El subdominio XI, comprende las hélices α -G-H y termina en el extremo carboxi terminal (Hanks y Hunter, 1995; Süveges y Jura, 2015; Taylor y Korney, 2011).

1.3. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases-MAPK*)

Las MAPKs son serinas/treoninas quinasas que están muy conservadas evolutivamente (Karin y Chang, 2001). Estas son activadas por diversos estímulos como factores de crecimiento, estrés, ésteres de forbol (Seger y Krebs, 1995) y proteínas G heterotriméricas (G_s , G_i , G_q y G_{12}). Estas últimas regulan a ERK1/2, JNK, p38, ERK5 y ERK6 (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007). Las MAPK suponen una red de señalización intracelular que van a regular una gran cantidad de procesos celulares, como son: regulación de expresión de genes, proliferación celular, diferenciación, desarrollo, apoptosis, metabolismo, supervivencia, movilidad y respuesta inmunológica innata y adaptativa (Low y Zhang, 2016).

La activación de las MAPKs se realiza a través de una cascada de señalización secuencial de tres componentes (Figura 4). Comenzando desde la cascada de señalización, hay una MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK o MAP3K) que fosforila y activa a una MAP quinasa quinasa (MAPKK o MAP2K o MEK) y esta a su vez realiza una fosforilación dual en un motivo conservado treonina-X-tirosina (Thr-X-Tyr) situado en el bucle de activación del subdominio VIII del dominio quinasa y activa a una MAP quinasa (MAPK) (Cargnello y Roux, 2011). El aminoácido X corresponde a ácido glutámico en ERK, prolina en JNK o glicina en p38 (Low y Zhang, 2016).

En mamíferos, se identificaron 14 genes codificando MAPKs humanas que se han dividido en MAPKs convencionales que son las reguladas por la cascada de tres elementos y la presencia del motivo (Thr-X-Tyr) y comprenden: *extracellu-*

lar *signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2), *c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3* (JNK 1/2/3), p38 isoformas α , β y γ , y *extracellular signal-regulated kinase 5* (ERK5). Por otro lado, están las MAPKs atípicas que se caracterizan por no activarse por la triada de las MAPKs y además, el motivo Thr-X-Tyr o no existe como en ERK3/4 y *Nemo-like kinase* (NLK) o donde el residuo de Gly o Glu sustituye al de Tyr (Cargnello y Roux, 2011; Coulombe y Meloche, 2007) (Figura 4).

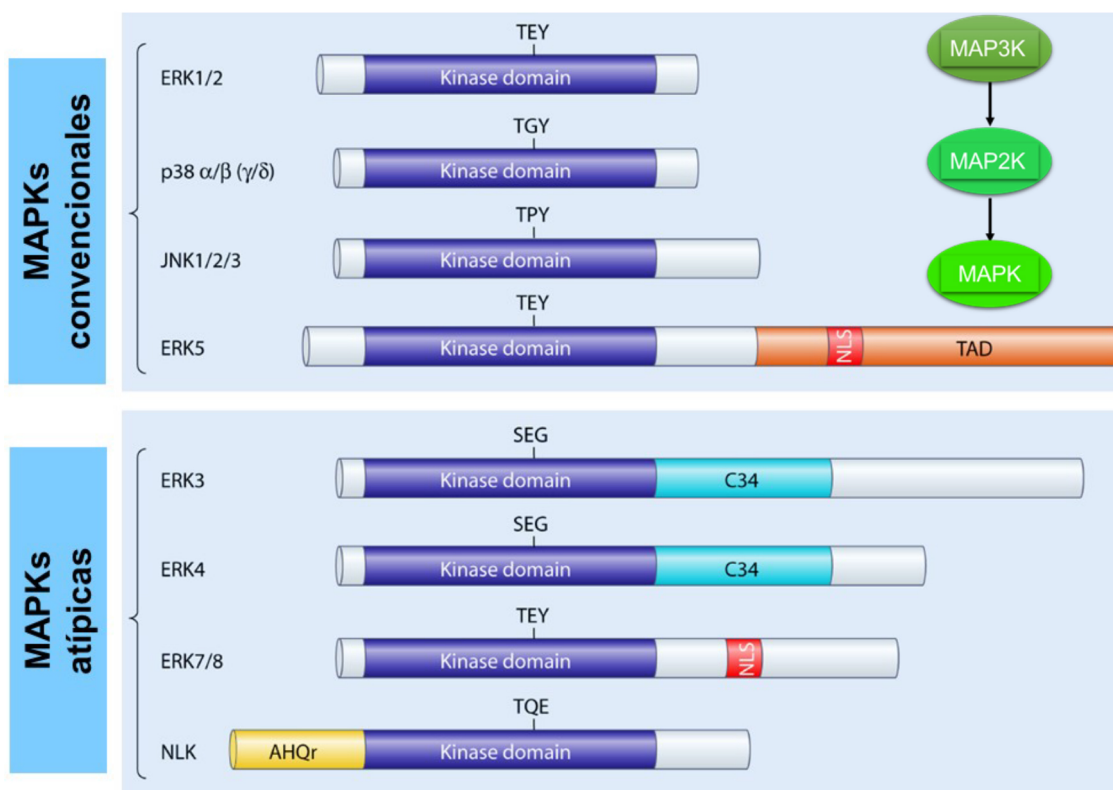


Figura 4. Representación esquemática de las estructuras convencionales y atípicas de las MAPKs en humanos desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal. En el dominio quinasa (en azul) se indica el motivo de activación de cada una de las MAPKs. NLS: señal de localización nuclear/*nuclear localization sequence*; TAD: dominio de transactivación/*transactivation domain*; C34: región conservada en ERK3 Y ERK4; AHQr: dominio rico en alanina (Ala), histidina (His) y ácido glutámico (Glu). En las MAPKs convencionales se indica su activación por la cascada de tres módulos. Los aminoácidos con el código de una letra son: A: alanina; E: ácido glutámico; G: glicina; H: histidina; P: prolina; Q: glutamina; S: serina; T: treonina; Y: tirosina. Figura adaptada de (Cargnello y Roux, 2011).

A continuación se realizará una descripción general de ERK 1/2 por ser la quinasa que comparte un alto grado de homología con ERK5. La MAPK7-ERK5 tendrá una descripción más detallada, debido a ser una de las moléculas principales de esta Tesis Doctoral.

1.3.1. ERK1/2

ERK1 comparte un 84 % de identidad aminoacídica con ERK2, por esta razón, se les denomina ERK1/2 (también llamadas p42/p44 por sus masas moleculares). ERK1 presenta un dominio N-terminal con 17 aminoácidos más que ERK2 (Roskoski, 2012). Ambas, presentan el motivo de activación Thr-Glu-Tyr en el dominio quinasa. ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase-1/2*) están en la cascada de activación de las MAPKKK Ras/Raf/Mek/ERK1/2. Esta vía se activa desde distintos tipos de receptores, los tirosina quinasa (RTKs; *receptor tyrosine kinase*), los acoplados a proteína G, y citoquinas (Caunt *et al.*, 2015). Los receptores de tirosina quinasa (RTKs), (incluido EGFR) reclutan a SOS (*Son of sevenless*), que es una proteína intercambiadora de nucleótido de guanina (GEF *guanine nucleotide exchange factor*), que a través de los dominios intracelulares de Shc y Grb2 (*Growth-factor-receptor-bound-2*) activan a las GTPasas HRAS, KRAS o NRAS. Una vez activado RAS y unido a GTP (RAS-GTP) conduce a la formación de homodímeros o heterodímeros de RAF (ARAF, BRAF o CRAF) que fosforilan y activan a MEK1/2, y a su vez estos, fosforilan y activan a ERK1/2 en el motivo T-E-Y. (Caunt *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2019). Esta cascada de señalización participa en la regulación de procesos como progresión del ciclo celular, adhesión, migración, supervivencia, diferenciación, proliferación y metabolismo (Roskoski, 2012). Se han identificado 284 sustratos que interactúan con ERK1/2 (Von Kriegsheim *et al.*, 2009). Este número se ha visto incrementado en los últimos años hasta llegar a los 600 sustratos registrados en las bases de datos (Maik-Rachline *et al.*, 2019).

Lo expuesto en el párrafo anterior representa un modelo lineal/clásico de la vía ERK1/2 (Figura 5A). En el artículo de Caunt y colaboradores (2015) explican la existencia de complejos multiproteicos de andamiaje (*scaffold*) que regulan la vía junto a sistemas de retroalimentación (Figura 5B y 5C). Se menciona a la isoforma 1 del complejo quinasa supresora de Ras1 (KSR1 *kinase suppressor of RAS1*) que ensambla a RAF/MEK1/2 y ERK1/2 para aumentar la eficiencia de la señalización (Figura 5B). Además, la vía está regulada por sistemas de retroalimentación negativa. Por un lado, las proteínas Sprouty (SPRY) actúan inhibiendo la señalización a nivel de RTKs y SOS al interferir con el dominio catalítico de RAF. Por otro lado, las fosfatasa de doble especificidad (DUSPs *dual specificity phosphatases*) desfosforilan el motivo pT-E-pY de ERK1/2 (Figura 5C).

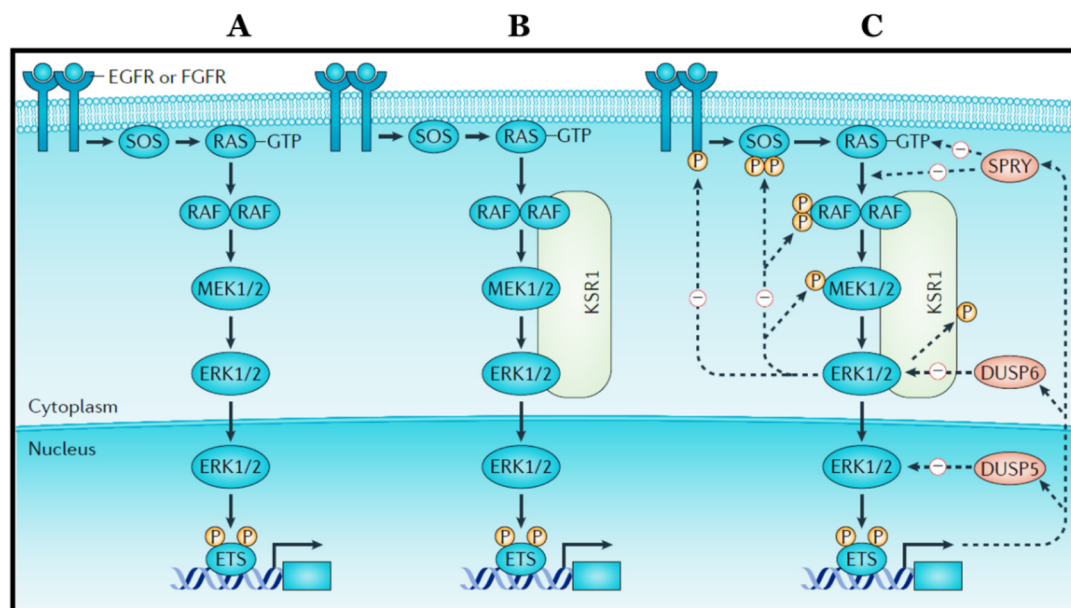


Figura 5. Regulación de la vía ERK1/2 mediante tres modelos. Las vías de señalización en (A), (B) y (C) comienzan con la activación del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) o con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). (A) Modelo lineal/clásico de la ruta de señalización de RAF-MERK1/2-ERK1/2 regulada por RAS. (B) Modelo de andamiaje con la quinasa supresora de RAS1 (KSR1) que aumenta la eficacia de la señalización. (C) Modelo de retroalimentación negativa. Las proteínas Sprouty (SPRY) inhiben el dominio catalítico de RAF. Las fosfatasas de doble especificidad (DUSP) intervienen en distintas ubicaciones. La DUSP5 reside en el núcleo y la DUSP6 en el citoplasma. Figura de (Caunt *et al.*, 2015).

Otro aspecto importante de esta vía es su localización celular. La compartimentación, es un mecanismo importante que regula la señalización de ERK1/2. En situación basal ERK1/2 está anclado a MEK citosólico pero tras su activación, se disocia de MEK y se transloca al núcleo (Volmat *et al.*, 2001). Se ha descubierto que ERK1/2 fosforila a sustratos localizados en el citoplasma o en el núcleo (Maik-Rachline *et al.*, 2019). Algunos de los sustratos de ERK1/2 en el citoplasma (se han descubierto más de 50) incluye a la familia de fosfoproteínas fosfatasas, a las proteínas quinasas RSK, que incluye a ribosoma S6 quinasa, que regula entre otras funciones, crecimiento celular, proliferación, movilidad y supervivencia. Por otro lado, los sustratos de ERK1/2 en el núcleo incluyen entre otros a la familia de factores de transcripción TCF (*ternary complex factor*) que va a producir la inducción de genes como *c-MYC* y *c-FOS* (Roskoski, 2012).

Respecto a la localización celular de ERK1/2 es importante mencionar su localización mitocondrial. Diversos estudios apuntan a que esta quinasa pueden

localizarse en la mitocondria e intervenir en sus funciones. Un estudio realizado por Alonso y colaboradores (2004) demostraron la translocación de ERK1/2 (mayoritariamente como fosfo-ERK1/2) a la mitocondria durante el desarrollo del cerebro en rata, teniendo su máxima expresión en determinados estadios del mismo. Se localizó entre la membrana externa y el espacio intermembrana mitocondrial. Además, localizaron a fosfo-MEK1/2 en la matriz mitocondrial pero en el cerebro de rata adulto (Alonso *et al.*, 2004). Otro estudio, realizado en células epiteliales de próstata RWPE-1 y RWPE-2, (las primeras carecen de capacidad tumorigénica, mientras que las segundas son tumorigénicas), llegaron a la conclusión que en ambos tipos de células, ERK2 estaba localizado en mitocondria pero, en las células RWPE-2, era fosfo-ERK1/2 [junto con células metastásicas de próstata (DU145) y células de osteosarcoma], es decir, la forma activa es la que estaba en mitocondria. Esta primera aproximación fue la base para demostrar que ERK1/2 realiza una fosforilación inhibitoria a la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK- 3β) en la serina 9. Esto provoca la fosforilación de la chaperona mitocondrial ciclofilina (CyP-D) que bloquea la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) y la entrada de proteínas proapoptóticas como Bax y por tanto, las células son refractarias a la muerte celular, implicando un mecanismo de resistencia de la célula tumoral (Rasola *et al.*, 2010; Rasola y Chiara, 2013). Este mecanismo se puede observar en la Figura 6 marcada con una línea roja discontinua. Comentar que en la misma figura en el citoplasma se puede observar otra fosforilación realizada por ERK1/2 sobre GSK- 3β pero con efecto proapoptótico.

Como complemento a lo expuesto anteriormente, hay que mencionar el papel de ERK1/2 en tumorigénesis. Esta vía está desregulada en muchos tipos de cáncer bien por una activación aberrante o alteraciones genéticas en vía de señalización cascada arriba de la señalización ERK1/2, en Ras, Raf y MEK1/2. Se calcula que un tercio de todos los tipos de cáncer, incluyendo páncreas, pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y mama de tipo basal presentan una alteración en esta vía (Lu *et al.*, 2020). Las mutaciones en RAS se producen en un 33 % de todos los cánceres humanos (Roskoski, 2019). Las mutaciones más frecuentes se producen en el oncogén KRAS, se manifiestan en un 96 % en los adenocarcinomas ductales de páncreas, en un 52 % en los carcinomas colorrectales, un 32 % en los adenocarcinomas de pulmón. También BRAF está mutado y se calcula

que representa un 8 % de todos los cánceres humanos. Asimismo, mutaciones en MEK1/2 actúan como oncogénicamente pero no son frecuentes en tumores humanos. También, se han identificado mutaciones en los genes ERK1/2 pero han sido poco caracterizadas (Drosten y Barbacid, 2020).

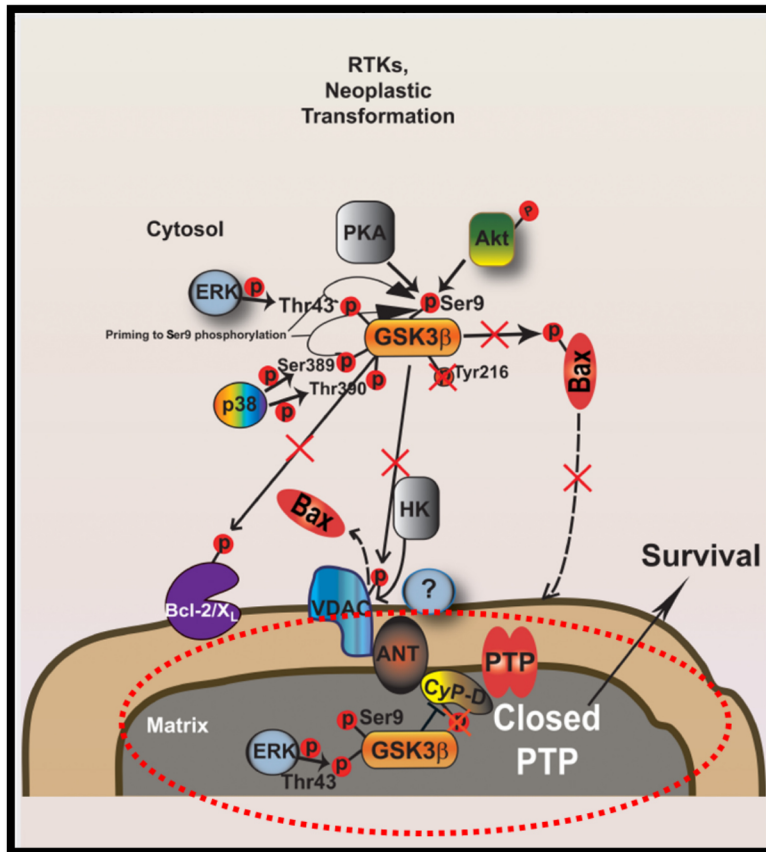


Figura 6. Ilustración de la fosforilación de GSK-3β por ERK1/2. La parte inferior de la imagen, marcada con una línea roja discontinúa, hace referencia a la fosforilación que realiza ERK1/2 sobre la Ser9 de la GSK-3β. Esto provoca una fosforilación inhibitoria de GSK-3β, que va a impedir la fosforilación de CyP-D y por tanto, el bloqueo de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) situado en el espacio intermembrana mitocondrial. Este proceso impide la entrada de proteínas proapoptóticas a la matriz mitocondrial e implica un mecanismo de supervivencia de las células cancerosas. En la parte superior de la imagen, se muestran distintas quinasas que regulan a GSK-3β mediante fosforilaciones en distintos residuos. Figura adaptada de (Rasola y Chiara, 2013).

1.3.2. Extra Regulated Kinase 5 (ERK5)

DESCUBRIMIENTO

Las investigaciones de dos grupos independientes llevaron en 1995 al descubrimiento de ERK5 (Lee *et al.*, 1995; Zhou *et al.*; 1995). Por un lado, el grupo de Zhou descubrió MEK5 y ERK5. La identificación de MEK5 se realizó mediante una PCR con cebadores degenerados con secuencias conservadas de aminoácidos presentes en levaduras y parcialmente conservada en MEK1 humano. Como molde se utilizó cADN de cerebro fetal humano. Se obtuvo una proteína de 444 aminoácidos con una identidad del 44 % respecto a otras MEK conocidas. Por otro lado, con el ensayo de doble híbrido en levaduras, utilizando como proteína cebo a MEK5, se demostró que interaccionaba con ERK5, por tanto, MEK5 se convirtió en su quinasa activadora específica, al no obtener interacción con MEK1 ni MEK2 (Zhou *et al.*, 1995). Por otro lado, el grupo de Lee con la técnica de PCR, mediante cebadores diseñados en base a los subdominios quinasas conservados, realizaron el cribado de bibliotecas de cADN de placenta humana. Encontraron una proteína que llamaron *Big MAPK-1* (BMK1), con una masa molecular predecida de 98 kDa, que tenía una cola C-terminal (aproximadamente de 400 aminoácidos) única, que no estaba presente en ninguna otra MAPK. También, compararon esta novedosa quinasa con ERK1/2 y detectaron: (i) que el dominio T-E-Y (de la doble fosforilación) estaba presente en esta gran quinasa, (ii) estructuralmente eran distintas y (iii) BMK1 presentaba un 47,6 % de identidad aminoacídica con ERK1 y un 49,3 % con ERK2. Además, compararon BMK1 con el ERK5 del grupo de Zhou (1995), viendo que ambas compartían un 98 % de identidad de secuencia aminoacídica (Lee *et al.*, 1995).

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

ERK5 está codificado por el gen *MAPK7* y está localizado en el brazo corto del cromosoma 17p11.2 (Purandare *et al.*, 1998). Consultando la base de datos biomoleculares *Ensembl*, en su navegador genómico (<https://www.ensembl.org/index.html>) se describen para el gen *MAPK7* humano 18 transcritos (Figura 10). De todos, ocho tienen un marco de lectura abierto (ORF *open reading frame*), etiquetados como *protein coding* (Figura 7). De los ocho, solo cuatro codifican

proteínas aceptadas por el proyecto *Consensus Coding Sequence Set* (CCDS). Este proyecto está formado por miembros como Ensembl Annotation Pipeline, Havana Curation Group, NCBI y UCSC, cuyo objetivo es identificar regiones codificantes de proteínas humanas y de ratón con anotaciones homogéneas y de calidad.

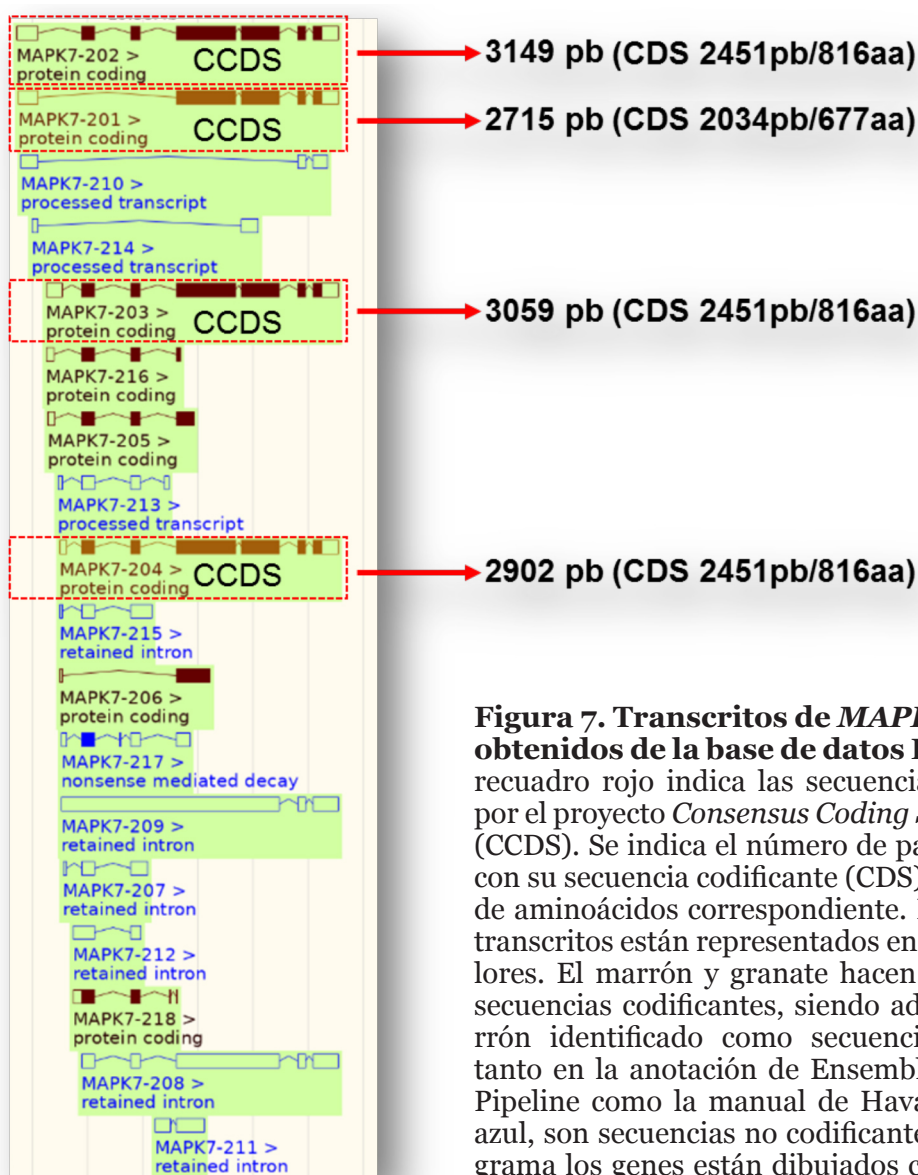


Figura 7. Transcritos de *MAPK7* humano obtenidos de la base de datos Ensembl. El recuadro rojo indica las secuencias aceptadas por el proyecto *Consensus Coding Sequence Set* (CCDS). Se indica el número de pares de bases con su secuencia codificante (CDS) y el número de aminoácidos correspondiente. Los distintos transcritos están representados en distintos colores. El marrón y granate hacen referencia a secuencias codificantes, siendo además el marrón identificado como secuencias idénticas tanto en la anotación de Ensembl *Annotation Pipeline* como la manual de Havana. El color azul, son secuencias no codificantes. En el diagrama los genes están dibujados con cajas que indican exones, las líneas de conexión son intrones,

las cajas llenas indican secuencias codificantes y, las cajas vacías representan regiones no codificantes (UTRs *untranslated regions*) que no son traducidas a aminoácidos. También, hay que mencionar el significado de *Processed transcript* que es cuando el transcrito no tiene un marco de lectura abierto (ORF). *Retained intron* donde el intrón es retenido por el ARNm maduro y puede ser degradado por tener secuencias prematuras de parada; o puede dar proteínas truncadas (Zheng *et al.*, 2020). Finalmente, *Non-sense Mediated Decay* es un sistema de control del ARNm para degradar transcritos con codones prematuros de parada que pueden dar lugar a proteínas truncadas (Chaudhary *et al.*, 2019). Figura adaptada de (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Las MAPK7 llamadas como MAPK7-202, MAPK7-203 y MAPK7-204 de 816 aminoácidos, coinciden con la base de datos UniProt (Q13164-1) en ser las secuencias canónicas. En mi caso, paso a describir la MAPK7-202 por ser la secuencia que se utilizó en los experimentos de esta Tesis Doctoral. En la Figura 8, se observa el gen *MAPK7* con una longitud de 5,82 kb, codificado por 7 exones, 6 de ellos codificantes y cinco intrones. El transcrito son 3149 pb que codifica 816aa.

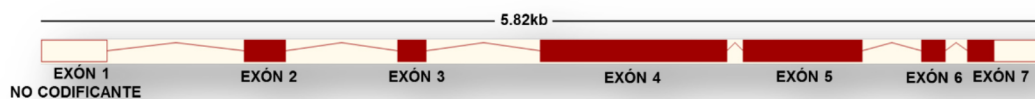


Figura 8. Representación de la estructura del gen MAPK7 (MAPK7-202) que abarca 5,82 kb. Figura adaptada de (<http://www.ensembl.org>).

ESTRUCTURA DE ERK5

La estructura secundaria de MAPK7/ERK5 está formada, según el servidor PDBsum con el sistema de predicción de estructuras proteicas desde estructura primaria, *AlphaFold model* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>) por: dos láminas β que contienen cinco hebras antiparalelas grandes (letra A) y tres hebras también antiparalelas pequeñas (letra B); cinco horquillas β ; 24 hélices α (H); 30 giros β y 24 giros gamma (Figura 9). Cabe resaltar, que los distintos colores que se observan en las estructuras representan la fiabilidad de *Alpha Fold* sobre su predicción. Se establece una medida de confianza por residuo, llamada *local distance difference test* (pLDDT) en una escala de 1 a 100. Un nivel muy alto (azul oscuro) considera un pLDDT >90, nivel de confianza (color azul claro) pLDDT entre 90-70, un nivel bajo (amarillo) pLDDT entre 70-50 y muy bajo (color naranja) pLDDT \leq 50. También, hay que tener presente que para la interpretación de esta escala, cuando pLDDT \leq 50 no pueden ser interpretadas como estructuras sino como predicción de desorden (Tunyasuvunakool *et al.*, 2021).

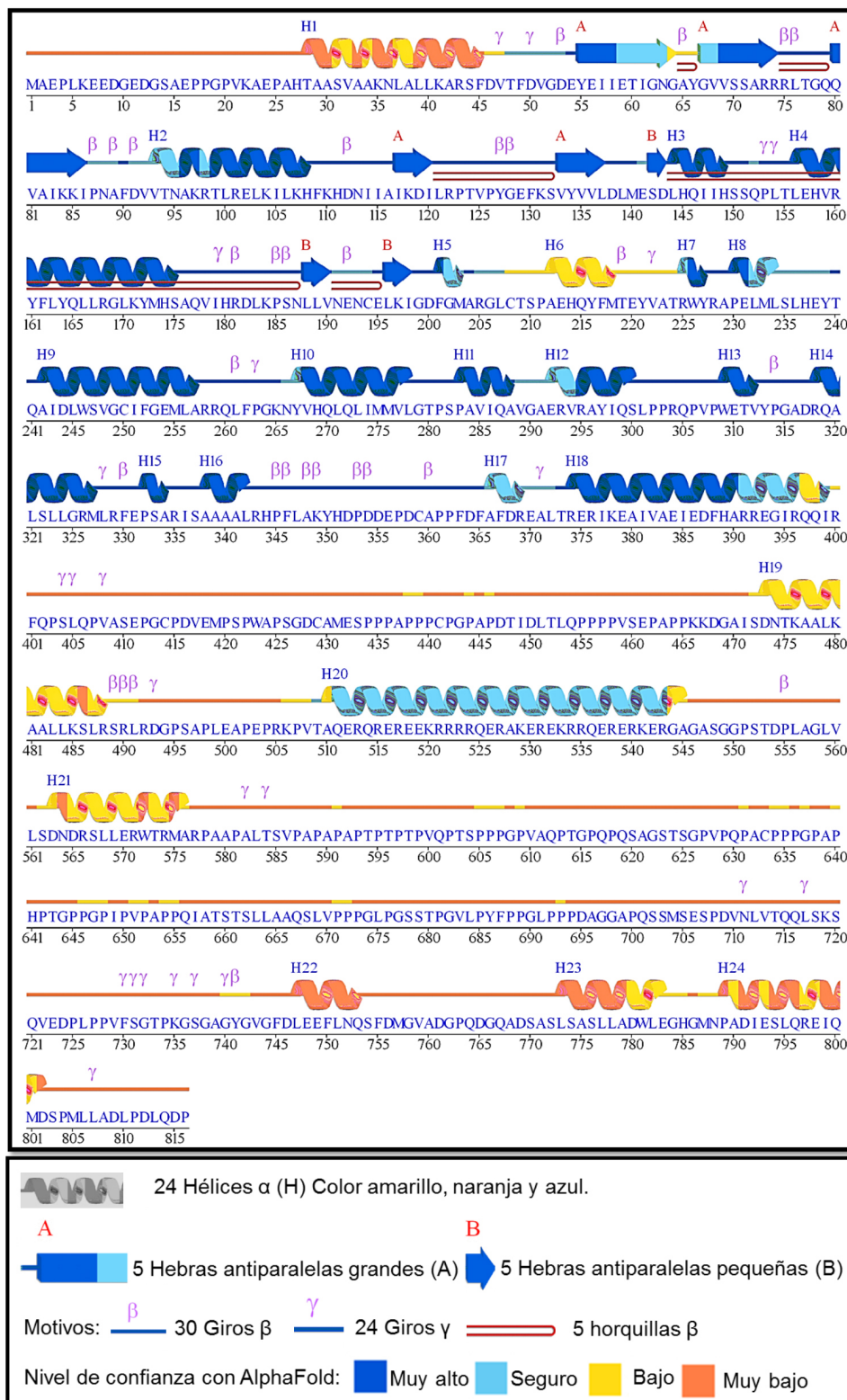


Figura 9. Esquema de la estructura primaria y secundaria de MAPK7/ERK5 humano obtenido del servidor PDBsum AlphaFold. El código identificador para la búsqueda fue el de UniProt Q13164. Figura adaptada de PDBsum AlphaFold (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>).

DOMINIOS FUNCIONALES DE ERK5

ERK5 humano está formado por 816 aminoácidos. Esto supone el doble de tamaño que las MAPKs clásicas (Gómez *et al.*, 2016). Presenta una masa molecular esperada de 98 kDa. Además, posee una cola C-terminal de 400 aminoácidos, de aquí que la llamen *big* MAPK. ERK5 posee un extremo N-terminal (1-406 aa) dotado de actividad quinasa y un extremo C-terminal (410-816 aa), que va a jugar un papel esencial en su localización y en la regulación transcripcional de sus dianas (Tubita *et al.*, 2020). El dominio N-terminal, engloba una región de localización citoplasmática (1-77 aa), otra de unión a MEK5 (78-139 aa) y el dominio quinasa (55-347 aa) (<http://pfam.xfam.org/>; <http://www.kinasenet.ca/>). Este dominio quinasa comparte un 66 % de identidad con el dominio de ERK2 (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012). Además, dentro de este dominio quinasa se encuentra un dominio común de acoplamiento (CD *Common docking domain*) (350-358 aa) que permite a ERK5 unirse a sustratos que tienen el dominio de acoplamiento D (Tanoue y Nishida, 2002). También, se localiza el dominio de oligomerización (140-406 aa). En el dominio C-terminal, se sitúa la señal de localización nuclear (NLS, *Nuclear localization signal*) (505-539 aa), una región de interacción con el factor de transcripción MEF2 (440-501 aa) (*Myocyte enhancer factor 2*) (Kato *et al.*, 2000), dos dominios ricos en prolina, Pro1 (434-465 aa) y Pro2 (578-701 aa) que son consideradas potenciales zonas de unión a proteínas con dominios Scr (*Scr-homology 3*) (Tubita *et al.*, 2020), un dominio de actividad transcripcional (TAD, *Transactivation domain*) (664-789 aa) que por un lado se va a autofosforilar y va a permitir aumentar la actividad de MEF2 (Kasler *et al.*, 2000) y por otro lado, va a potenciar la actividad de la proteína activadora 1 AP-1 (*activating protein-1*) (Morimoto *et al.*, 2007) que es un factor de transcripción que está implicado en proliferación, supervivencia y apoptosis (Shaulian y Karin, 2001) y la señal de exportación nuclear (NES, *Nuclear export signal*) (771-816 aa) relacionada con la localización citoplasmática de ERK5 (Plotnikov *et al.*, 2011) (Figura 10).

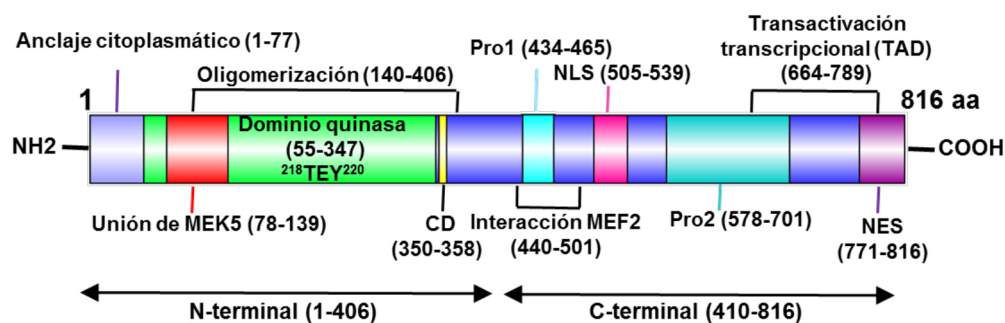


Figura 10. Estructura de los dominios funcionales de ERK5. La proteína consta de 816 aminoácidos. En el dominio N-terminal se encuentran las siguientes regiones: anclaje citoplasmático, de unión a MEK5, de oligomerización y el dominio quinasa donde MEK5 realiza la doble fosforilación en los residuos Thr²¹⁸ y Tyr²²⁰ y el dominio común de acoplamiento (CD). El dominio C-terminal es característico de ERK5 debido a su gran tamaño. Consta de las siguientes regiones: dos dominios ricos en prolina (Pro1 y Pro2), de interacción con el factor de transcripción MEF2, la señal de localización nuclear (NLS), la transactivación transcripcional y la señal de exportación nuclear (NES). El dominio quinasa se delimitó entre los aminoácidos 55 y 347 por los datos obtenidos de las bases de datos Pfam y el recurso KinaseNet centrada en el estudio de las proteínas quinasas.

ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DE ERK5

Diversos estímulos pueden desencadenar la activación de la vía de ERK5. Puede responder frente a factores de crecimiento (mitógenos) como pueden ser: las neuregulinas (NRGs) (Esparís-Ogando *et al.*, 2002), el epidérmico (EGF), de fibroblastos (FGF), derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Todos ellos activan a receptores tirosina quinasa. También, la vía se puede activar por estrés oxidativo (H₂O₂), hiperosmolaridad (sorbitol), suero y citoquinas inflamatorias (IL-6) (Stecca y Rovida, 2019; Finegan *et al.*, 2009) y por las subunidades G α_q y G $\alpha_{12/13}$ de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Fukuhara *et al.*, 2000).

Todos estos estímulos se ven integrados en la cascada de activación característica de las MAPKs, que comprende los tres módulos de activación secuenciales. Adicionalmente a este módulo de tres quinasas, la proteína quinasa, WNK1 se posiciona como MAP4K en la vía de ERK5 (Xu *et al.*, 2004).

Las MAPKKKs de la vía de activación de ERK5, son MEKK2 o MEKK3 que se unen al dominio N-terminal de MEK5 (MAPKK5) para fosforilarlo en los residuos Ser311 y Thr315. Se sabe que MEKK2 tiene más afinidad por MEK5 que MEKK3 (Hoang *et al.*, 2017a). Se encontró que la interacción entre MEKK2-MEK5 fue

de seis veces mayor que la interacción MEKK3-MEK5 (Sun *et al.*, 2001). Por su parte, MEK5 (MAPKK5) es la quinasa específica que activa a ERK5 (Glatz *et al.*, 2013). MEK5 presenta dos isoformas por ajuste alternativo, MEK5 α que tiene una masa molecular de 50 kDa, siendo 89 aminoácidos más larga en su extremo N-terminal que la isoforma MEK5 β . Esta última, tiene una masa molecular de 40 kDa. (Le *et al.*, 2012). Ambas isoformas tienen características diferentes. La expresión de MEK5 β es mayor en tejidos diferenciados mientras que MEK5 α se expresa mayoritariamente en tejidos mitóticamente activos (p. ej. el hígado) y en líneas celulares de cáncer. Asimismo, se han descrito funciones distintas para ambas isoformas. Por un lado, MEK5 α es la encargada de activar a ERK5, mientras que MEK5 β parece que puede inhibir la asociación entre MEK5 α y ERK5 (Glatz *et al.*, 2013). La especificidad que presenta MEK5 α hacia ERK5, se debe a la presencia de un dominio phox y Bem1p (PB1) en la región N-terminal (Nakamura *et al.*, 2006) y un motivo D que van a asegurar la fosforilación a ERK5. Además, el dominio PB1 es esencial en la activación de MEK5 al unirse al dominio PB1 que también tiene su quinasa activadora MEKK3. Los motivos D, son mecanismos de interacción proteína-proteína de 7 a 14 aminoácidos de longitud que están presentes en las siete MAPKKs. Tienen una secuencia consenso Ψ , Φ y X, que representan un aminoácido básico, hidrofóbico y cualquier aminoácido respectivamente (Glatz *et al.*, 2013). Cabe mencionar que para el estudio descrito arriba se empleó a la MEKK3 y no a MEKK2 que según lo descrito por otros autores pudiera tener más afinidad por MEK5 α (Figura 11).

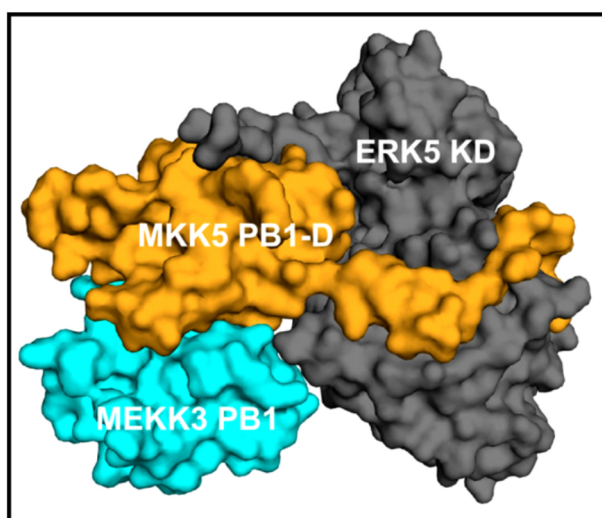


Figura 11. Representación en modelo de superficie de la activación de ERK5. Se observa la interacción entre MEKK3 con el dominio PB1, MKK5 (MEK5) con el dominio PB1 y motivo D y como este último se une al dominio quinasa (KD Kinase Domain) de ERK5 (Glatz *et al.*, 2013).

Otro aspecto importante es el referido al papel que tienen las proteínas adaptadoras en la ruta de activación de ERK5. Algunos ejemplos (Figura 12) de estas proteínas adaptadoras son Lad (*Lck-adaptor*) que puede activar a MEKK2/3 (Sun *et al.*, 2001; Wang y Tournier, 2006). Además, este adaptador se requiere para la activación de ERK5 inducida por EGF vía c-Src (Wang y Tournier, 2006). Gab1 (*Grb2-associated binder 1*) es otra proteína adaptadora que a través del receptor gp130 que [transduce señales de citoquinas como el factor de inhibición de leucemia (LIF, *Leukemia inhibitory factor*) y la cardiotrofina-1 (CT-1)], sufre fosforilación y permite su asociación con SHP2, siendo esta asociación esencial para la elongación de los cardiomiocitos vía ERK5. (Nakaoka *et al.*, 2003; Wang y Tournier, 2006). También, en cardiomiocitos, la inactivación del complejo de anclaje con la quinasa A específica del músculo (mAKAP), conduce a un aumento de AMPc, que a su vez, activa a la PKA y la proteína intercambiadora dependiente de AMPc (Epac1). La PKA, activa, fosforila a la fosfodiesterasa PDE4D3, que recluta a Epac a través de Rap e inhibe a ERK5 (Bos, 2006). La proteína quinasa Cot (MAP3K8) participa también en la vía de activación de la vía de ERK5, mediante fosforilación de MEK5 (Chiariello *et al.*, 2000).

Otra proteína importante es Ras, que puede activar a ERK5, pero dependiente del tipo celular. En un estudio con una forma dominante negativa de H-Ras, se inhibió la activación de ERK5 (vía EGF) en las células PC12 (células de feocromocitoma) de rata y células C2C12 (células de mioblastos de ratón) pero no se inhibió en células COS7 (células de fibroblastos de mono) (Lochhead, *et al* 2012). En otro estudio, la activación de ERK5 a través de NRG en células MCF7 (cáncer de mama) fue independiente de Ras (Esparís-Ogando *et al.*, 2002). Finalmente, ERK5 puede regular la actividad sustratos como factores de transcripción (MEF2A, MEF2B, MEF2C, c-MYC, c-FOS, CREB, HIF-1, Twist, SAP1, RB, PML, FOXO3, NF- κ B, STAT3 y c-REL), quinasas (SKG, RSK, PAK7, FAK, P-90-RSK, AKT/GSK3 β), ciclinas y las quinasas inhibitorias de ciclinas (CDKi), citoquinas y factores de crecimiento (Stecca y Rovida, 2019) (Figura 12).

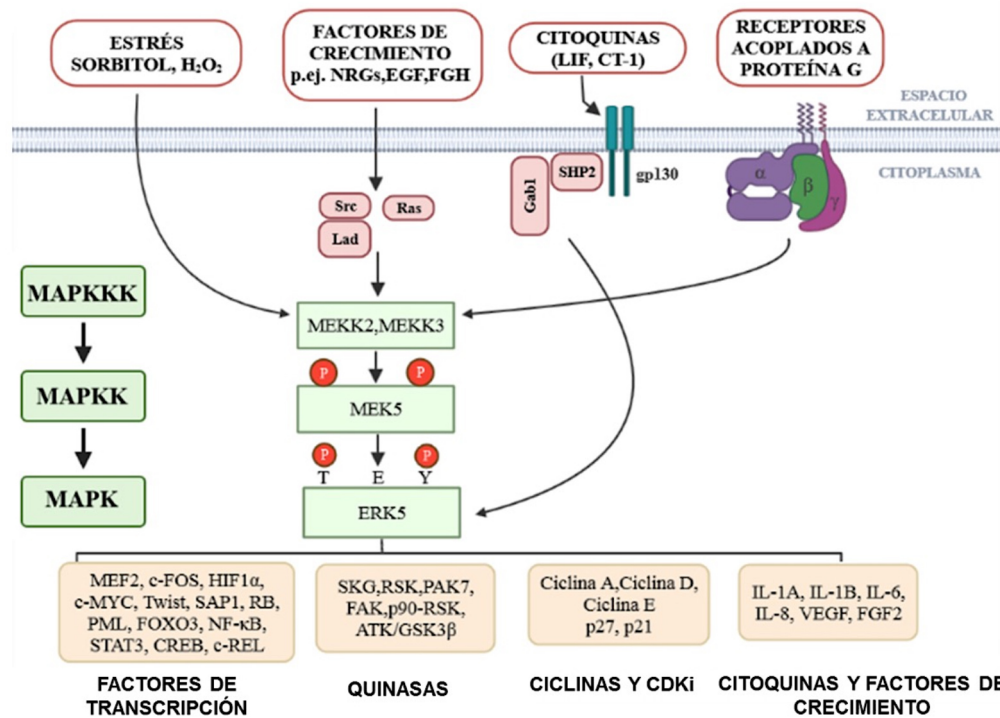


Figura 12. Representación esquemática de algunos de los componentes activadores de la vía de ERK5 y sus sustratos. Figura adaptada de (Stecca y Rovida, 2019; y Wang y Tournier, 2006).

LA FOSFORILACIÓN DE ERK5 IMPLICA SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

ERK5 es fosforilado en su bucle de activación en el dominio quinasa, por su quinasa aguas arriba MEK5, en el motivo TEY, en la Thr218 y Tyr 220, siendo el aminoácido E, ácido glutámico. Estudios in vitro realizados por Mody y colaboradores (2003), sugirieron que la fosforilación de la Thr218 inducía un cambio conformacional en ERK5 que permitía a MEK5 fosforilar a la Tyr220. Otro aspecto relevante, es la autofosforilación que sufre ERK5 en la región C-terminal, tras su activación (Morimoto *et al.*, 2007). Esta favorece la actividad del dominio TAD. En la Tabla 1, se muestra una recopilación de algunos de los residuos fosforilados de ERK5 con su quinasa responsable en base a ensayo quinasa o mutagénesis (Paudel *et al.*, 2021).

Tabla 1. Lista de residuos fosforilados de ERK5 en humanos publicados y confirmados por ensayo quinasa o mutagénesis. Tabla adaptada de (Paudel *et al.*, 2021).

Posición aminoácido en ERK5 (Uniprot Q13164) ¹	Dominios	Quinasa Propuesta	Referencia
T219 y Y221	KD ²	MEK5	Kato <i>et al.</i> , 1997
T733, S770, S774 y S776	TAD	ERK5 (auto)	Morimoto <i>et al.</i> , 2007
T733, S770, S774 y S776	TAD	ERK5 (auto) ³	Honda <i>et al.</i> , 2015
T733	TAD	CDK5	Zhuang <i>et al.</i> , 2016
S707, T733, S754 y S774	TAD	CDK1 ⁴	Díaz-Rodríguez y Pandiella, 2010
S567, S720, S731, T733 y S803	TAD	CDK1 ⁴	Inesta- Vaquera <i>et al.</i> , 2010
T733	TAD	ERK2 ⁴	Honda <i>et al.</i> , 2015

1 Datos obtenidos de la base de datos de Uniprot con la referencia Q13164 (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13164> consultada el 7 de julio 2021). Las posiciones pueden variar con respecto a la de los estudios originales ya que se utilizan a menudo la construcción flag-ERK5 y caceren del codón de inicio. **2** KD: *kinase domain*. TAD: dominio transactivación. **3** Los sitios de fosforilación se determinaron mediante Western blot empleando un anticuerpo anti-ERK5 C-terminal. **4** Quinasa responsable de la fosforilación realizando experimentos con un inhibidor farmacológico.

La autofosforilación de la cola larga de ERK5 va a determinar su localización subcelular y su entrada al núcleo (Drew *et al.*, 2012). Cuando ERK5 no está activo, se encuentra en el citoplasma con una conformación plegada, donde el dominio N-terminal y C-terminal interaccionan a través de NES (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012). Además, las chaperonas Hsp90 y Cdc37 están unidas a ERK5 en estado inactivo, formando un complejo trimérico (ERK5-Hsp90-Cdc37) (Figura 13 vía canónica-letra A- y no canónica-letra B-). Cuando ERK5 es fosforilado por MEK5 y ERK5 se autofosforila en la región C-terminal (Figura 13 paso 1A y 2A), se produce un cambio de conformación de cerrada a abierta, donde la interacción que existía con NES se rompe, la chaperona Hsp90 que estabilizaba a ERK5 en el citoplasma, se disocia de ERK5-Cdc37 (Figura 13 paso 3A/B y 4A/B) y se produce

la translocación de ERK5 al núcleo (Figura 13 paso 5A/B). También, existe una vía no canónica de activación de ERK5, es decir, no a través de MEK5 (Figura 13 2B), que también produce la translocación de ERK5 al núcleo. Un ejemplo de ello, es el que se produce durante la mitosis. ERK5 es fosforilado en su parte C-terminal por CDK1 (Díaz-Rodríguez y Pandiella, 2010) y produce translocación al núcleo de una forma catalíticamente inactiva de ERK5 pero transcripcionalmente activa (Erazo *et al.*, 2013). Otro de los mecanismos implicados en la translocación de ERK5 al núcleo, pero no de una forma directa, es la sumoilación de los residuos Lys6 y Lys22 de ERK5 (Figura 14). Estando ERK5 en su conformación plegada es activada por MEK5 en el dominio TEY (Figura 14 paso 1), que va a permitir el reclutamiento de una SUMO E3 ligasa (no descrita) (Figura 14 paso 2), provocando la sumoilación de ERK5 en la Lys6 y Lys22. Esto ocasiona la disociación de la chaperona Hp90 (Figura 14 paso 3), la autofosforilación de ERK5 en su región C-terminal (Figura 14 paso 4) y finalmente, se produce el cambio conformacional, permitiendo su entrada en el núcleo (Figura 14 paso 5). Este último proceso, supone una conexión entre fosforilación y sumoilación (Erazo *et al.*, 2020).

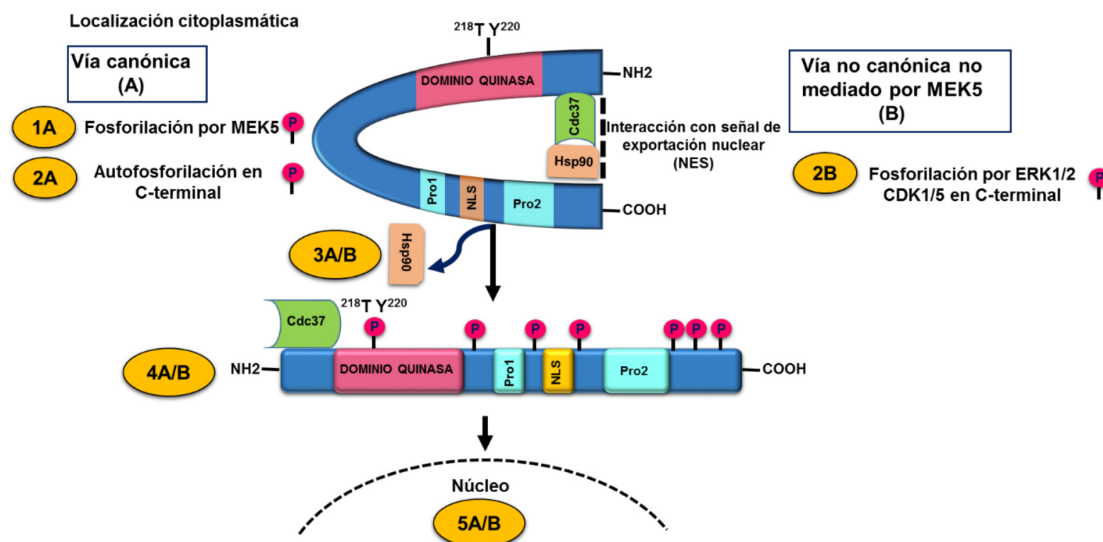


Figura 13. Esquema del mecanismo de activación de ERK5 y su localización subcelular. Se muestran dos mecanismos de activación, vía canónica (letra A) y vía no canónica (letra B). En ambas vías se indican con números el orden de los procesos que tiene lugar en ERK5, hasta llegar a su translocación al núcleo. La representación A/B juntas significa que ambas vías comparten el mismo proceso. Figura adaptada de (Erazo *et al.*, 2013; Erazo *et al.*, 2020; Pereira y Rodrigues, 2020).

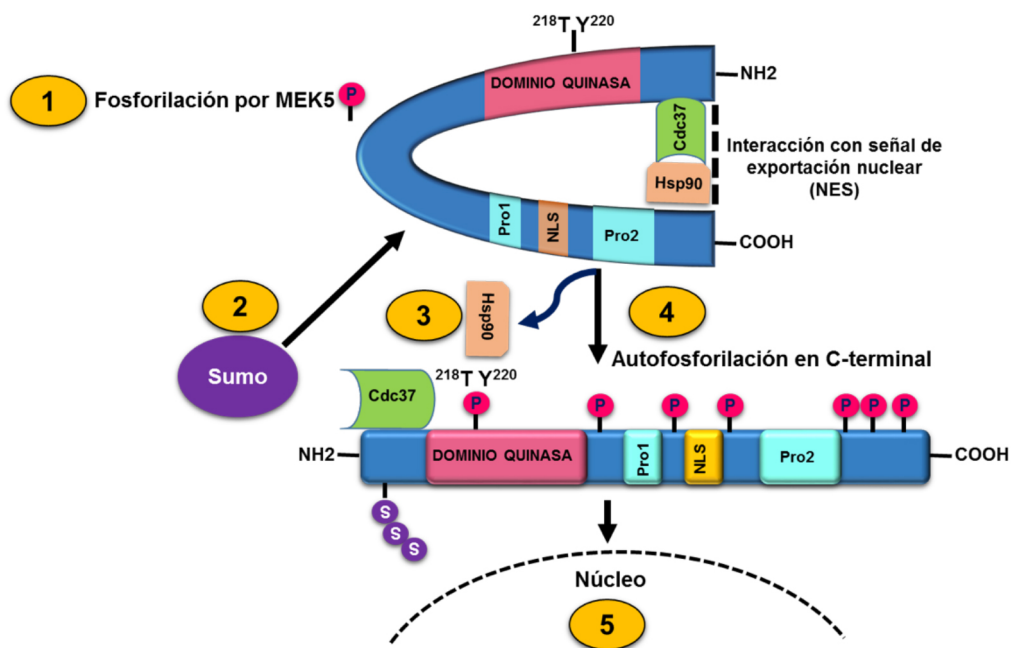


Figura 14. Esquema del mecanismo de activación de ERK5 y su localización subcelular mediada por sumoilación. Se indica con números el orden de los procesos que tienen lugar en ERK5, hasta llegar a su translocación al núcleo.

En lo referente a desfosforilación de ERK5, Arkell y colaboradores (2008) buscaron si las mismas fosfatasas de doble especificidad (DUSPs), en este caso DUBS6, que es la responsable de la desfosforilación específica del motivo TEY de ERK1/2, podrían desactivar a ERK5 ya que ambas comparten un alto grado de homología. Concluyeron que DUSP6 no desfosforilaba a ERK5. También observaron que la fosfatasa de tirosina PTP-SL [*striatal-enriched phosphatase (STEP)-like protein tyrosine phosphatase (PTP)*], podría desfosforilar a ERK5 en la tirosina del motivo TEY tanto *in vitro* como *in vivo*, reteniendo a ERK5 en el citoplasma y por tanto, impidiendo su translocación al núcleo (Arkell *et al.*, 2008).

EXPRESIÓN DE ERK5 EN TEJIDOS Y SU IMPLICACIÓN EN PROCESOS BIOLÓGICOS

ERK5 está expresado en muchos tejidos y en líneas celulares como se puede observar al consultar la base de datos ProteomicsDB (<https://www.ProteomicsDB.org>). Esta base de datos se centra en el análisis de grandes colecciones de datos proteómicos cuantitativos, mediante espectrometría de masas. Utiliza el algo-

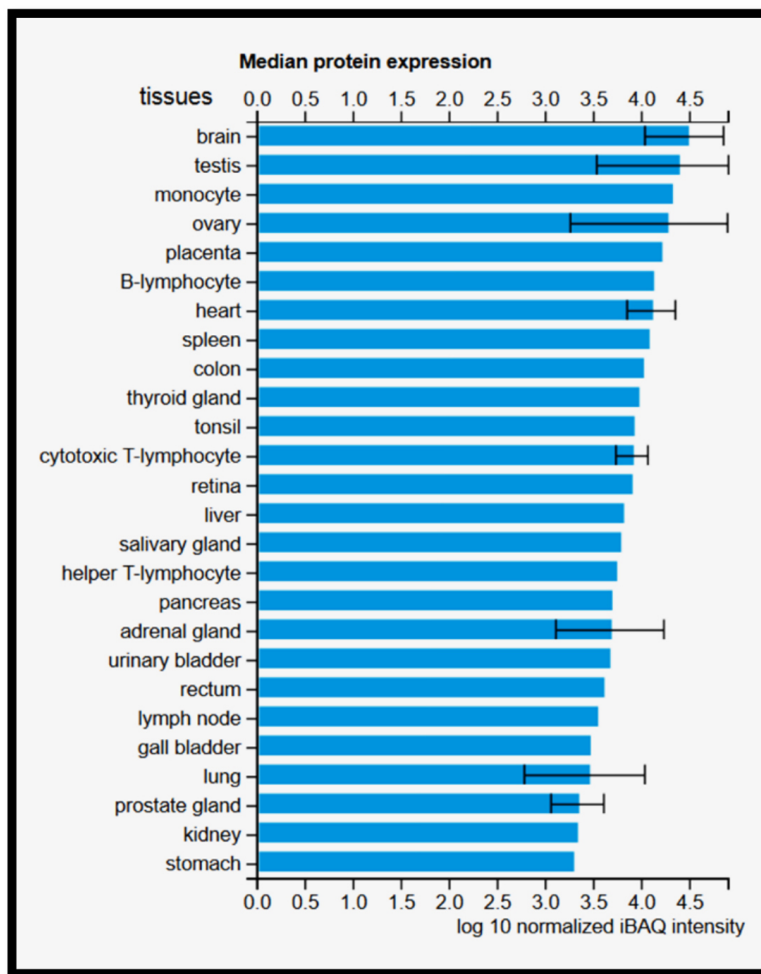
ritmo iBAQ (*intensity Based Absolute Quantification*) que consiste en sumar las intensidades de todos los picos de los péptidos que corresponden a una proteína determinada y dividirlo por el número de péptidos trípticos medibles (Krey *et al.*, 2014). En la Figura 15A (gráfica de barras) y en la Figura 15B (representación en forma de mapa de calor), se puede observar la expresión de ERK5 en los distintos tejidos normales. El tejido que presenta mayor expresión es el cerebro. La barra de error de la gráfica, indica la abundancia más baja y más alta observada para la proteína seleccionada, cuando hay múltiples mediciones para la misma muestra biológica (Schmidt *et al.*, 2018).

ERK5 está implicado en diversos procesos fisiológicos y se ha ido profundizando en su conocimiento. En un principio se pensó que la supresión de ERK5 que es letal en el embrión, era debido a defectos cardiacos, sin embargo, se descubrió que se debía a una anomalía en la formación vascular (Rose *et al.*, 2010). Otro estudio donde se realizó una mutación condicional de ERK5 en ratones, en el análisis histológico, se observó que se producían diversas hemorragias en diversos órganos. Esto era debido a que las células endoteliales que recubrían los vasos se volvían apoptóticas (Hayashi *et al.*, 2004).

ERK5 está ampliamente distribuido en varias regiones del cerebro como el hipotálamo. En base a esto, se realizó un ensayo con ratones con el sistema de la recombinasa Cre para inactivar a ERK5 en un subconjunto de neuronas hipotálamicas que expresan el receptor de la leptina (LepR). El resultado fue un fenotipo de obesidad y un mayor tamaño de los adipocitos en ratones hembras. Esto implica que ERK5 controla el peso corporal. Además, en este mismo estudio se observó un deterioro a la tolerancia a la glucosa junto con una disminución de la actividad física y del gasto energético. Por tanto, ERK5 tiene un papel importante en el balance energético (Horie *et al.*, 2019).

Otro estudio abordó la implicación de ERK5 en el desarrollo del sistema nervioso periférico (SNP), donde se concluye que ERK5 es esencial para la respuesta de supervivencia de las neuronas, al factor de crecimiento nervioso (NGF). La ausencia de ERK5 implica un aumento en la muerte celular, ya que, ERK5 suprime la transcripción de los genes *BAD* y *BIN*, a través de la vía Ca^{++}/c -AMP y los elementos de respuesta a c-AMP, CREB (*c*-AMP responde element binding) (Finegan., *et al* 2009).

A



B

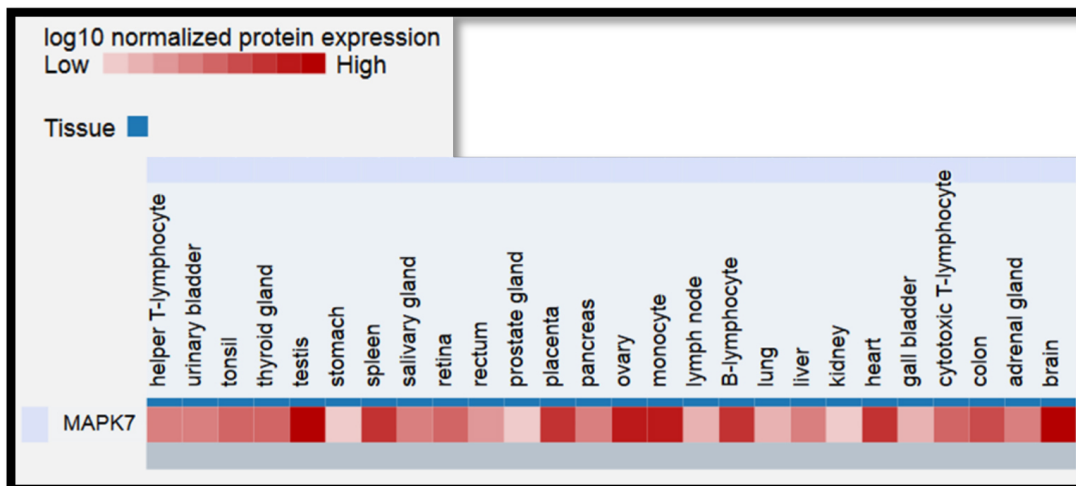


Figura 15. Gráfico de barras con la expresión de ERK5 en tejidos normales de la base de datos ProteomicsDB. Las cifras de expresión están basados en espectrometría de masas con el algoritmo iBAQ y expresados en log 10 de la mediana. **(A)** Gráfico de barras. **(B)** Mapa de calor. Figura obtenida de (<https://www.proteomicsdb.org>).

La vía de ERK5 es importante en relación a la proliferación celular. En 1998, Kato y colaboradores mostraron que la activación de ERK5 era necesario para la proliferación en células HeLa dependientes de EGF. Se induce la transcripción de c-jun a través de la activación de MEF2C (Gómez *et al.*, 2016).

Igualmente, ERK5 es esencial en el ciclo celular para la transición de G1/S. En fibroblastos humanos primarios, la pérdida condicional de ERK5, condujo a la disminución de las proteínas inhibitoras dependiente de ciclina (CDKs), p21 y p27, provocando una disminución de la estabilidad del ARNm y disminuyendo la estabilidad de la proteína (Pérez-Madrigal *et al.*, 2012). Además, ERK5 participa en la transición G1/S regulando la expresión de la ciclina D1. También, interviene en la transición G2/M. ERK5 se activa en G2/M y aumenta el índice mitótico (Gómez *et al.*, 2016).

ERK5 Y TUMOROGÉNESIS

Como se ha comentado anteriormente, ERK5 está implicado en muchos procesos fisiológicos pero también se ha descrito que puede desencadenar señales oncogénicas, promoviendo fenotipos malignos, asociados a procesos de proliferación, metástasis, inflamación y resistencia a terapias contra el cáncer (Pereira y Rodrigues, 2020).

En primer lugar, para tener una visión global de la implicación de ERK5 en cáncer, se muestra una gráfica obtenida de la base de datos *The Human Protein Atlas* <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166484-MAPK7/pathology> (Figura 16), con 17 tipos de cáncer obtenidos de TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) mediante RNA-seq. La expresión de *MAPK7* se expresa en fragmentos de kilobase por exón por millón de lecturas (FPKMs *Fragments Per Kilobase of exon per Million reads*). La mayor expresión corresponde al cáncer testicular mientras que en el cáncer de pulmón, páncreas y mama, presenta valores de 4.1, 3.8 y 3.2 FPKMs respectivamente.

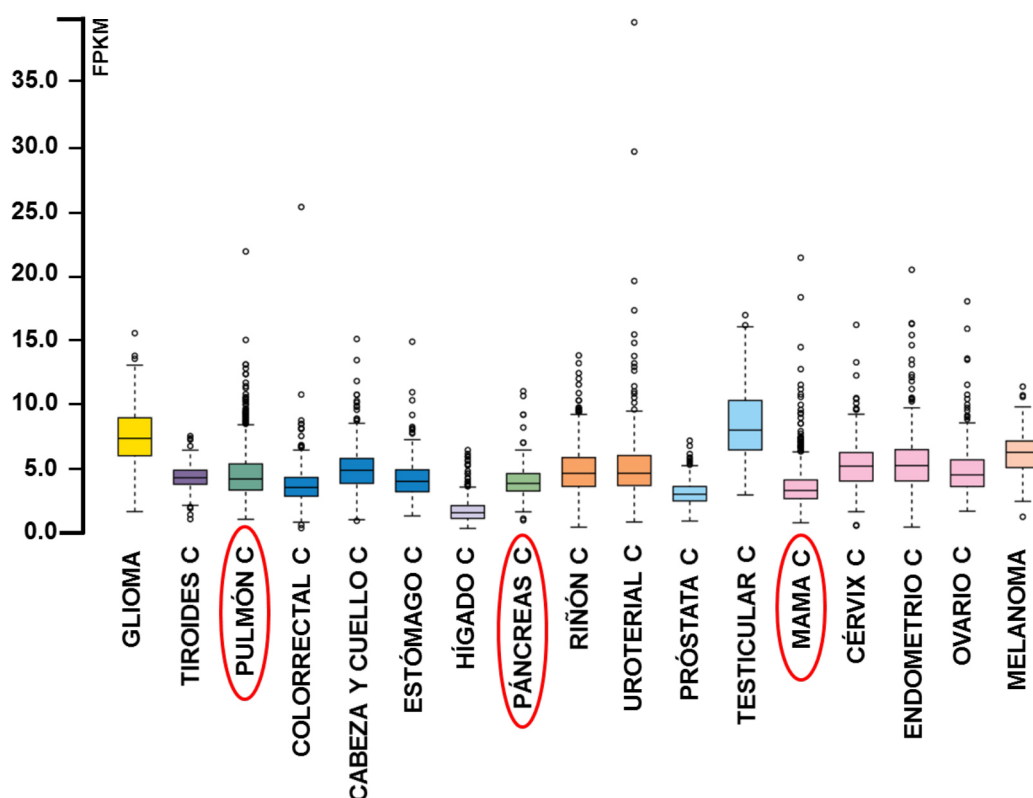
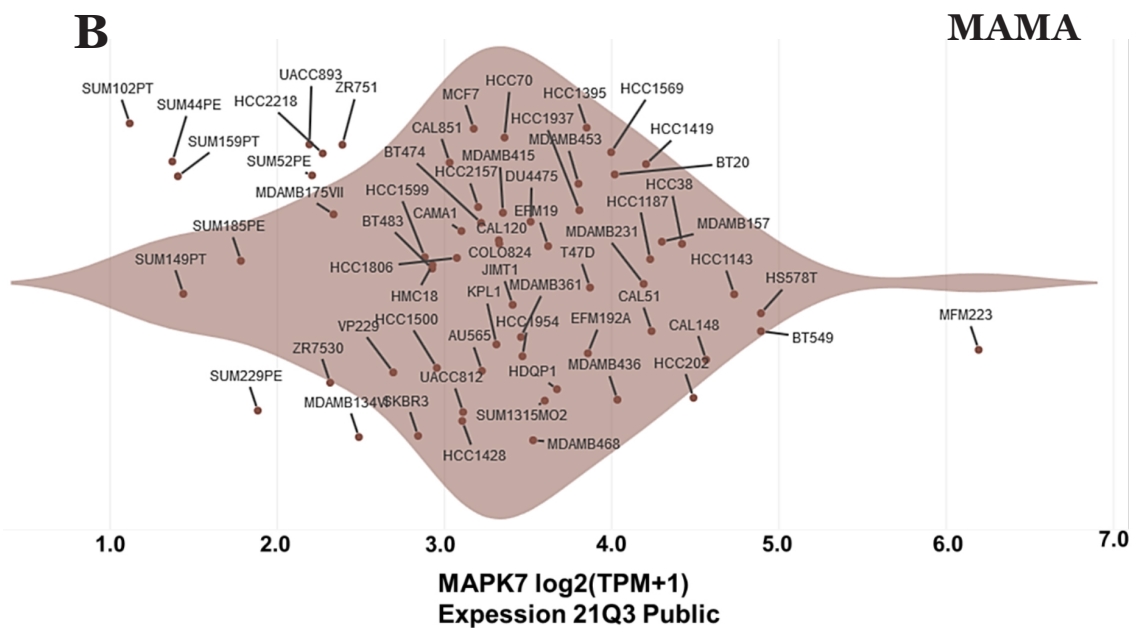
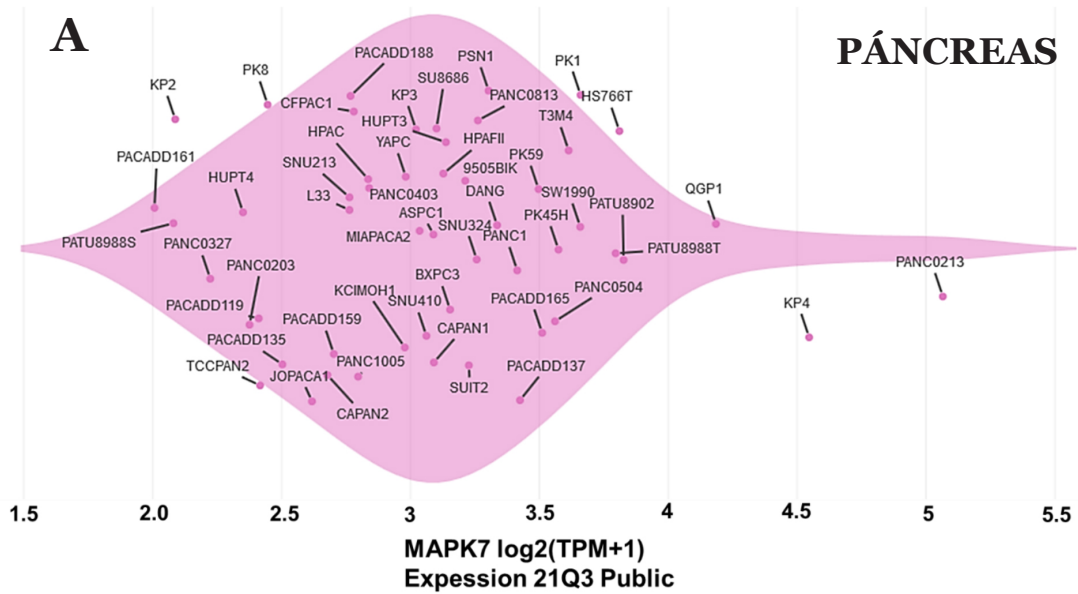


Figura 16. Datos de RNA-seq en 17 tipos de tumores humanos del TCGA obtenidos en la base The Human protein Atlas. Los datos se representan como mediana de FPKM (*Fragments Per Kilobase of exon per Million reads*). Las líneas celulares de interés en esta Tesis Doctoral se enmarcan en rojo. Los valores de las líneas tumorales de pulmón, páncreas y mama son 4.1, 3.8 y 3.2 FPKMs respectivamente. Cabe mencionar que en el cáncer de pulmón se incluyen muestras de adenocarcinoma de pulmón y de células escamosas. La letra C hace referencia a cáncer. Figura adaptada de (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166484-MAPK7/pathology>)

A continuación, se presenta la expresión de ERK5 en cáncer de páncreas, pulmón y mama (que son los tres tipos tumorales que se utilizan en esta Tesis) en función de las líneas celulares tumorales agrupadas por enfermedad primaria, disponibles en la base de datos DepMap portal (<https://depmap.org/portal/interactive/>), donde se representa la expresión de un gen en transcritos por millón TPM (*Transcripts Per Millon*). En la Figura 17A, las células tumorales de páncreas presentan una expresión de ERK5 bastante agrupada entre 2 y 4 TPM. En la Figura 17B, las células tumorales de mama, presentan una expresión más dispersa de ERK5, por la presencia de algunas líneas celulares que presentan valores extremos, y por tanto, toma un rango de valores más amplio, entre 1,5 y 5 TPM. Finalmente, la Figura 17C hace referencia a las líneas celulares de cáncer de pulmón, (se identifican solo las líneas celulares existentes en el labo-

ratorio por no recargar la figura, puesto que este linaje comprende un número muy alto de líneas celulares). Al igual que en mama, estas líneas celulares presentan valores extremos que hacen que el intervalo de valores sea mayor, entre 2 y 5,5 TPM. En general, si se excluyen las líneas celulares que están al extremo, se observa una tendencia a la concentración de los valores de TPM.



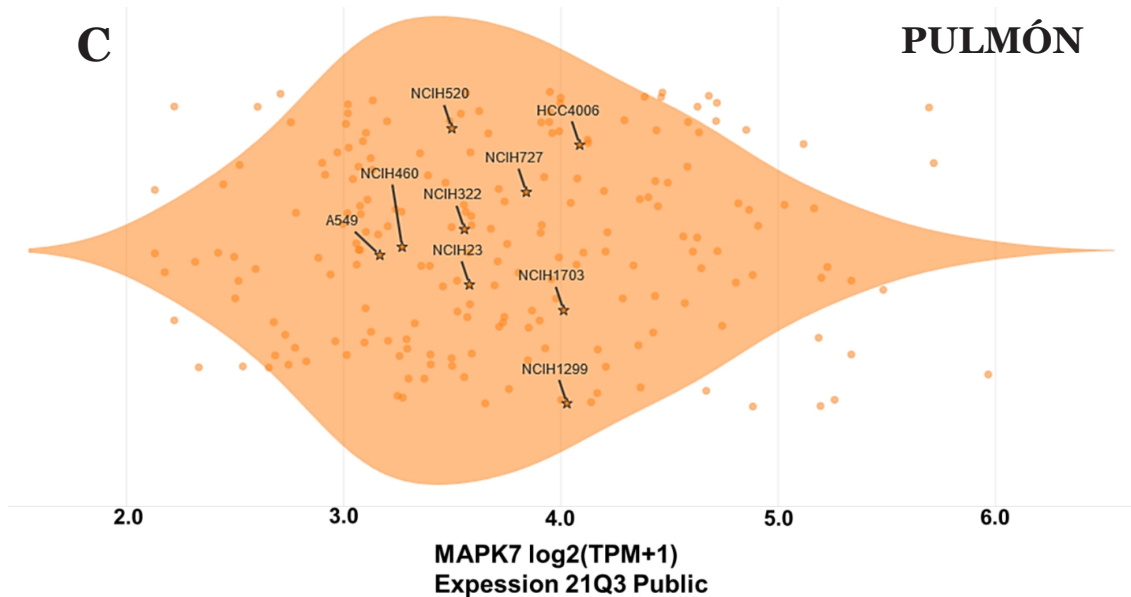


Figura 17. Expresión de RNA de MAPK7 (ERK5) en líneas tumorales de la base de datos DepMap portal (<https://depmap.org/portal/interactive/>) usando la base pública 21Q3. La expresión se representa como partículas por millón (PTM) \log_2 (TPM+1). Cada punto representa una línea celular. (A) Páncreas. (B) Mama. (C) Pulmón.

ERK5 EN EL CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas desde un punto de vista epidemiológico, supone la séptima muerte por cáncer a nivel mundial, como muestran los datos de GLOBOCAN 2020 (<https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>) (Figura 18A). Además, este cáncer ocupa la undécima posición en incidencia a nivel mundial (Figura 18B).

La incidencia y mortalidad del cáncer de páncreas se asocia con la edad, siendo ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres. Entre sus causas principales, se encuentran el tabaquismo y los antecedentes familiares. Desde un punto de vista histopatológico, el cáncer de páncreas se divide principalmente en dos tipos, el adenocarcinoma ductal de páncreas (PCDA, *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*) (el más común) que se origina en las glándulas exocrinas del páncreas y que tiene un pronóstico de supervivencia de un 24 % al año de su diagnóstico. El otro tipo es el neuroendocrino (PanNET) (el menos común) (Rawla *et al.*, 2019). Por tanto, el PCDA representa un reto en cuanto a la detección precoz ya que los pacientes presentan un estadio de la enfermedad avanzado, cuando acuden a consulta, debido a la inespecificidad de los síntomas iniciales (Avula *et al.*, 2020).

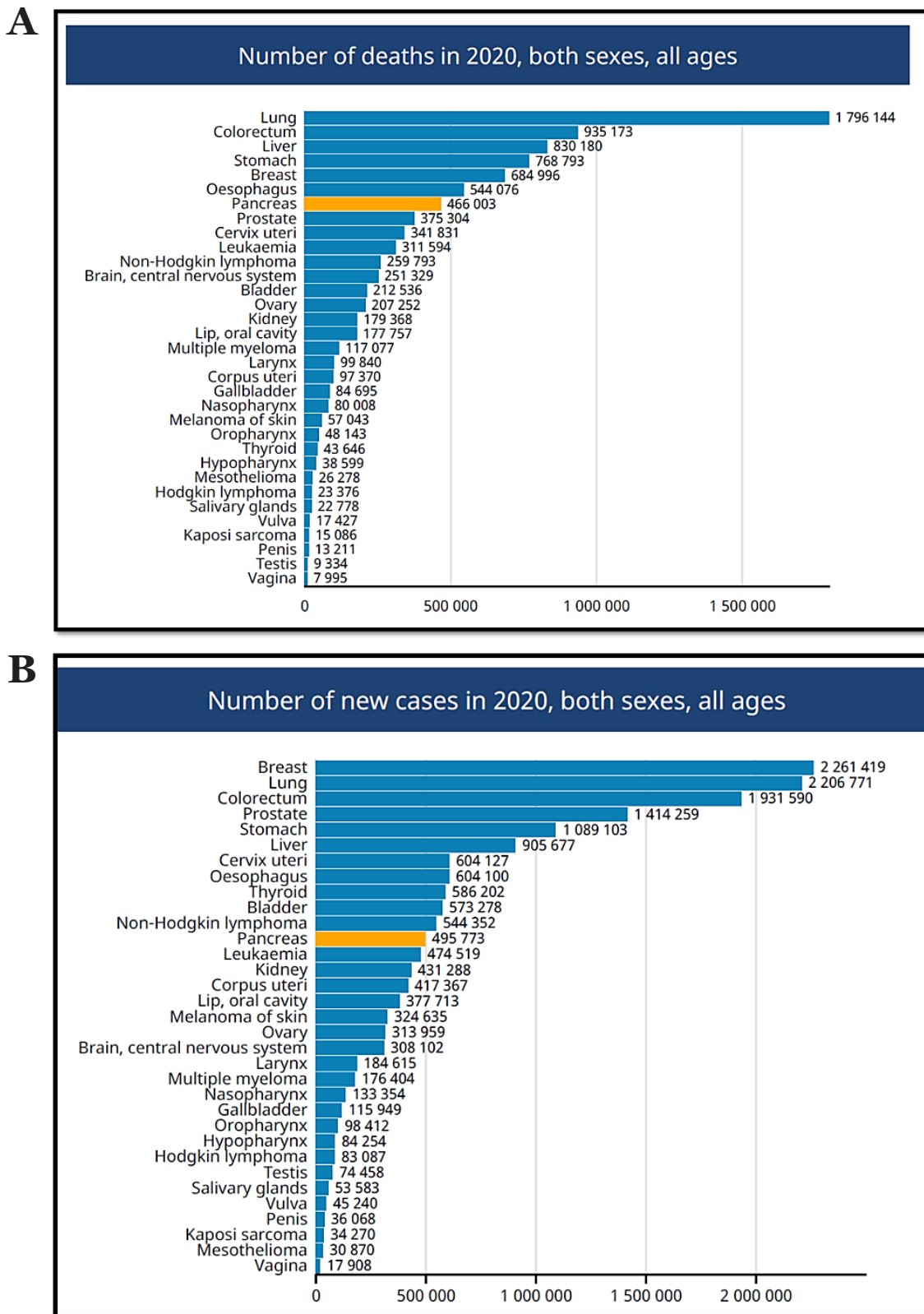


Figura 18. Gráfica de barras de la mortalidad (A) e incidencia (B) del cáncer de páncreas a nivel mundial en el año 2020. Fuente: GLOBOCAN (<https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>).

Desde un punto de vista molecular, en el PCDA se encuentran un 90 % de mutaciones del oncogén KRAS. Esto conduce a la activación de las vías RAS-RAF y PI3K-AKT que controlan el ciclo celular. También, se produce la inactivación de genes supresores de tumores como SMAD4 y p53 (Mizrahi *et al.*, 2020).

El oncogén c-Myc está implicado en el crecimiento tumoral, mediante el aumento de la replicación, la transcripción, la proliferación, la síntesis de proteínas y el aumento del metabolismo de las células tumorales (Hessmann *et al.*, 2016). La amplificación de MYC, es el marcador más común observado en la desregulación en cáncer. En un estudio de más 500 muestras de PDCA, se encontró un 14 % de amplificación de MYC, provocando un subtipo histológico más agresivo (Kalkat *et al.*, 2017).

Un estudio realizado por Vaseva y colaboradores (2018), demostraron que en el cáncer de páncreas con KRAS mutado, la regulación de MYC está controlada por ERK1/2 pero que al inhibir esta vía, existe una vía compensatoria, donde ERK5 es activado por (vía MEK5) la inhibición de ERK1/2 y como consecuencia ERK5 fosforila a MYC en la ser62, estabilizando a MYC e impidiendo su degradación. Por las consideraciones anteriores, los autores inhibieron la vía de ERK1/2 y ERK5, provocando la pérdida de MYC y por tanto la supresión del crecimiento en PDAC (Vaseva *et al.*, 2018).

Otro mecanismo en el que interviene ERK5, es a través del factor de transcripción SLUG. Este induce la transición epitelio-mesénquima y aumenta la metástasis. En este estudio observaron que en algunas líneas celulares de páncreas, la vía MEK5-ERK5 mantiene la sobreexpresión de SLUNG en células con resistencia a la inhibición de MEK1/2 (Bilal *et al.*, 2021).

ERK5 EN EL CÁNCER DE MAMA

Diversos estudios se han realizado para identificar proteínas oncogénicas ligadas al cáncer de mama. Una de estas proteínas es el oncogén receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/ErB-2, *human epidermal growth factor receptor*) que es un receptor de membrana tirosina quinasa. En 1985 se identificó este gen en células de cáncer humano y fue en 1987, cuando se describió que la amplificación de este oncogén tiene un valor pronóstico en el cáncer de

mama (Colomer *et al.*, 2001). La sobreexpresión de HER2 ocurre entre un 20-30 % de los cánceres de mama. Se observó que la activación de ERK5 podía ocurrir por la sobreexpresión de HER2. Además, se analizaron 84 muestras de pacientes de cáncer de mama y se detectó que una expresión alta de ERK5 en pacientes HER2 positivas, implicaba un peor pronóstico desde el punto de vista de supervivencia libre de enfermedad (Montero *et al.*, 2009).

Otro estudio demostró que en la línea celular MCF7 de cáncer de mama, ERK5 se activa por neuregulina (NRG), ligando de los receptores HER (Español-Ogando *et al.*, 2002). Además, en esta línea celular, se detectó que la forma dominante negativa de ERK5, provocó una disminución en la proliferación celular inducida por NRG. Asimismo, se detectó que las líneas celulares BT474 y SKBR3 presentaban una forma constitutivamente activa de ERK5 y que además, expresaban formas activas de HER2, HER3 y HER4. Cuando la línea celular BT474 fue tratada con el inhibidor de los receptores HER, (4,5-dianilinoftalimide, DAPH), se provocó la inactivación de ERK5 (Español-Ogando *et al.*, 2002). Otro estudio realizado en muestras de pacientes con TBNC, demostró que la expresión de ERK5 estaba elevado y conllevaba un peor pronóstico en pacientes con TBNC metastásico (Ortiz-Ruiz *et al.*, 2014).

El tumor de mama triple negativo es muy agresivo e invasivo. Existen datos que ERK5 puede ser una diana terapéutica importante en pacientes con esta patología (Ortiz-Ruiz *et al.*, 2014). Recientemente se ha descubierto que ERK5 es un elemento clave para mantener la capacidad invasiva en las células de cáncer de TBNC a través de la proteína quinasa de adhesión focal (FAK, *Focal Adhesion Kinase*). ERK5 media la fosforilación de FAK en la Tyr397 pero sin estar ERK5 activo. Esto hizo pensar a los autores que ERK5 pudiera ser una proteína de andamiaje (Xu *et al.*, 2021).

Otro estudio de Miranda y colaboradores (2021) realizado en muestras de pacientes de cáncer de mama de distintas características clínicas y de supervivencia, se describe las distintas localizaciones subcelulares de ERK5 fosforilado (activo). La expresión de una isoforma-3 de ERK5 promueve la acumulación de ERK5 fuera del núcleo, la migración celular y resistencia a tamoxifeno (Miranda *et al.*, 2021). Esta isoforma-3 corresponde al transcrito MAPK7-208 de la base de datos Ensembl (Figura 7).

ERK5 EN EL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón en los países desarrollados, es uno de los cánceres que son diagnosticados con más frecuencia, y que tiene una baja supervivencia global. Su gran heterogeneidad histológica, hace necesario una caracterización molecular para poder realizar una terapia personalizada (Sousa y Carvalho, 2018).

Uno de los primeros hallazgos de la posible implicación de ERK5 en el cáncer de pulmón, se encontró en ratas, cuando ERK5 se activaba por el humo del tabaco (Zhong *et al.*, 2005), y por dos mutaciones en el receptor tirosina quinasa, EGFR. Asimismo, en otro estudio, en la línea A549 y NCI-H358, se demuestra que la activación del factor de transcripción CREB vía IGF-II, estaba regulada en parte por ERK5 (Linnerth *et al.*, 2005). Estudios recientes han constatado la importancia de MEK5 (la quinasa activadora de ERK5) en el cáncer de pulmón. A través de un ratón transgénico que expresa la forma constitutivamente activa de MEK5 (MEK5DD), se observa en la necropsia que de 71 ratones, un 46,47 % mostraron cáncer de pulmón, clasificado como adenocarcinoma de grado I-II (Sánchez-Fdez *et al.*, 2019). Adicionalmente, Jiang y colaboradores (2020), observaron que ERK5 activo provocaba un aumento en la expresión del factor de transcripción USF1, como consecuencia, FAK podía aumentar su expresión y desencadenar su cascada de señalización, para promover la migración celular (Jiang *et al.*, 2020). El estudio más reciente acerca del papel de ERK5 en cáncer de pulmón, demuestra mediante estudios genéticos y farmacológicos que la vía de señalización de ERK5 es una diana terapéutica importante en este tipo de cáncer (Sánchez-Fdez *et al.*, 2021).

PAPEL DE ERK5 EN EL METABOLISMO Y EN LA MITOCONDRIA

Las células tumorales presentan el llamado efecto Warburg. Este consiste en que las células cancerosas a diferencia de las células normales, no realizan la fosforilación oxidativa para la producción de ATP, aún en condiciones de disponibilidad de oxígeno. En su lugar, las células tumorales aumentan su tasa de absorción de glucosa y la de secreción de lactato al medio (Deberardinis y Chandel., 2020). Un ejemplo de este cambio metabólico sucede en las células leucémicas, donde el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I)

[este complejo se expresa en todas las células nucleadas y presenta fragmentos de proteínas (antígenos) en la superficie celular a los linfocitos T citotóxicos (CTLs *Cytotoxic T-cells*) CD8⁺ (Neeffes *et al.*, 2011)] se ve disminuido y con ello, la presentación de lo que se llama antígenos asociados a tumores (TAAs) a los CTLs CD8⁺. En un estudio realizado, Charni y colaboradores (2010) vieron que si se forzaba a las células leucémicas a realizar la fosforilación oxidativa aumentaba la transcripción de MCH-I. También, mediante experimentos de co-trasfección de ERK5 y una forma constitutivamente activa de MEK5 detectaron un aumento de la expresión de MHC-I. Sin embargo, con el shARN de ERK5, se produjo una disminución de la expresión de MHC-I a nivel transcripcional, cuando las células leucémicas eran forzadas a una fosforilación oxidativa (OXPHOS, *oxidative phosphorylation*). Sin embargo, las células con el shERK5, mostraron un aumento de la muerte celular en las condiciones OXPHOS, indicando una alteración en la función mitocondrial. Esto indica un nexo entre las dos moléculas. Además, se localizó a ERK5 en mitocondria bajo condiciones OXPHOS (dependiendo del tipo celular leucémico) (Charni *et al.*, 2010). Esto demuestra que ERK5 es clave en el metabolismo y en la expresión de MCH-1 en condiciones normales.

La histona desacetilasa sirtuina1 de clase III (SIRT1), se caracteriza por ser una proteína que se encuentra en el núcleo celular, tener un papel clave en la biogénesis mitocondrial y ser dependiente de NADH⁺. Este estudio muestra que ERK5 activa a MEF2 para regular la actividad de SIRT1. Se detectó que tanto SIRT1 y ERK5 aumentaban su expresión en condiciones de estrés (H₂O₂). Por otro lado, el shERK5 en células leucémicas (Jurkat) revertió el efecto comentado anteriormente (Lopez-Royuela *et al.*, 2014).

Los nucleótidos son esenciales para la replicación del ADN, y una concentración incorrecta de desoxirribonucleótidos trifosfato (d-NTP), puede provocar daños en el ADN y tumorigénesis. Los tejidos hematopoyéticos contienen desoxirribonucleótidos de timidina (d-TTP) para el correcto desarrollo de los tejidos linfoides y eritroides. Una alteración de los d-TTP, puede conllevar tumorigénesis y defectos en el desarrollo hemapoyético. Los ratones con ERK5 eliminado (*knockout*), en el linaje hematopoyético, muestran alteraciones en el desarrollo eritroide en la médula ósea y mutaciones en el ADN de los progenitores eritroides por altos niveles de dTTP. También, los efectos de las disminuciones de los nive-

les de ERK5 (shARN) en células leucémicas Jurkat y conlleva un aumento de los d-TTP y por consiguiente daño en el ADN y apoptosis. Las enzimas metabólicas de los d-NTP que pueden estar relacionadas con ERK5, no se han estudiado (Angulo-Ibáñez *et al.*, 2015).

En otro estudio se analizó en células pequeñas de cáncer de pulmón (SCLC *small cell lung cancer*) con modelos celulares y murinos, su implicación en el metabolismo. Mediante análisis transcriptómicos y de pérdida de función (shARN) de MEK5 y de ERK5, se encontró una alteración en el metabolismo del colesterol, en concreto en las enzimas de la vía del mevalonato (Cristea *et al.*, 2020).

Otro proceso donde la vía de ERK5 interviene, es en la llamada mitofagia. Este proceso se basa en la autofagia dependiente de lisosoma para eliminar las mitocondrias dañadas o cuando hay un exceso de ellas. El trabajo realizado por Craig y colaboradores (2020) identifica a la vía de MEKK3-MEK5-ERK5 como reguladora de la mitofagia en ausencia de daño exógeno.

INHIBIDORES DE MEK5 Y ERK5

Los inhibidores de proteína quinasa, se clasifican en cinco grupos, atendiendo a la unión del inhibidor con la estructura de la enzima, mediante estudios cristalográficos. Los de tipo I se unen a la conformación activa de la proteína quinasa, compiten por el sitio de unión a ATP; los de tipo I1/2 se unen a la conformación inactiva de la quinasa en el motivo Asp-Phe-Gly (DFG); los de tipo II se unen a la conformación inactiva de la quinasa pero fuera del motivo DFG; los de tipo III se unen cerca del bolsillo de unión del ATP; los del grupo IV, no se unen en el bolsillo de unión del ATP; los del grupo V, se unen a sitios distintos de la proteína quinasa y los fármacos del grupo VI se unen covalentemente a su proteína quinasa diana. La clase III y IV son inhibidores alostéricos ya que, no se unen al centro activo. Por otro lado, los de tipo I y V son inhibidores reversibles (Roskoski, 2016).

Los dos primeros inhibidores descubiertos de la actividad catalítica de MEK5, sin afectar a ERK1/2, p38 MAPK y JNK, fueron los compuestos BIX02188 y el BIX02189. Los dos bloquean la fosforilación de ERK5 y la actividad trans-

cripcional de MEF2C. El BIX 02189 demuestra mayor inhibición de la actividad quinasa de MEK5 con una IC₅₀ de 1,5 nM respecto al BIX02188 con una IC₅₀ de 4,3 nM (Tatake *et al.*, 2008). También en ERK5, tiene mayor actividad inhibitoria el BIX02189 con una IC₅₀ de 59 nM en comparación con BIX02188 de 810 nM (Hoang *et al.*, 2017b). Ambos inhibidores son de clase I. Recientemente se ha desarrollado un nuevo inhibidor de MEK5, SC-1-181 (Chakrabarty *et al.*, 2018) que está en fase preclínica.

Uno de los inhibidores de ERK5 más usado en la experimentación *in vitro* e *in vivo* es el XMD8-92. Este compuesto se desarrolló a partir de un inhibidor competitivo del ATP, el BI-2356 que es un inhibidor de la quinasa serina/treonina, polo-like kinase (PLK1). Por tanto el XMD8-92 es un inhibidor de tipo I. Su descubrimiento surgió a partir de un cribado de análogos del BI-235. La especificidad del XMD8-92 se comprobó mediante un panel de 402 quinasas y contra todas las quinasas detectables en lisados de células HeLa (Hoang *et al.*, 2017). El XMD8-92 muestra la mayor afinidad por ERK5 con una constante de disociación (Kd) más baja que el resto de quinasas. En lisados de HeLa, el XMD8-92, es aproximadamente 10 veces más selectivo para ERK5 (IC₅₀ de 1,5 μM) respecto a otras quinasas, y también, muestra efectos antiproliferativos. Además, en ratones con tumores de pulmón y cervix (modelos Xenograft con A549 y HeLa) ha mostrado una inhibición del crecimiento del tumor de un 95 % (Yang *et al.*, 2010).

A partir del XMD8-92, se han desarrollado otros compuestos como los que se muestran en la Figura 19 con mayor selectividad, potencia y sin el efecto de inhibición de los brodominios (BR4). El experimento se realiza con células vivas y lisados celulares, para detectar efectos fuera de diana y la permeabilidad celular al compuesto. Los cuatro compuestos presentan una IC₅₀ entre 8 y 190 nM, siendo el más efectivo el AX15836. También, se observa que solamente los compuestos AX15836 y AX15892 tienen solo inhibición a nivel de ERK5 (Lin *et al.*, 2016).

Sin embargo, el inhibir BR4 puede ser una ventaja terapéutica, ya que, se ha visto que su inhibición, tiene un efecto sinérgico con inhibidores de quinasas en el cáncer. La proteína BR4 es un coactivador de la transcripción que tiene dos dominios de unión a lisinas acetiladas y dirigen a la proteína a la cromatina mediante la unión de las histonas acetiladas (Wang *et al.*, 2018).

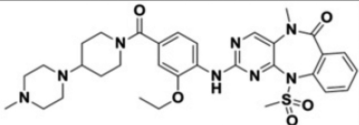
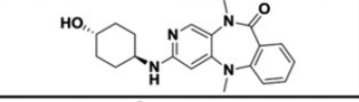
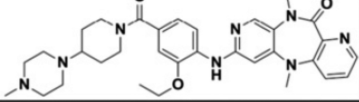
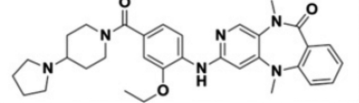
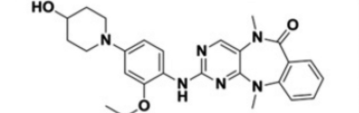
Compuesto	Estructura	Lisado ERK5 IC50 (nM)	Intra-celular ERK5 IC50 (nM)
AX15836		8	9
AX15839		170	430
AX15892		30	110
AX15910		20	17
XMD8-92		190	130

Figura 19. Estructura y potencia de los inhibidores de ERK5 en lisados celulares y células vivas (Lin *et al.*, 2016).

Otros compuestos desarrollados posteriormente al XMD8-92, son el JWG-045 y el JWG-071. Ambos son inhibidores de tipo I e inhiben a ERK5 preferentemente aunque también tienen una acción sobre la proteína quinasa *leucine-rich repeat serine/threonine* (LRR2) y sobre BR4 (Cook *et al.*, 2020).

Algunos de los efectos del XMD8-92 son la inhibición de la proliferación celular y el crecimiento tumoral. En cáncer de pulmón en A549 y LL/2 este compuesto bloquea la progresión tumoral y la angiogénesis en modelos de ratones xenograft. En cáncer de mama triple negativo, el XMD8-92 tiene sinergismo con docetacel+doxorubicin o con inhibidores de Hsp90, y reduce los tumores en modelos xenograft. En cáncer de páncreas, en modelos xenograft con la línea tumoral AsPC-1 inhibe el crecimiento tumoral (Gómez *et al.*, 2016).

2. MITOCONDRIA. VISION GENERAL

En las células vivas, el crecimiento se produce por un equilibrio entre el catabolismo y el anabolismo. El catabolismo es un proceso productor de energía, como puede ser la fosforilación oxidativa mitocondrial, que genera ATP a partir de ADP+Pi y oxida el NADH a NAD+. Por su parte, el anabolismo son rutas biosintéticas que consumen ATP y generan NADH (Figura 20) (Rigoulet *et al.*, 2020).

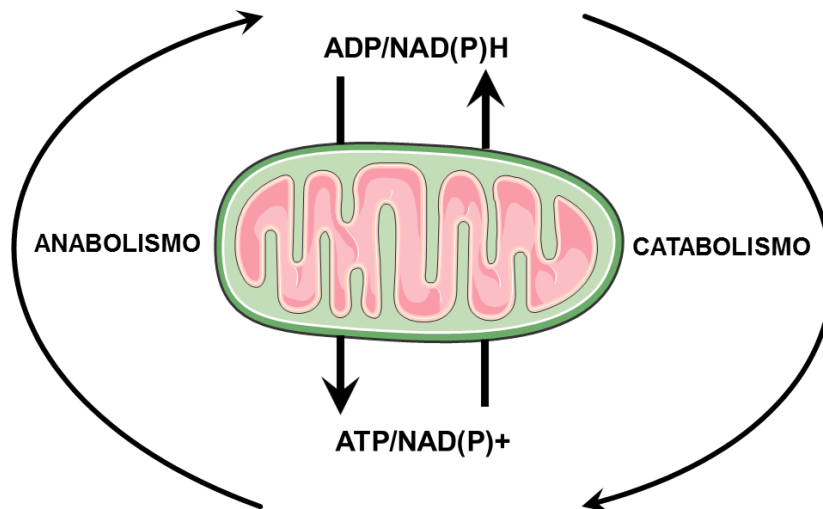


Figura 20. Metabolismo energético de la célula. Figura adaptada de (Rigoulet *et al.*, 2020).

Estructuralmente las mitocondrias tienen cuatro compartimentos, la membrana externa (OM *outer membrane*), espacio intermembranoso (IMS *intermembrane space*), membrana interna (IM *inner membrane*) y matriz mitocondrial (Figura 21). Asimismo, la membrana interna está compuesta por dos dominios morfológicos distintos, el límite de la membrana interna (IBM *inner boundary membrane*) y la membrana de la cresta (invaginaciones de la membrana), que se conectan mediante uniones estrechas y tubulares (Vogel *et al.*, 2006).

En la membrana interna y en la matriz mitocondrial tienen lugar diversos procesos entre los que se encuentran, el metabolismo energético con la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y la síntesis de ATP, el complejo F₁F₀-ATP sintasa (localizada en la cresta mitocondrial), el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA *tricarboxylic acid cycle*) o ciclo de *Krebs*, vías implicadas en el metabolismo de

aminoácidos, lípidos, nucleótidos y, los electrones obtenidos de la oxidación de los metabolitos se incorporan a la cadena respiratoria, generando un gradiente electroquímico mediante el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranoso. Este gradiente de protones impulsa a la ATP sintasa. También se incluye en la matriz y la membrana interna de la mitocondria otros procesos como la biogénesis de grupos de hierro y azufre esenciales para la viabilidad celular y además, la matriz mitocondrial tiene un sistema de expresión y mantenimiento del genoma mitocondrial. Por otro lado, la maquinaria encargada de la arquitectura y dinámica mitocondrial, que es el sistema de organización de las crestas (*MICOS mitochondrial contact site and cristae organizing system*) se localiza en las uniones de las crestas y también establece contacto con la membrana interna y externa de la mitocondria (Pfanner *et al.*, 2019).

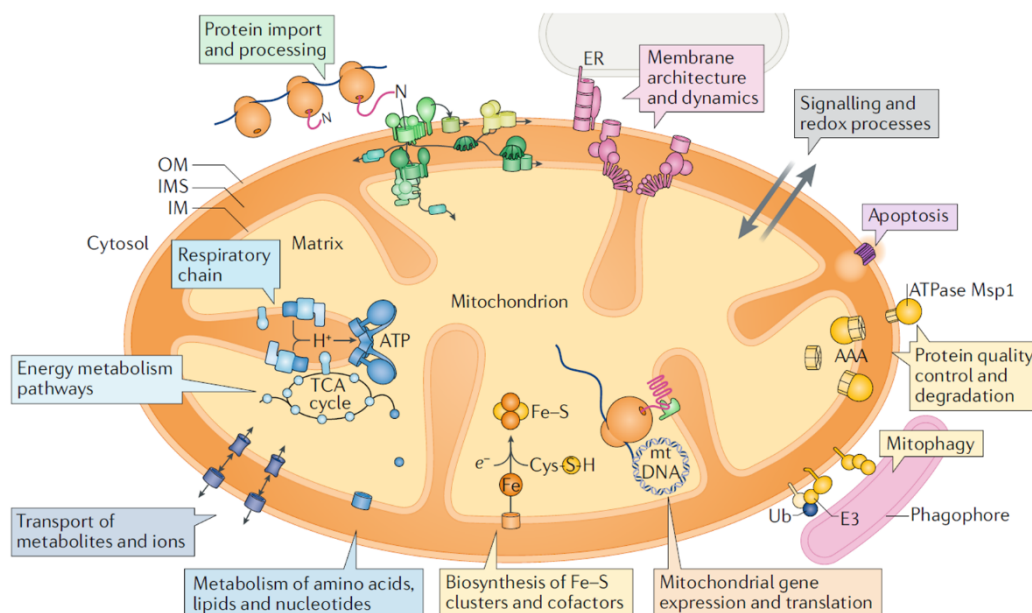


Figura 21. Estructura de la mitocondria y sus funciones. Las mitocondrias tienen cuatro compartimentos. Membrana externa (OM *outer membrane*), espacio intermembranoso (IMS *intermembrane space*), membrana interna (IM *inner membrane*) y la matriz. En la figura se indica los procesos y funciones en las que la mitocondria está involucrada. AAA hace referencia a proteasas situadas en la membrana interna mitocondrial dependientes de ATP; E3 es una ubiquitin ligasa; ER retículo endoplasmático; mtDNA DNA mitocondrial; TCA ciclo de los ácidos tricarbóxicos; Ub ubiquitina. Figura de (Pfanner *et al.*, 2019).

La membrana externa mitocondrial separa a la mitocondria del citoplasma celular, es porosa y es atravesada por iones y pequeñas moléculas sin carga, a través de los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC *voltage dependent*

anion canal). Sin embargo, las proteínas debido a su mayor tamaño, tienen que ser importadas por las translocasas (complejos proteicos) (Kühlbrandt, 2015). La membrana externa actúa como barrera de difusión y también, media la transducción de señales hacia fuera de la mitocondria. Además, la membrana límite interna alberga varios canales transportadores de iones, ATP, ADP y pequeños metabolitos entre el citoplasma y la matriz (Giacomello *et al.*, 2020).

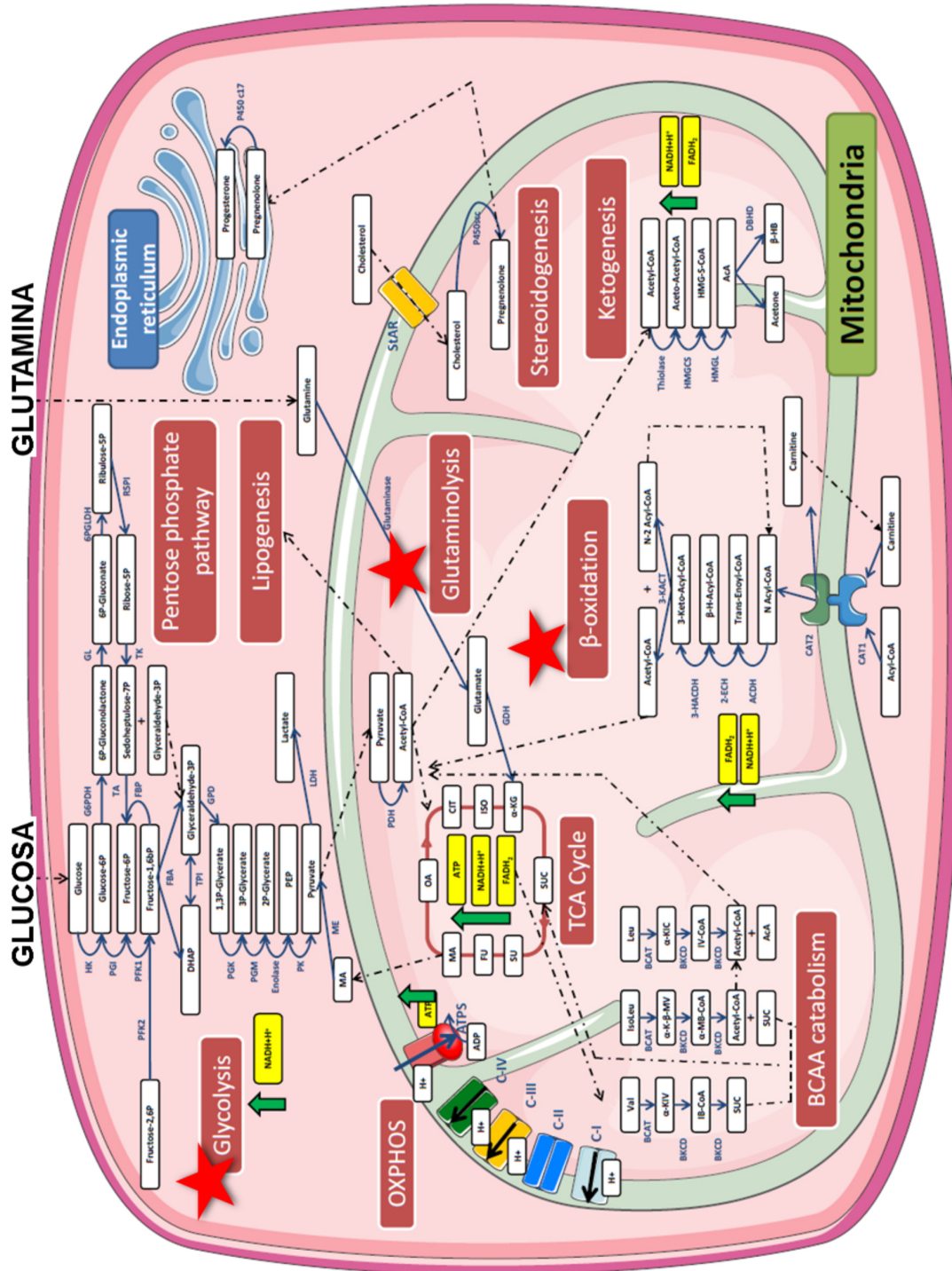
Otro aspecto relevante que tiene lugar en la mitocondria es la llamada señalización mitocondrial, diversas cascadas de señalización citoplasmáticas están conectadas con la mitocondria, como la apoptosis y la mitofagia. Asimismo, la mitocondria cuenta con proteasas (situadas en la matriz) para el recambio y eliminación de proteínas mitocondriales dañadas y también cuenta con vías de señalización ante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Pfanner *et al.*, 2019).

2.1. Metabolismo energético

Se considera a la glucosa, ácidos grasos y glutamina, los principales metabolitos utilizados como combustible por las células de mamíferos a través de las rutas de la glucólisis, β -oxidación y glutaminólisis, respectivamente (marcadas con una estrella roja en la Figura 22) (Demine *et al.*, 2014). Igualmente, estos tres metabolitos están implicados en la reprogramación metabólica que llevan a cabo las células cancerosas. Ante la mayor demanda biosintética de la célula tumoral, estos metabolitos son fuente de intermediarios del ciclo de Krebs que les permite suplir sus requerimientos para el crecimiento y división (Ruiz-Pérez *et al.*, 2014).

Como se ha comentado anteriormente, la mitocondria actúa como orgánulo clave en la bioenergética celular genera energía en forma de ATP desde la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos (Figura 22 y Figura 23). Estos compuestos se trasladan al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), en forma de acetil-CoA, que proviene del piruvato de la glucólisis, de la β -oxidación de los ácidos grasos y de la degradación de algunos aminoácidos (Spinelli y Haigis, 2018).

Figura 22. Visión general de las vías metabólicas que tienen lugar en la mitocondria. Las vías de la glu-
colisis, la glutaminólisis
y la β -oxidación (estrella
roja), son esenciales para
la obtención de energía.
La vía BCAA (*brached
chain amino acid*) hace
referencia a los aminoáci-
dos de cadena ramifica-
da, valina (Val), isoleuci-
na (Ile) y leucina (Leu).
Figura adaptada de (De-
mine *et al.*, 2014).



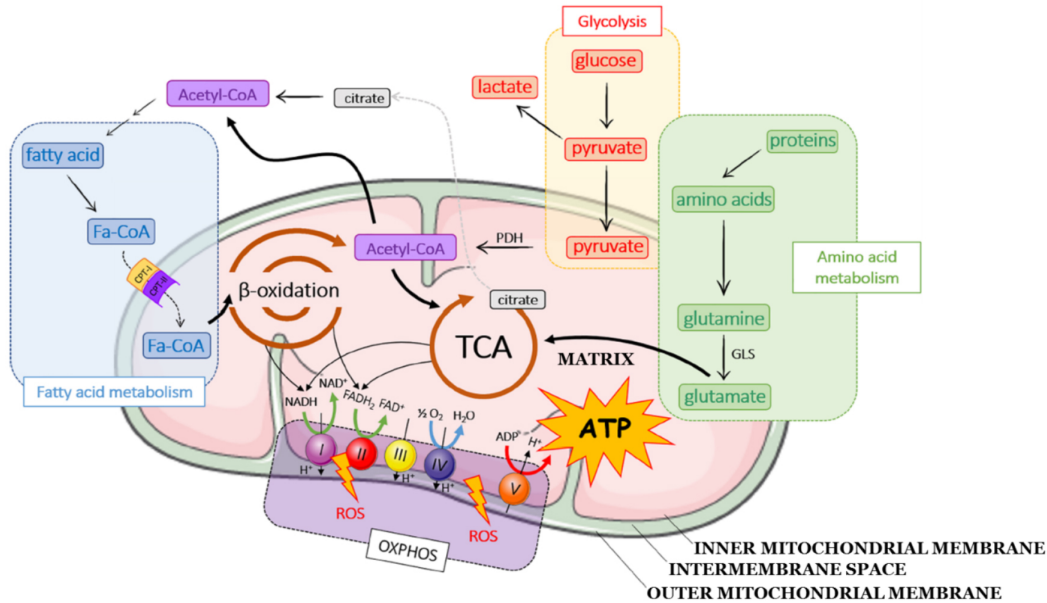


Figura 23. Principales vías de producción de energía en la mitocondria, catabolismo de la glucosa, glutamina y ácidos grasos. En condiciones de disponibilidad de oxígeno, la mayoría de las células generan ATP mediante la fosforilación oxidativa. El acetil-CoA es el compuesto que aporta el metabolismo de la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos para su entrada al ciclo de Krebs que, a través de ocho pasos, va a producir CO₂, GTP y NADPH y FADH₂. Estas dos últimas moléculas van a ceder sus electrones a los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones (ETC, *electron transport chain*). Los electrones pasan a través de los complejos III y IV, los cuales transportan protones al espacio intermembrana que van a crear un gradiente electroquímico donde el complejo V, (F₀F₁-ATP sintasa), produce la síntesis del ATP desde ADP. Figura adaptada de (Loussouarm *et al.*, 2021)

La energía celular se obtiene principalmente de la glucólisis (Figura 23) que transforma la glucosa en piruvato en el citoplasma y este entra en la mitocondria, donde se convierte en acetil-CoA por la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) y luego, este entra en el TCA (Loussouarm *et al.*, 2021). El TCA se compone de 8 pasos catalizados por enzimas diferentes que por último generan la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y flavina adenina dinucleótido reducido (FADH₂), que serán oxidados en la cadena respiratoria mitocondrial, en un proceso de conversión de energía, llamada fosforilación oxidativa (OXPHOS). Tanto el NADH y el FADH₂, se van a oxidar, cediendo los electrones a una cadena de transportadores de electrones (ETC), localizada en la membrana interna de la mitocondria. Esta cadena está formada por cuatro complejos enzimáticos (I-IV), donde el complejo IV es el que va a ceder los electrones al O₂ para formar agua. Por estos complejos pasan los electrones que crean un gradiente electroquímico de protones, generando una fuerza motriz, que el complejo V

(unidades F₁F₀-ATP sintasa), utiliza para producir el ATP desde el ADP (Benard *et al.*, 2011). El NADH entra en el complejo I, mientras que el FADH₂ entra en el complejo II.

También el acetil-CoA proviene de la oxidación de los ácidos grasos (Figura 23) cuando estos hayan atravesado la membrana mitocondrial. En primer lugar, los ácidos grasos se unen a la coenzima A para formar ácidos grasos-CoA (Fa-CoA *fatty* acil-CoA) y este, por la enzima carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I) (localizada en la membrana mitocondrial externa), se convierte en acil-carnitina. En la mitocondria la enzima carnitina palmitoiltransferasa II (CPT-II) (localizada en la membrana mitocondrial interna), separa la carnitina de acil-carnitina y une CoA. El acetil-CoA procedente de la β -oxidación entra en el TCA (Xiong, 2018).

Por otro lado, los aminoácidos (Figura 23) según su esqueleto carbonado sufrirán distintos destinos, los aminoácidos llamados cetogénicos se transforman a acetil CoA mientras que los aminoácidos glucogénicos se convierten en glucosa, piruvato o un intermediario del TCA. En el caso de la glutamina, por la enzima glutaminasa se convierte a glutamato que se cataboliza en el TCA (Loussouarm *et al.*, 2021). Esta vía de la glutamina será explicada en detalle más adelante.

3. LA GLUCÓLISIS Y EL EFECTO WARBURG

Como se mencionó anteriormente, la glucólisis es un proceso donde una molécula de glucosa es degradada a dos moléculas de piruvato (Figura 24). En condiciones de disponibilidad de oxígeno, el piruvato entra en la mitocondria, se oxida en el ciclo de Krebs y produce NADH y FADH₂, que entran en la cadena transportadora de electrones para también oxidarse. La producción neta de la oxidación de la glucosa rinde 30-32 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Sin embargo, en condiciones anaeróbicas, el piruvato no entra en la mitocondria sino que a través de la enzima lactato deshidrogenasa, se convierte en lactato en el citoplasma (Figura 22, 23 y 24). Esta reacción, produce solo dos moléculas de ATP pero genera el cofactor NAD⁺, que es esencial para mantener la glucólisis. Aunque la glucólisis anaeróbica parezca poco productiva frente a la glucólisis aeróbica (2 ATP frente a 30-32 ATP, respectivamente), hay que tener

en cuenta que la glucólisis anaeróbica es alrededor de 100 veces más rápida que la fosforilación oxidativa (Figura 24) (Melkonian y Schury, 2021).

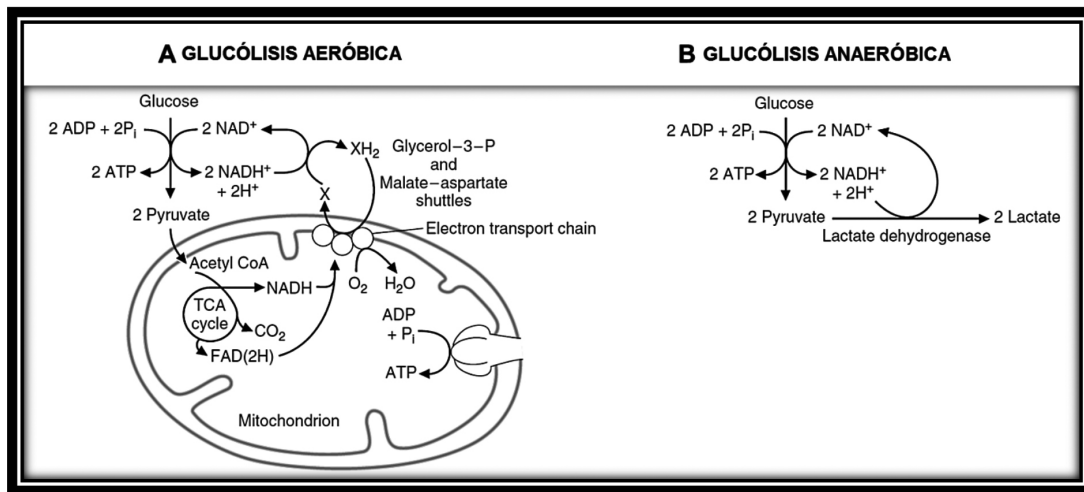


Figura 24. Destino del piruvato generado en la glucólisis. (A) Glucólisis en presencia de oxígeno. Las dos moléculas de piruvato generadas en la glucólisis entran en la mitocondria para oxidarse en el ciclo de Krebs, generando CO_2 , H_2O y los reductores equivalentes NADH y FADH_2 , que finalmente entran en la cadena transportadora de electrones para oxidarse. (B) Glucólisis en condiciones anaeróbicas. El piruvato se reduce a lactato en el citosol. Esta reacción necesita NADH . Figura adaptada de (Marks *et al.*, 2005).

Uno de los conceptos claves para entender el metabolismo tumoral, es que las células cancerosas promueven la producción de biomasa frente a la generación de energía. La base de estas afirmaciones se sustenta en las observaciones de Louis Pasteur y Otto Warburg. Por un lado, en la década de 1880, Pasteur demostró que el oxígeno podía suprimir la glucólisis o la fermentación en levaduras (Wolpaw y Dang, 2018). Por otro lado, en la década de 1920, Otto Warburg descubrió que las células tumorales consumen grandes cantidades de glucosa y la transforman principalmente a ácido láctico a pesar de la presencia de oxígeno (Figura 25). Esto le hizo plantearse que el problema surgía de la alteración de la respiración mitocondrial: “*The aerobic glycolysis of the tumour cell is derived in any case from a disturbance of the respiration*” (Obre *et al.*, 2014).

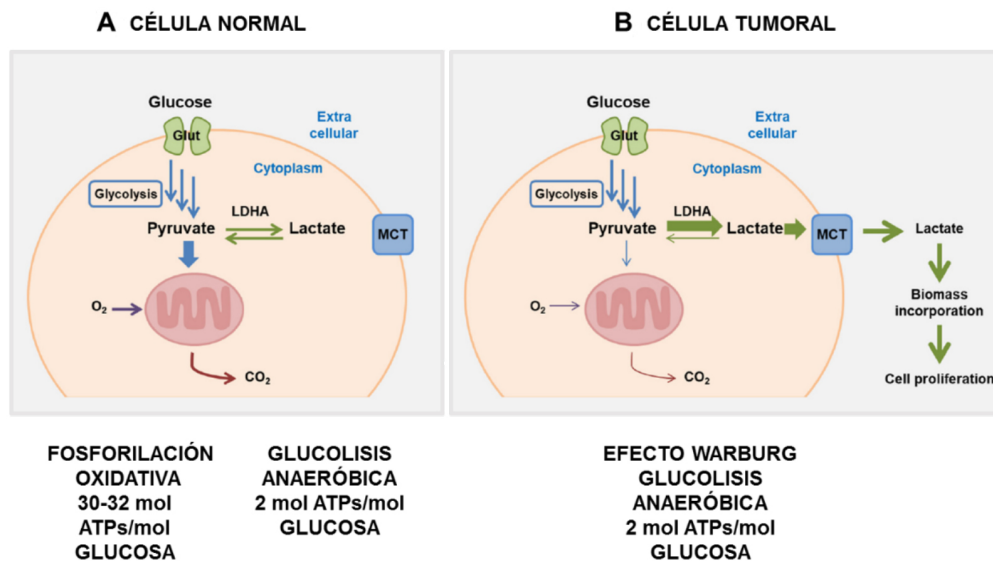


Figura 25. Glucólisis en presencia o ausencia de oxígeno en la célula normal y tumoral. (A) En la célula normal la presencia de oxígeno conlleva la oxidación completa de la glucosa mediante la fosforilación oxidativa con producción de 30-32 moléculas de ATP por molécula de glucosa. En la misma célula normal, en ausencia de oxígeno, el piruvato es transformado a lactato y transportado a través de la membrana plasmática por el de transportador monocarboxilato *MCT* (*monocarboxylate transporters*). En este caso se producen dos moléculas de ATP (B) La célula tumoral incluso en la presencia de oxígeno, utiliza la vía de producción del lactato, con un rendimiento de dos moléculas de ATP pero se incrementa la fabricación de biomasa y por tanto promueve la proliferación celular. Figura adaptada de (Kim y Baek, 2021).

Esta hipótesis de un fallo en la respiración en la célula tumoral, ha ido cuestionándose desde la década de 1950, donde Chance y colaboradores mostraron que los citocromos de las células tumorales estaban en perfecto estado y eran funcionales. Lo que sí está claro es que el efecto Warburg y con mitocondrias funcionales, no es solamente una adaptación a la hipoxia. Actualmente, es considerado un rasgo (*hallmark*) del cáncer. Este cambio metabólico se adquiere muy pronto en la oncogénesis e incluso antes que las células tumorales estén privadas de oxígeno. Sin embargo, estudios realizados en este siglo, han demostrado que en ciertos tipos de tumores, las mutaciones en las enzimas mitocondriales, como fumarato hidratasa, succinato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa, implican un daño en la respiración mitocondrial. Por tanto, la teoría de Otto Warburg del fallo en la respiración mitocondrial no estaba del todo equivocada. Por último, es importante reseñar que el efecto Warburg, forma parte de una reprogramación metabólica en la que interviene una cascada de señalización para mantener este fenotipo glucolítico (Figura 26) (Vaupel y Multhoft, 2021).

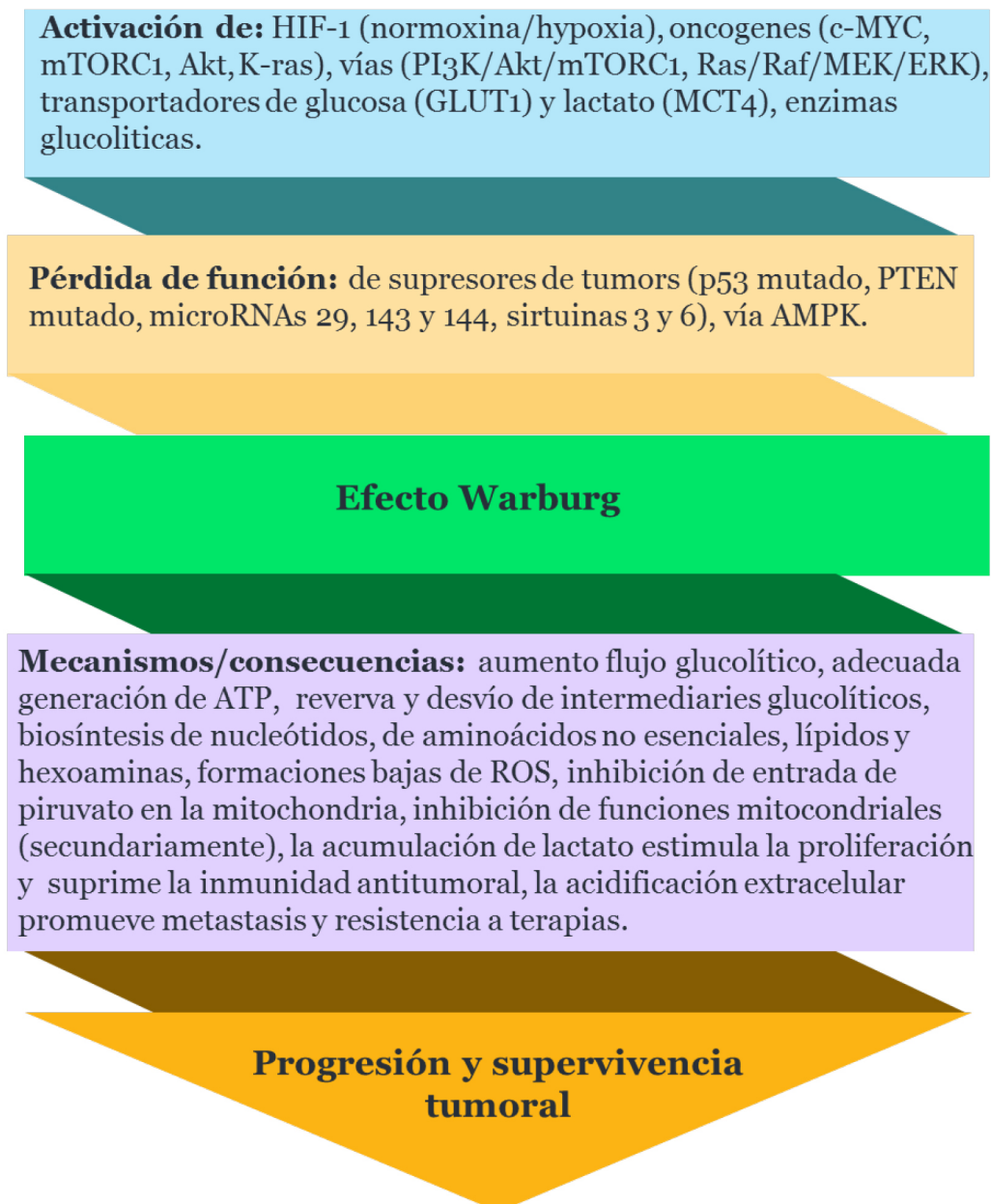


Figura 26. Efecto Warburg. Reprogramación metabólica en la célula tumoral. Figura adaptada de (Vaupel y Multhoft, 2021).

4. METABOLISMO DE LA GLUTAMINA

Los primeros estudios de la glutamina se remontan a 1935, cuando Hans Krebs publicó el primer artículo en *Biochemical Journal*. Descubrió que para la síntesis de la glutamina se necesita energía (Cruzat y Newsholme, 2017), además, describió dos tipos de una enzima que hidroliza la glutamina a glutamato y amonio (NH_4^+), que se diferenciaban en su pH óptimo y su inhibición por ácido glutámico, era la enzima glutaminasa, tipo hígado (*liver type* GLS2) y tipo cerebro (*brain type* GLS). También realizó experimentos con riñón de rata y parecía expresar ambos tipos de glutaminasa (Krebs, 1935). En el año 1956, Eagle evidenció que la glutamina era esencial para el crecimiento celular y también que es el aminoácido no esencial que más utilizan las células en cultivo (Cruzat y Newsholme, 2017). La L-glutamina es precursor de proteínas, síntesis de amino azúcares y purinas y pirimidinas para la síntesis de ácidos nucleicos y nucleótidos. El producto directo de la glutamina es el glutamato, en una reacción catalizada por la enzima glutaminasa, que está en altas concentraciones asociada a las mitocondrias. El L-glutamato es el aminoácido intracelular más abundante (Newsholme *et al.*, 2003), mientras que en el medio extracelular el aminoácido más abundante es la L-glutamina y, se calcula que constituye un 20 % de los aminoácidos libres en sangre y un 40 % en músculo (Altman *et al.*, 2016). La glutamina y el glutamato son aminoácidos de cinco carbonos. El glutamato presenta un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) en su cadena lateral y la glutamina un grupo amino ($-\text{NH}_2$) en su cadena lateral, esta característica explica el distinto transporte de estas moléculas y por tanto, su repercusión en la función de la célula. Una de las enzimas que intervienen en la síntesis de la glutamina es la glutamina sintetasa mitocondrial (GS) dependiente de ATP que cataliza la reacción de glutamato a glutamina (Cruzat y Newsholme, 2017) (Figura 27). La glutamina tiene funciones específicas, el grupo amino de la glutamina (Figura 27 círculo amarillo) le permite ser una fuente de nitrógeno para diversas macromoléculas. Además, la glutamina entera, presenta otras funciones esenciales como síntesis de proteínas, activación de mTOR, regular el pH y detoxificación del amonio (NH_3).

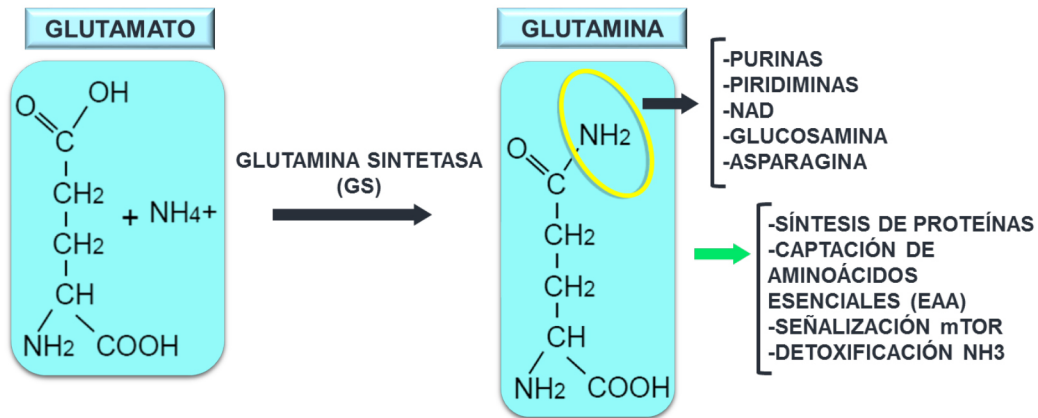


Figura 27. Síntesis de la glutamina desde glutamato por la enzima glutamínasa sintetasa (GS). El grupo amino de la glutamina contribuye a procesos celulares distintos de los que participa la molécula entera. Figura adaptada de (Bott *et al.*, 2019).

Por su parte, la glutamina dentro de la mitocondria, produce glutamato y NH₄⁺ en una reacción catalizada por la enzima glutaminasa (GLS), (como se verá en el siguiente apartado). El glutamato interviene en diversas funciones como síntesis de glucosa, de proteínas, glutatión, prolina, ornitina, arginina, entre otros.

4.1. Glutamina en cáncer

El proceso fisiológico explicado anteriormente, se ve alterado en el proceso tumoral, sus requerimientos de carbono y nitrógeno son mayores para mantener su crecimiento (Altman *et al.*, 2016). Por tanto, la vía de la glutamina se ve alterada, donde la glutamina contribuye hacia la formación de biomasa y donde también existe una regulación oncogénica. Se ha demostrado que c-MYC se une transcripcionalmente a las regiones promotoras de los transportadores de glutamina SCL1A5 (también conocido como ASCT2) y SN2 (también conocido como SCL38A5) y conduce a una mayor captación de glutamina (Yang *et al.*, 2017). Asimismo, en células tumorales transformadas con el oncogén K-RAS, muestran una utilización mayor de la glutamina para la síntesis anabólica (Gaglio *et al.*, 2011). Otras funciones de la glutamina en la regulación tumoral, pueden ser, en primer lugar, la presencia de altos niveles de glutamina que se asocian con una mayor actividad de mTOR (Matés *et al.*, 2020). En segundo lugar, la entrada de glutamina en células de cáncer de ovario, puede activar a ERK1/2 y este fosforila

a la Ser 727 de STAT3 que provoca el aumento de la actividad de los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones. Además, la entrada de la glutamina en el ciclo de Krebs puede activar a la Tyr de STAT3 y este, regular transcripcionalmente genes relacionados con la metástasis (Yang *et al.*, 2017). En tercer lugar, recientemente se ha demostrado que la expresión de una variante del transportador SLC1A5 que está mediada por HIF-2 α (factor de transcripción inducible por hipoxia) genera una reprogramación metabólica de la glutamina en células de cáncer de páncreas (Yoo *et al.*, 2020).

5. GLUTAMINASA Y LA VÍA DE LA GLUTAMINOLISIS

La enzima glutaminasa (GLS/GLS2) es una aminohidrolasa (EC 3.5.1.2) mitocondrial que lleva a cabo la hidrólisis del grupo amida de la glutamina para dar cantidades estequiométricas de glutamato y del ion amonio (NH₄⁺) (Márquez *et al.*, 2010) (Figura 28). Además, estudios realizados en 1949 por Errera y Prenestino en extractos de riñón, hígado, cerebro y bazo, fueron los primeros en utilizar el término glutaminasa activada por fosfato (inicialmente llamada glutaminasa I). En mamífero la glutaminasa, requiere fosfato inorgánico para su activación (de la Rosa *et al.*, 2009) y se nombra como glutaminasa activada por fosfato (PAG) (Aledo *et al.*, 1994).

El término glutaminolisis fue acuñado por primera vez por McKeehan en 1982, para describir la ruta de conversión de glutamina a piruvato y este a lactato, en células proliferativas (Márquez *et al.*, 2015). El lactato tiene un papel importante en la progresión tumoral ya que, la disminución del pH extracelular, contribuye a la invasión y progresión (Ruiz-Pérez *et al.*, 2014). La glutaminolisis supone una vía de aporte de energía en células normales y transformadas. La enzima mitocondrial que inicia esta vía es la glutaminasa (Márquez *et al.*, 2016). La regulación de la glutaminolisis puede variar entre especies, tejidos y tipo celular. Sin embargo, diversos estudios apuntan a que el transporte mitocondrial puede ser un paso limitante (Márquez *et al.*, 2015). En las células tumorales, la glutaminolisis no solo implica el concepto canónico de producción de lactato, sino que además, esta vía iniciada por GLS/GLS2 (su regulador principal) se considera una parte del metabolismo que va a sustentar el metabolismo tumoral (Ruiz-Pé-

rez *et al.*, 2014). Como se comentó anteriormente, el efecto Warburg que ocurre en la glucólisis, implica el desvío del piruvato a la formación de lactato en vez de utilizarse en el ciclo de Krebs. Esto implica que la célula tumoral, debe cubrir la demanda de precursores biosintéticos y, para ello, se emplea la glutaminólisis (Jin *et al.*, 2016). Por tanto, las células cancerosas son adictas a la glutamina por ser una fuente indispensable de energía y biosíntesis. La glutaminólisis sirve de donador de nitrógeno para la síntesis de purinas y pirimidinas, así como precursora de biosíntesis de proteínas y de glutatión (Li *et al.*, 2021).

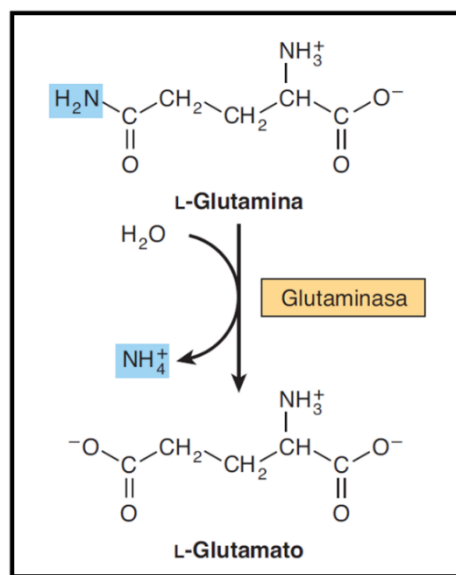


Figura 28. Reacción catalizada por la enzima glutaminasa. La reacción tiene lugar en la matriz mitocondrial. La glutaminasa, cataliza la reacción donde la glutamina sufre una desanimación hidrolítica, se elimina el nitrógeno amida, liberando amonio (NH_4^+) y produciendo glutamato. El recuadro azul indica la parte de la molécula donde se produce cambio químico (H_2N) y el producto que se libera como consecuencia de la hidrólisis (NH_4^+). Figura de (Murray *et al.*, 2012).

En la Figura 29, se muestra un esquema básico de la reprogramación de la glutamina en la célula tumoral para cubrir sus mayores demandas de biomasa y energía. De forma sucinta, la glutamina es transportada al interior de la célula por diversos transportadores SLC1A5, SLC38A1 y SLC38A2 (Yoo *et al.*, 2020), siendo el más estudiado SLC1A5. Una vez dentro, la glutamina puede ser utilizada para la biosíntesis de nucleótidos y para la síntesis de uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNac), necesaria para el tráfico y plegamiento de proteínas. La glutamina, puede ser convertida a glutamato por la glutaminasa (GLS o GLS2). El glutamato puede contribuir a la formación de glutatión (an-

tioxidante). Además, el glutamato se convierte en α -cetoglutarato por la enzima glutamato deshidrogenasa, codificada por el gen *GLUD* en una reacción que libera amonio (NH_4^+). Asimismo, las enzimas aminotransferasas pueden convertir el glutamato en α -cetoglutarato más un α -aminoácido. El α -cetoglutarato entra en el ciclo de Krebs, proporcionando energía y el oxalacetato (OAA) puede convertirse en aspartato para contribuir a la síntesis de nucleótidos (Altman *et al.*, 2016). Por otro lado, el malato puede salir de la mitocondria y por acción de la enzima málica produce NADPH y piruvato. Este último, se convierte en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (glutaminolisis) (Li *et al.*, 2016). Otra posibilidad, es la llamada carboxilación reductora (RC) donde el α -cetoglutarato puede retroceder hacia atrás en el ciclo de Krebs para producir citrato y contribuir a la lipogénesis (Altman *et al.*, 2016).

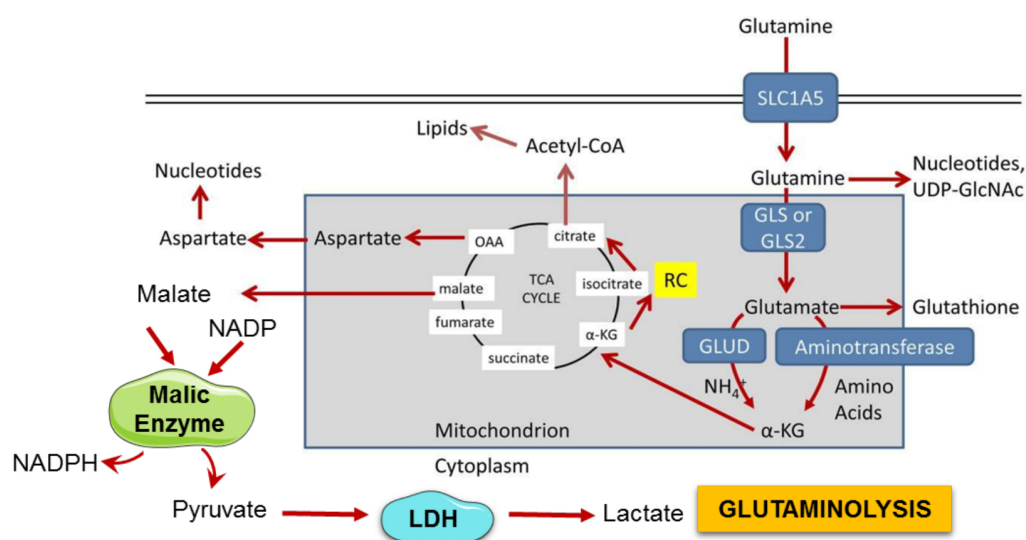


Figura 29. Esquema básico de la reprogramación de la ruta de la glutamina/ glutaminolisis en células tumorales. La glutamina entra en la célula por el transportador SCL1A5, donde va a contribuir a la formación de nucleótidos, síntesis de uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). La glutamina a través de la enzima glutaminasa (GLS/GLS2) produce glutamato. Este último se transforma en α -cetoglutarato que entra en el ciclo de Krebs. Los distintos intermediarios del ciclo proporcionan, por un lado, aspartato para la síntesis de nucleótidos y por otro lado, malato que produce piruvato y NADH a través de la enzima málica. El piruvato a través de la enzima lactato deshidrogenasa produce lactato (glutaminolisis). Otra posibilidad en la vía es la llamada carboxilación reductora (RC) donde el ciclo de Krebs retrocede, es decir, el isocitrato pasa a citrato para la síntesis de acetil-CoA y lípidos. Figura adaptada de (Altman *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016).

5.1. Genes y transcritos de la glutaminasa

En humanos la glutaminasa está codificada por dos genes, *GLS* y *GLS2*. Estos genes presentan distintas características moleculares, cinéticas y sus interacciones con otras proteínas. La expresión de cada uno de ellos depende del tipo de tejido, ambiente y estado metabólico de la célula (Matés *et al.*, 2018).

El gen *GLS* está localizado en el cromosoma 2 (Aledo *et al.*, 2000) tiene 82 kb y 19 exones (Figura 30). Del ajuste alternativo se producen 3 transcritos, glutaminasa de tipo riñón (*K-type*) KGA, la glutaminasa C o GAC y glutaminasa de músculo GAM. El transcrito KGA es el más largo (transcrito canónico) que fue aislado por primera vez en cerebro y riñón de rata (Campos-Sandoval *et al.*, 2015) y está formado por la unión de los exones del 1-14 más los del 16 al 19, careciendo del exón 15. Por su parte GAC fue descrito por primera vez en células de cáncer de colon (Campos-Sandoval *et al.*, 2015) y el transcrito está formado por la unión de los exones del 1 al 15. El tercer transcrito GAM, surge de la inclusión del intrón (forma de ajuste alternativo en los mamíferos) 2-3 y, difiere de KGA/GAC a partir del residuo aminoacídico 162 (Katt *et al.*, 2017). Además, parece que no tiene actividad glutaminasa (Elgadi *et al.*, 1999).

El gen *GLS2* está localizado en el cromosoma 12 (Aledo *et al.*, 2000) y tiene 18 kb y 18 exones (Márquez *et al.*, 2016). Este gen, tiene dos transcritos, uno la glutaminasa B o GAB (transcrito canónico) que es el más largo y fue aislado en células de cáncer de mama ZR-75 (Campos-Sandoval *et al.*, 2015). El transcrito surge de la unión de los 18 exones. El otro transcrito de glutaminasa tipo hígado, LGA, fue clonado desde hígado de rata (Campos-Sandoval *et al.*, 2015) y, está formado por las 71 bases finales del intron 1-2 y todos los exones del 2 al 18 (Katt *et al.*, 2017) (Figura 30).

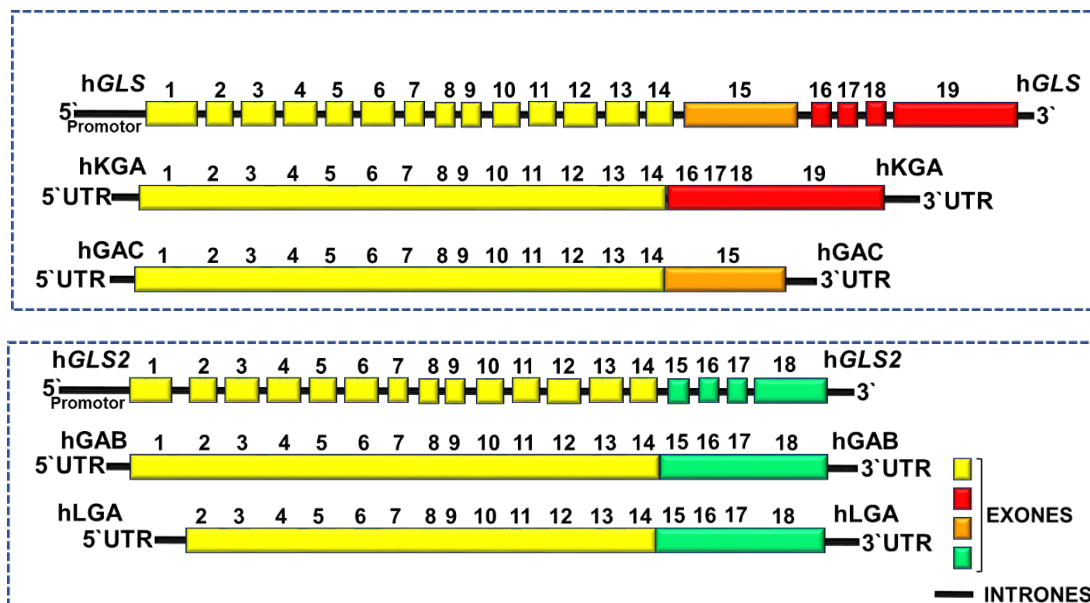


Figura 30. Estructura y transcritos de los genes hGLS y hGLS2. En la parte superior se muestra el gen *GLS* y en la inferior el gen *GLS2*. El gen *GLS* tiene 19 exones que produce dos transcritos, hKGA que deriva de los exones 1-14 y 16-19, mientras hGAC se forma con los exones 1-15. Los números indican los exones (amarillo, rojo, naranja y verde), la línea negra indica intrones. Figura adaptada de (Márquez *et al.*, 2016).

A nivel de secuencia aminoacídica si se realiza un alineamiento múltiple de *GLS2* (GAB, LGA) y *GLS* (KGA y GAC) humanas con la herramienta *Clustal Omega* de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Figura 31), se observa identidad aminoacídica (representada por un asterisco). Este análisis permite saber el grado de conservación entre las distintas proteínas.



Figura 31. Alineamiento múltiple de las isoformas de los genes *GLS2* (GAB, LGA) y *GLS* (KGA y GAC), con la herramienta bioinformática *Clustal Omega* del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Los identificadores de cada proteína se han obtenido del NCBI de la base de datos *Protein*. El asterisco (*) indica residuos idénticos; los dos puntos (:) residuos con características muy similares y un punto (.) residuos con pocas propiedades similares. Los residuos en rojo tienen la propiedad de ser hidrofóbicos y pequeños; el azul son residuos ácidos y el verde con grupo funcional hidroxilo, sulfidrido y amina.

Para poder cuantificar el porcentaje de identidad, se recurre al visor MView del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/>) sobre este mismo análisis, que permite cuantificar el porcentaje de identidad tomando como referencia una de las proteínas. En este caso, se calcula el porcentaje de identidad (pid) tomando de referencia a la secuencia de GAB. También se muestra el porcentaje de cobertura del alineamiento (cov). Como se muestra en la Figura 32.

			cov	pid
GAB	1	NP_037399.2	100.0%	100.0%
LGA	2	ADR77821.1	93.9%	95.5%
KGA	3	NP_055720.3	100.0%	61.4%
GAC	4	NP_001243239.1	88.2%	55.3%

Figura 32. Alineamiento múltiple de *GLS2* (GAB y LGA) y *GLS* (KGA y GAC) con la herramienta MView del EMBL-EBI. Se toma como referencia a la proteína GAB. Se muestra los valores de identidad (pid) y la cobertura del alineamiento (cov) en porcentaje.

5.2. Estructura y características moleculares de *GLS* (KGA Y GAC)

La isoenzima KGA tiene una longitud de 669 aminoácidos que codifica un precursor de 74 kDa. Los 16 primeros aminoácidos forman una α -hélice anfipática que funciona como señal mitocondrial para translocarse a la mitocondria. Las proteasas de la matriz mitocondrial eliminan esta señal, produciendo una forma madura de 66 kDa después de un segundo corte después del aminoácido 72 (Curthoys, 2017).

La isoenzima GAC es más corta que KGA, tiene 598 aminoácidos con una cola C-terminal única, que hace diferenciarse de KGA desde el aminoácido 551 al 598. También, se transloca a la mitocondria para sufrir un proceso parecido al de KGA y, obtener una forma madura de 58 kDa (Curthoys, 2017).

Ambas isoenzimas presentan, la región N-terminal en la que se encuentran los 72 aminoácidos para el procesamiento mitocondrial (como se ha indicado arriba). A continuación, está el motivo de interacción con receptores nucleares (138-144 aa) que comprende la secuencia LXXLL, y el dominio glutaminasa

(244-530 aa) que es donde reside la actividad catalítica. A continuación, exclusivamente en KGA hay tres repeticiones de anquirina (556-656 aa), que son módulos de 33 residuos de interacción con proteínas y además está la caja KEN y D que es reconocida por la ubiquitina E3 ligasa del Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma APC/C-Cdh1 del ciclo celular (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*), que tiene como diana a KGA para su degradación por el proteosoma (Figura 33) (Thangavelu *et al.*, 2012).

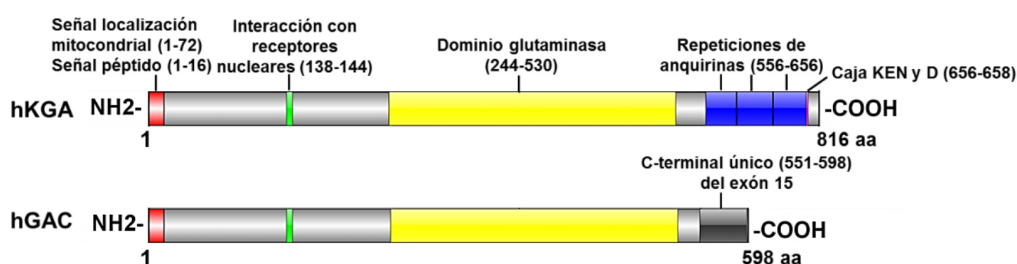


Figura 33. Dominios y motivos de las isoenzimas humanas KGA y GAC. Las dos isoenzimas presentan desde el aminoácido 1 al 550 la misma estructura. La señal de localización mitocondrial (1-72 aa), incluyendo la señal péptido (1-16 aa) que va a ser la que dirija la proteína a la mitocondria. Además, comparten el motivo de interacción con receptores nucleares (138-144 aa) y el dominio glutaminasa (244-530 aa) con actividad catalítica. La hKGA codifica para 816 aminoácidos siendo la canónica y más larga. Presenta tres repeticiones de anquirina (556-656 aa) y las cajas KEN y D (656-658 aa) que son motivos que reconoce el complejo APC/C-Cdh1. hGAC comprende 598 aminoácidos con una cola única (551-598 aa) que la diferencia de KGA. La estructura se ha dibujado conforme a la información obtenida de (Thangavelu *et al.*, 2012).

GLS (KGA/GAC) está formada por cuatro monómeros y puede existir en forma dimérica (inactiva) o tetramérica (activa). Un cambio conformacional es necesario para su actividad catalítica. El fosfato inorgánico (Pi), en condiciones *in vitro*, es el que va a facilitar la activación y por tanto la formación del tetrámero. El equilibrio entre tetrámero y dímero es dosis dependiente de Pi. Sin embargo, se ha demostrado que incluso en ausencia de Pi y aumentando la concentración de enzima GAC está puede oligomerizar (Márquez *et al.*, 2016). Además, un estudio realizado mediante mutagénesis de GAC, ha demostrado que la estructura tetramérica no es indispensable para la actividad enzimática (Li *et al.*, 2016).

La actividad de la glutaminasa puede ser inhibida por el inhibidor competitivo glutamato ya que, la glutamina y el glutamato se unen al mismo sitio activo (Curthoys, 2017). Asimismo, el citrato, protones, calcio e intermediarios del ciclo de Krebs pueden regular la actividad de KGA y GAC (Xu *et al.*, 2018).

Estudios cristalográficos han determinado el sitio de unión del sustrato al centro activo y a los bolsillos alostéricos entre los dímeros de GLS para poder inhibir la actividad de la proteína (Figura 34). El sitio activo tiene carácter básico y la glutamina (sustrato) establece enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con Gln285, Ser286, Asn335, Glu381, Asn388, Tyr414, Tyr466 y Val484 (Xu *et al.*, 2018).

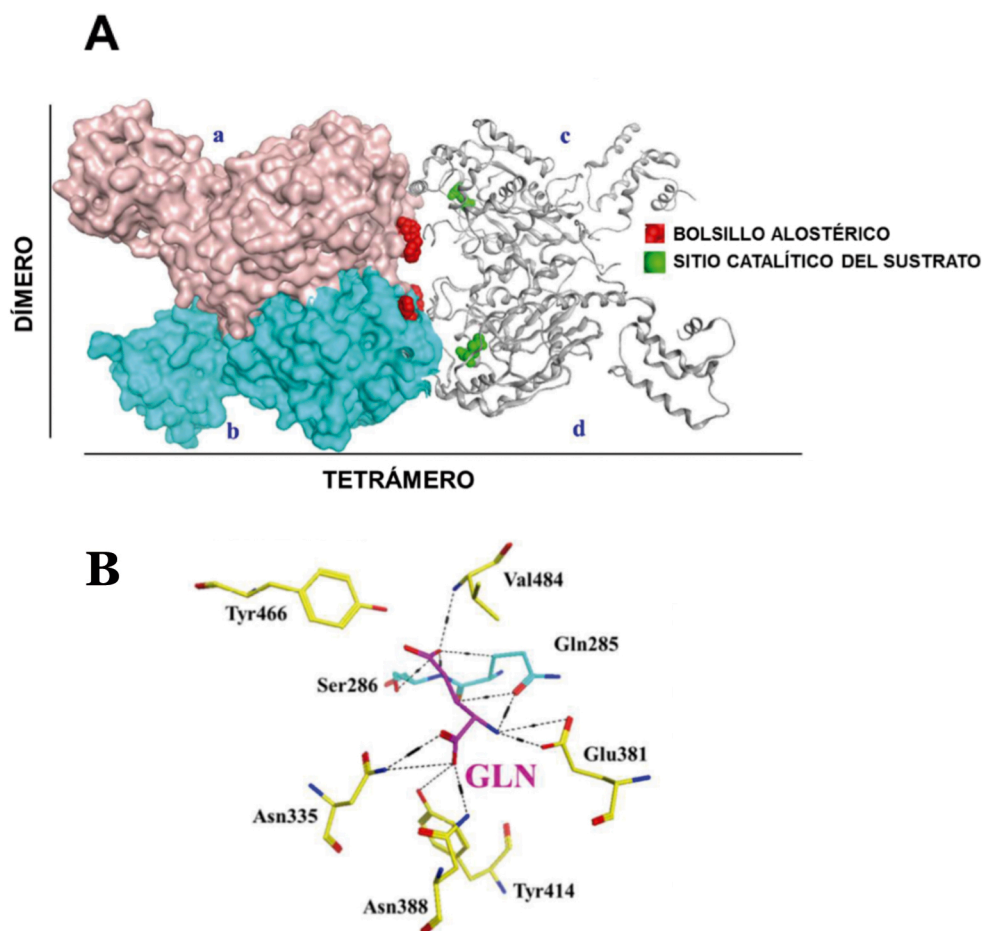


Figura 34. Estructura tetramérica de GLS con los sitios de unión del sustrato y los bolsillos alostéricos. (A) Se muestran cuatro monómeros (a, b, c, d). Se forman dos dímeros, a+b y c+d y el tetrámero a+b+c+d. En verde se muestra el sitio catalítico del sustrato y en rojo los sitios de unión alostérico para pequeñas moléculas, para inhibir la actividad enzimática, formando un tetrámero inactivo. **(B)** Unión del sustrato con los residuos claves. La glutamina se representa en varillas rosa. Los enlaces de hidrógeno se muestran en líneas de puntos. Figura adaptada de (Xu *et al.*, 2018).

5.3. Expresión de GLS (KGA/GAC) en tejidos normales

GLS (KGA/GAC) al igual que ERK5 está expresada en muchos tejidos normales. Se consultó la base de datos ProteomicsDB (<https://www.ProteomicsDB.org>)

donde el análisis de datos corresponde a grandes colecciones de proteómicos cuantitativos, mediante espectrometría de masas. Se realiza una búsqueda por separado de la expresión de las isoenzimas KGA y GAC y, se muestra un mapa de calor con el valor del iBAQ (*intensity Based Absolute Quantification*), que consiste en sumar las intensidades de todos los picos de los péptidos que corresponden a una proteína determinada y dividirlo por el número de péptidos tripticos medibles (Krey *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos indican que la expresión es muy parecida entre KGA y GAC (Figura 35).

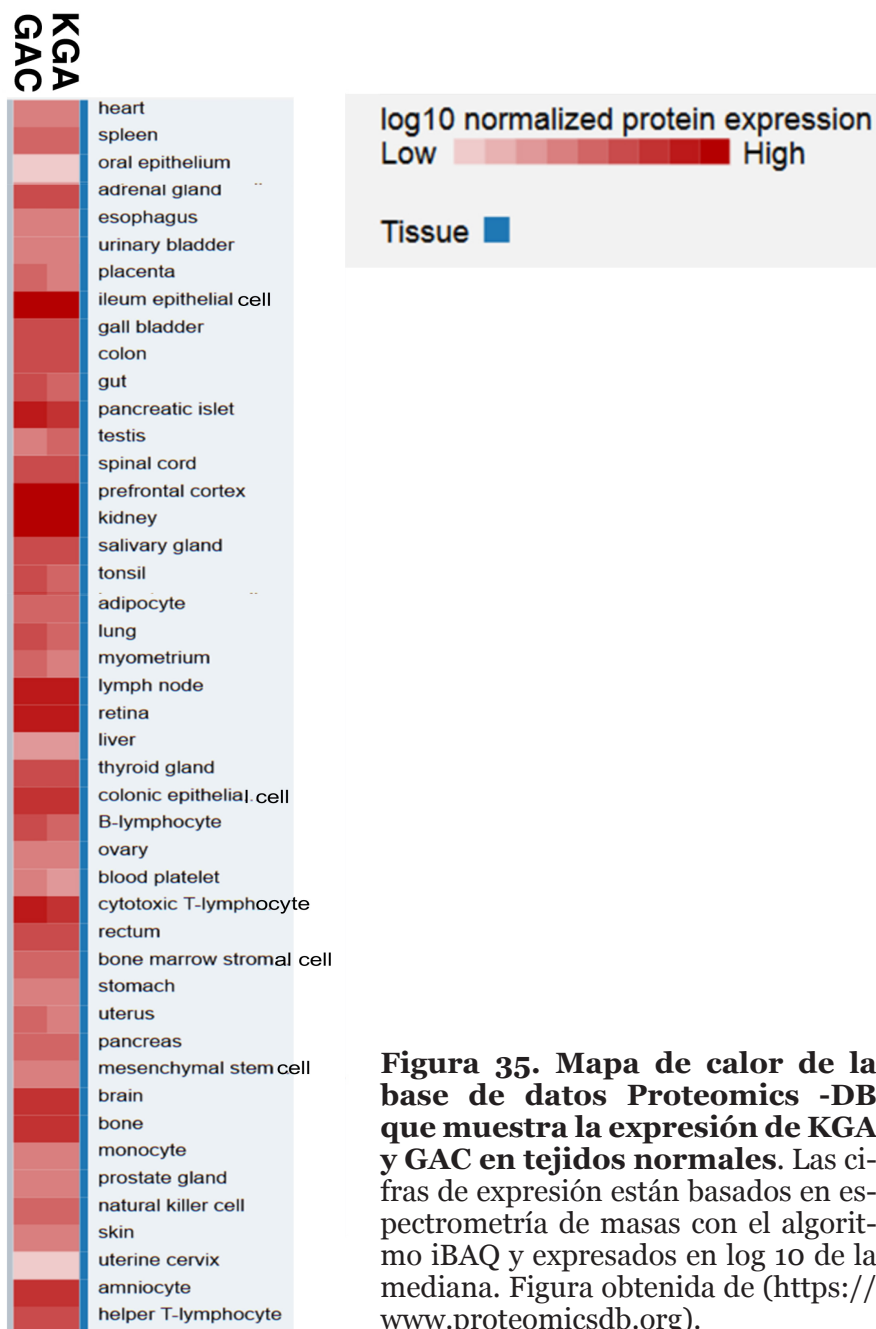


Figura 35. Mapa de calor de la base de datos Proteomics -DB que muestra la expresión de KGA y GAC en tejidos normales. Las cifras de expresión están basados en espectrometría de masas con el algoritmo iBAQ y expresados en log 10 de la mediana. Figura obtenida de (<https://www.proteomicsdb.org>).

5.4. GLS (KGA/GAC) en la tumorigénesis

Diversos estudios han demostrado que GLS está regulada al alza en leucemias, gliomas, melanomas, páncreas, pulmón y mama (Zhang *et al.*, 2019). En la Figura 36, se observa un análisis realizado en la base de datos *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115419-GLS/pathology>) en 17 tipos de cáncer obtenidos del TCGA mediante RNA-seq. La expresión de GLS se expresa en unidades de fragmentos de kilobase por exón por millón de lecturas (FPKM *Fragments Per Kilobase of exon per Million reads*), que permite comparar muestras al estar normalizados. La mayor expresión se presenta en el cáncer renal con 25,4. A nivel de cáncer de pulmón, páncreas y mama, presenta valores de 9,7, 9 y 6 FPKMs respectivamente.

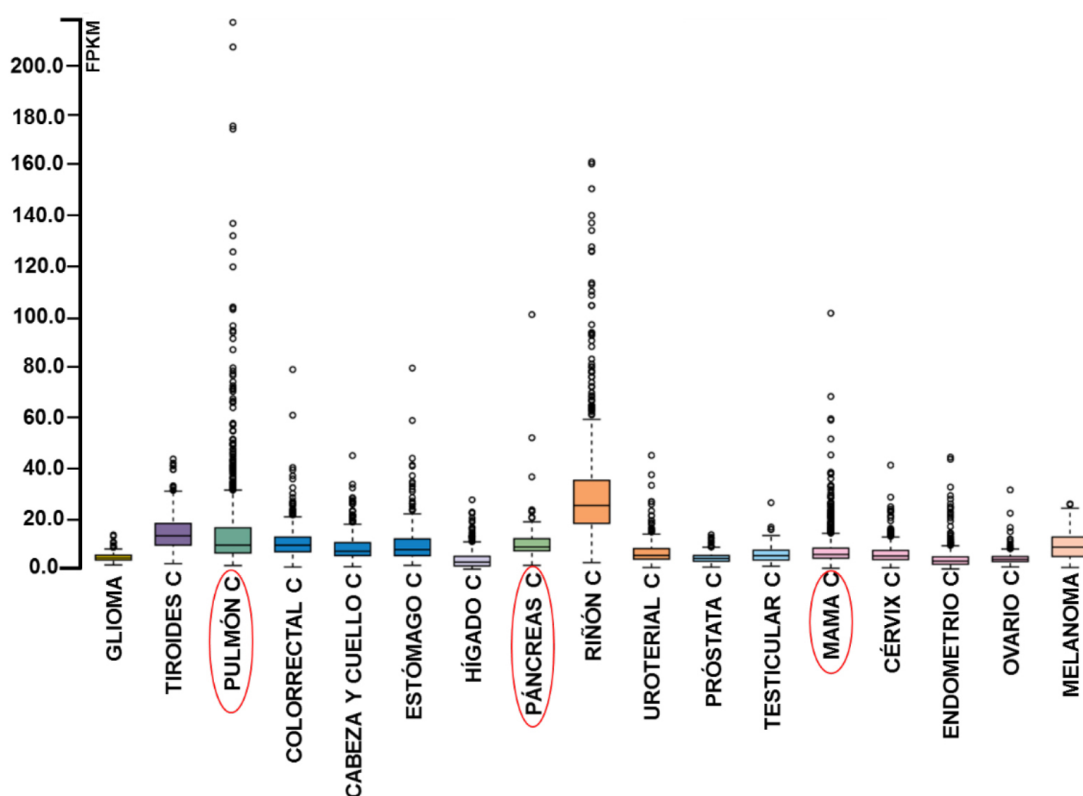


Figura 36. Datos de RNA-seq en 17 tipos de tumores humanos del estudio TCGA obtenidos en la base de datos The Human Protein Atlas. Los datos se representan como mediana de FPKM (*Fragments Per Kilobase of exon per Million reads*). Los tipos de cáncer de interés en esta Tesis Doctoral se enmarcan en rojo. Los valores de las líneas celulares tumorales de pulmón, páncreas y mama son 9,7, 9 y 6 FPKMs respectivamente. Figura adaptada de (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115419-GLS/pathology>).

Diversos oncogenes y supresores de tumores regulan la expresión de GLS (Figura 37) (Zhang *et al.*, 2019). Los miRNAs regulan a GLS y el primero que se descubrió fue el miR23a/b que actúa por medio de MYC reprimiendo su transcripción, lo que conlleva una mayor expresión de GLS. A lo largo del tiempo se han ido añadiendo otros miRNAs reguladores de GLS (Matés *et al.*, 2020). En concreto, el miR-122 está vinculado a la glutaminólisis, ya que modula el metabolismo de la glutamina tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuando el miR-122 está inhibido se produce un aumento de la glutaminasa (Sengupta *et al.*, 2020). La isoenzima GAC está regulada por el factor nuclear NF- κ B que a través de Rho GTPasa hiperactiva, fosforila a GAC y provoca una proliferación del cáncer de mama y linfoma de células B. Además, c-Jun se une al promotor de GLS, aumentando su expresión en cáncer de mama (Matés *et al.*, 2020). En células de páncreas, los niveles de la fosforilación de S6, MYC y de GLS son altos y, al tratamiento con rampamicina, (un inhibidor de mTORC1), se redujeron los niveles de expresión de GLS (Csibi *et al.*, 2014). Asimismo, en células de leucemia la sobreexpresión de la vía de NOTCH-1 disminuye la expresión de GLS y el consumo de glutamina (Basak *et al.*, 2014).

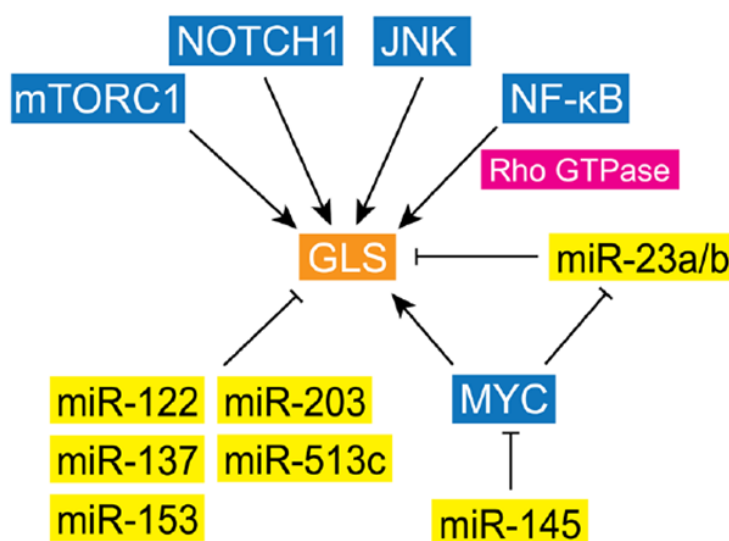


Figura 37. Regulación de GLS por miRNAs y diversas vías de señalización y el oncógeno c-MYC. Figura adaptada de (Matés *et al.*, 2020).

Otro importante regulador de KGA es la vía de RAF-MEK-ERK activada por EGF. Se realizaron ensayos con la forma doble negativa de MEK o se utilizaron inhibidores de MEK, obteniendo una inhibición de la actividad de KGA (Thangavelu *et al.*, 2012).

5.5. Inhibidores de GLS (KGA/GAC)

El primero de los inhibidores desarrollados (2007) contra GLS es DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucine) que se une covalentemente al sitio activo de la enzima, por tanto es un antagonista de la glutamina. Se demostró que no era específico y era tóxico (Chen y Cui, 2015)

El compuesto 968 5-(3-bromo-4-(dimethylamino) phenyl)-2,2-dimethyl-2,3,5,6-tetrahydrobenzo[a]phenanthridin-4(1H)-one, es un inhibidor alostérico que no compite por la glutamina e inhibe a GAC, uniéndose entre los monómeros de un dímero (Katt y Cerione, 2014).

El compuesto BPTES [bis-2-(5 phenylacetamido-1, 2, 4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide] es un inhibidor no competitivo de KGA, que se une entre los dos dímeros, cerca del sitio activo. Produce una inactivación de KGA independientemente de la presencia de Pi. Entre sus efectos está el reducir la captación de glutamina, eleva los niveles de ROS y disminuye los niveles de GSH. Asimismo, presenta un alto peso molecular, poca solubilidad y baja disponibilidad. Por tanto no es un buen fármaco para inhibir KGA pero se usa en la investigación rutinaria por tener pocos efectos adversos (Chen y Cui, 2015).

El compuesto CB-839 (N-(5-(4-(6-((2-(3-(Trifluoromethoxy)phenyl)acetyl) amino)-3-pyridazinyl)butyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-2-pyridineacetamide), de la compañía Calithera Biosciences, Inc es el único que está bajo ensayos clínicos. El fármaco se une a un sitio alostérico de la enzima provocando un tetrámero inactivo (Figura 38). Inhibe a KGA pero fuertemente a GAC (Masisi *et al.*, 2020). Presenta una cinética reversible lenta (Chen y Cui, 2015). Además el CB-839 es un compuesto potente, selectivo y oral. En los ensayos clínicos está indicado solo o con otros inhibidores, en múltiples tumores sólidos y líquidos (Xu *et al.*, 2018). En la Tabla 2 se muestran los ensayos clínicos en determinados tipos de cáncer y en la fase clínica en la que se encuentran.

Tabla 2. Ensayos clínicos en curso con el compuesto CB-839. Figura de (Masisi *et al.*, 2020).

Tipo de cáncer	Fase de ensayo clínico	Número de ensayo clínico
Renal cell carcinoma	Phase II	NCT03428217
Melanoma	Phase I/II	NCT02771626
NSCLC	Phase I/II	NCT02771626
Colorectal	Phase I/II	NCT02861300
Myelodysplastic syndrome	Phase I/II	NCT02071927
Breast (TNBC)	Phase I/II	NCT02071862

NSCLC, Non-small-cell lung carcinoma; TNBC, Triple-negative breast cancer. Fuente: National Cancer Institute.

En la siguiente Figura 38 se muestra el mecanismo de activación por Pi y por inhibición del compuesto CB-839 (Figura 39).

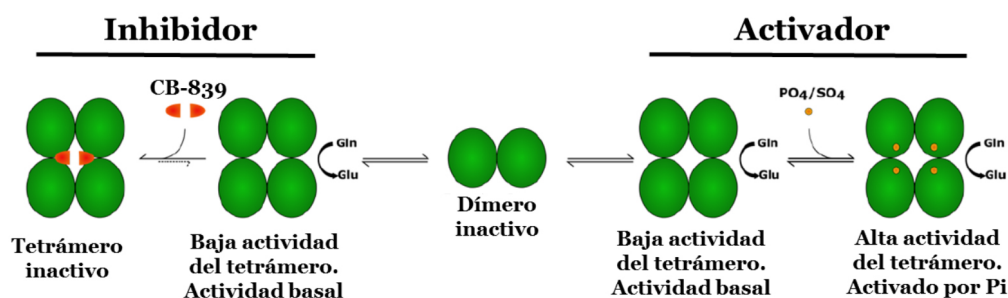


Figura 38. Esquema de la activación e inhibición de GAC. Los dímeros inactivos de GAC se unen para formar tetrámeros inactivos. El Pi se une al tetrámero inactivo para inducir una conformación activa, dando lugar a tetrámeros activos. El inhibidor CB-839 se une al tetrámero bloqueando su activación. Figura adaptada de (Stalneck *et al.*, 2017).

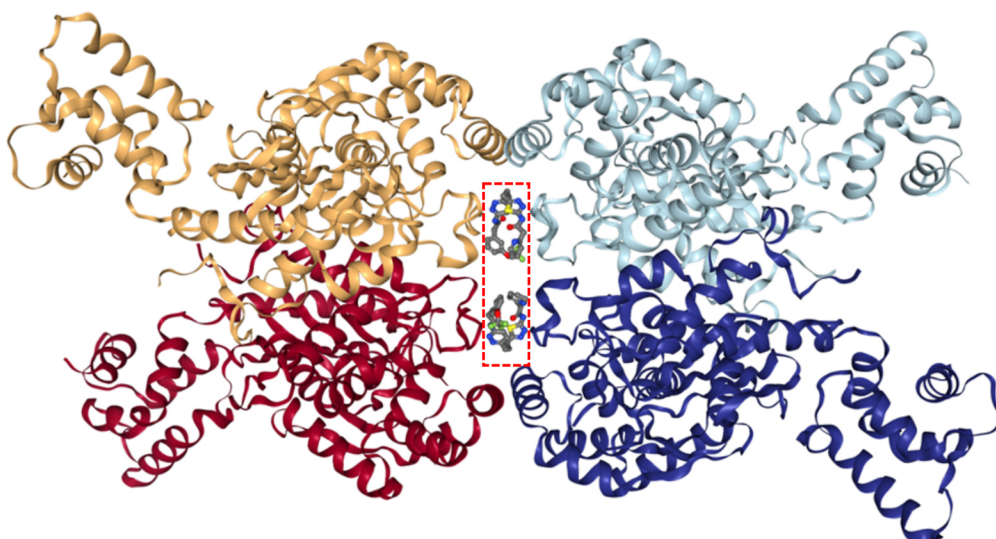


Figura 39. Imagen de la estructura de GAC unido al inhibidor CB-839. Imagen obtenida en PDB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/5HL1>). Identificador de la estructura cristalográfica 5HL1. Se muestra el tetrámero de GAC unido a dos moléculas del inhibidor CB-839 que se sitúa entre los dos dímeros de GAC (recuadro rojo), impidiendo la activación del tetrámero.

6. REPROGRAMACIÓN METABÓLICA EN EL CÁNCER DE PÁNCREAS

Se hace una mención a este tipo tumoral porque la línea celular estrella de esta Tesis Doctoral deriva de un tumor de páncreas. En el cáncer de páncreas tiene lugar una reprogramación metabólica de sus principales vías, para suplir sus requerimientos energéticos. En la Figura 40, se recogen las vías afectadas por la activación de KRAS, que es muy frecuente en este tipo de cáncer. En primer lugar se produce un aumento de la captación de glucosa (círculo rojo 1) que en última instancia va a producir un aumento de ácido láctico (círculo rojo 2) y por consiguiente mayor capacidad de invasión e inmunosupresión (círculo rojo 3). Por otro lado, hay sobreexpresión de las enzimas glucolíticas, incluyendo al transportador de glucosa GLUT1 (círculo rojo 4). Este aumento de la glucólisis, tiene su repercusión en los pacientes, ya que, suelen padecer hiperglucemia (Blum y Kloog, 2014). Una característica de los tumores malignos es la hipoxia y que estimula a la principal vía del factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α (Muz *et al.*, 2015) que origina junto al aumento de glucosa, un aumento en la migración celular (círculo

rojo 5). La glucólisis que realizan las células tumorales es menos eficiente que la respiración mitocondrial, el ATP que se produce por molécula de glucosa es de 2 frente a 30-32 moléculas, respectivamente. Esto, aunque parece contradictorio supone una ventaja en las células tumorales ya que el flujo inconstante de oxígeno no las impide seguir creciendo. Otra ventaja es la producción de lactato, que promueve la invasividad.

Otra vía biosintética, es la de las pentosas fosfato (Figura 40 círculo rojo 6) que utiliza la glucosa 6-fosfato como su metabolito inicial. Esta vía consta de dos procesos, uno oxidativo, que produce NADPH para las reacciones biosintéticas (círculo rojo 6A) y otro proceso no oxidativo, que produce la ribosa 5-fosfato que sirve para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (círculo rojo 6B) (Blum y Bloom, 2014). En un estudio, se evidenció que la mutación de Kras G12D (es la mutación más frecuente encontrada en pacientes de cáncer) promueve la biogénesis de la ribosa pero desvinculándola del control oxidativo NADP/NADPH (Ying *et al.*, 2012).

Otro aspecto a destacar son las mutaciones encontradas en B-Raf y PI3K en cáncer de páncreas. También hay casos, donde no se encuentran mutaciones, pero existe sobreexpresión de PI3K y AKT, debido a la expresión desregulada del antagonista PTEN (círculo rojo 7) que en cáncer de páncreas está disminuido o perdido.

La glutamina es uno de los principales precursores anapleróticos que suministra al ciclo de Krebs, tanto en carbono como en nitrógeno (Figura 40, círculo rojo 8). Este aminoácido, puede seguir dos rutas, una un metabolismo anabólico canónico por la enzima mitocondrial glutamato deshidrogenasa (GLUD1) (círculo rojo 8A) o la otra ruta no canónica llevada a cabo por transaminasas. En la vía no canónica las células tumorales pancreáticas transportan aspartato al citoplasma proveniente del glutamato que finalmente se convertirá en piruvato (círculo rojo 8B) (Blum y Kloog, 2014). En la vía canónica de la glutamina se ha observado que las enzimas implicadas en esta vía: glutaminasa (GLS), glutamato oxalato transaminasa 1 (GOT1) y glutamato oxalato transaminasa 2 (GOT2) están desreguladas (Chakrabarti *et al.*, 2015).

Los lípidos son fundamentales en la progresión del cáncer. Contribuyen a la formación de membranas y producen moléculas de señalización y sustratos para la modificación postraduccional de proteínas. En las células de cáncer de páncreas muchas enzimas están sobreexpresadas, para la síntesis de colesterol y ácidos grasos (Qin *et al.*, 2020). La síntesis de lípidos se inicia con la conversión del citrato a acetil-CoA por la enzima ATP-citrato liasa (ACLY) (Figura 40, círculo rojo 9). Posteriormente, acetil-CoA se convierte a manonil-CoA por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC). Estos dos compuestos se unen a la enzima sintasa de ácidos grasos (FASN) de una forma dependiente de NADPH para dar ácido palmítico (Li *et al.*, 2019).

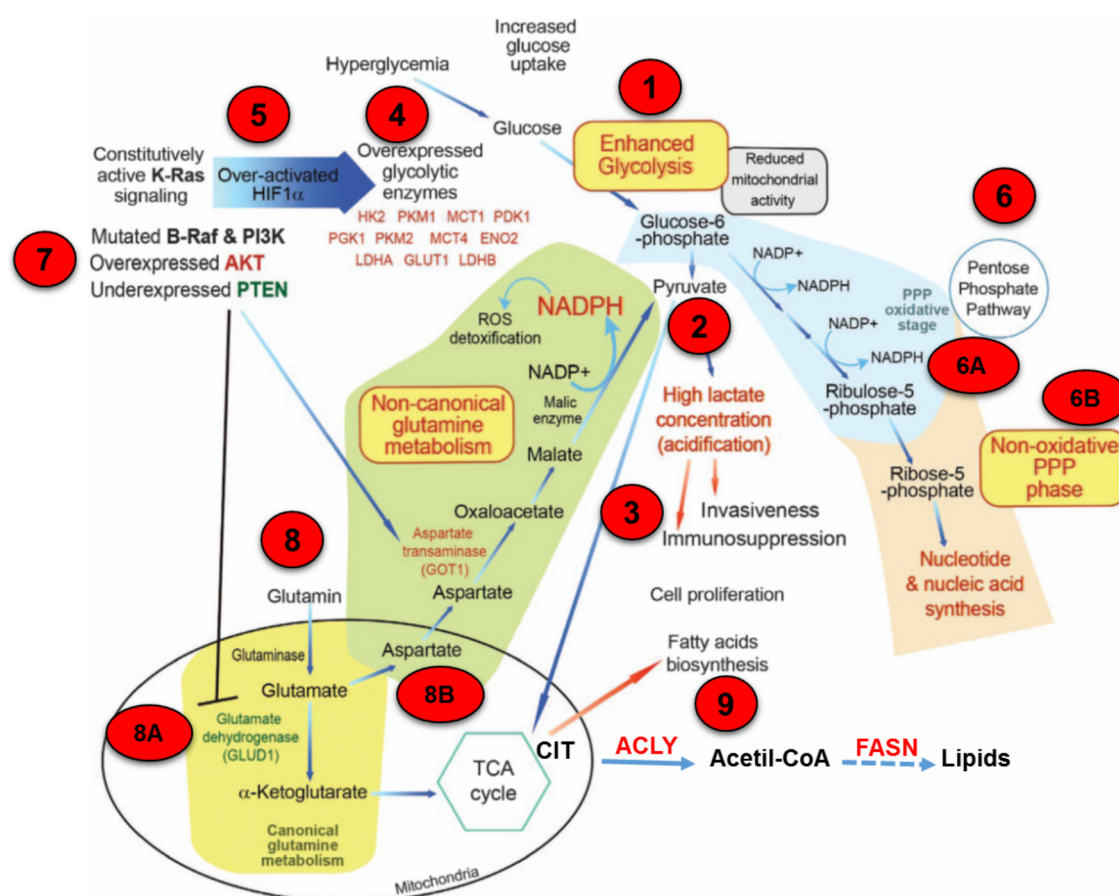


Figura 40. Metabolismo aberrante en cáncer de páncreas inducido por activación del oncogén KRAS. Los números indican los pasos descritos en el texto. En el círculo rojo número 9, la línea discontinua azul, indica que faltan reacciones hasta llegar a la última reacción. Figura adaptada de (Blum y Kloog, 2014).

DIVULGACIÓN

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ha sido presentado a diferentes Congresos, y ha recibido el Primer Premio al mejor Póster presentado en el XI SIMPOSIUM BASES BIOLÓGICAS DEL CÁNCER Y TERAPIAS PERSONALIZADAS, celebrado en Salamanca, mayo 2019.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. A. (2001). Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical Reviews; Chem.Rev*, 101(8), 2271-2290. doi:10.1021/cr000230w
- Aledo, J. C., Gómez-Fabre, P. M., Olalla, L., y Márquez, J. (2000). Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mammalian Genome*, 11(12), 1107-1110.
- Aledo, J. C., Segura, J. A., Medina, M. A., Alonso, F. J., de Castro, I. N., y Marquez, J. (1994). Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development. *FEBS Letters; FEBS Lett*, 341(1), 39-42. doi:10.1016/0014-5793(94)80236-X
- Alonso, M., Melani, M., Converso, D., Jaitovich, A., Paz, C., Carreras, M. C., et al., (2004). Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) are modulated during brain development. *Journal of Neurochemistry*, 89(1), 248-256.
- Altman, B. J., Stine, Z. E., y Dang, C. V. (2016). From krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews.Cancer; Nat Rev Cancer*, 16(11), 749-749. doi:10.1038/nrc.2016.114
- Angulo-Ibáñez, M., Rovira-Clavé, X., Granados-Jaén, A., Downs, B., Kim, Y. C., Wang, S. M., Espel, E. (2015). Erk5 contributes to maintaining the balance of cellular nucleotide levels and erythropoiesis. *Cell Cycle*, 14(24), 3864-3876.
- Arkell, R. S., Dickinson, R. J., Squires, M., Hayat, S., Keyse, S. M., y Cook, S. J. (2008). DUSP6/MKP-3 inactivates ERK1/2 but fails to bind and inactivate ERK5. *Cellular Signalling*, 20(5), 836-843. doi:https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.014
- Avula, L. R., Hagerty, B., y Alewine, C. (2020). Molecular mediators of peritoneal metastasis in pancreatic cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1-21.
- Basak, N. P., Roy, A., y Banerjee, S. (2014). Alteration of mitochondrial proteome due to activation of Notch1 signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(11), 7320-7334. doi:10.1074/jbc.M113.519405 [doi]
- Benard, G., Bellance, N., Jose, C., y Rossignol, R. (2011). Relationships between mitochondrial dynamics and bioenergetics. In B. Lu (Ed.), *Mitochondrial dynamics and neurodegeneration* (pp. 47-68). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-007-1291-1_2 Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-94-007-1291-1_2

- Bilal, F., Arenas, E. J., Pedersen, K., Martinez-Sabadell, A., Nabet, B., Guruceaga, E., *et al* (2021). The transcription factor SLUG uncouples pancreatic cancer progression from the RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway. *Cancer Research*, 81(14), 3849-3861. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-4263 [doi]
- Blum, R., y Kloog, y. (2014). Metabolism addiction in pancreatic cancer. *Cell Death y Disease*, 5(2), e1065-e1065.
- Bos, J. L. (2006). Epac proteins: Multi-purpose cAMP targets. *Trends in Biochemical Sciences (Amsterdam.Regular Ed.); Trends Biochem Sci*, 31(12), 680-686. doi:10.1016/j.tibs.2006.10.002
- Bott, A. J., Maimouni, S., y Zong, W. (2019). The pleiotropic effects of glutamine metabolism in cancer. *Cancers; Cancers (Basel)*, 11(6), 770. doi:10.3390/cancers11060770
- Campos-Sandoval, J. A., Martín-Rufián, M., Cardona, C., Lobo, C., Peñalver, A., y Márquez, J. (2015). Glutaminases in brain: Multiple isoforms for many purposes. *Neurochemistry International*, 88, 1-5.
- Cargnello, M., y Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews; Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83. doi:10.1128/MMBR.00031-10
- Caunt, C. J., Sale, M. J., Smith, P. D., y Cook, S. J. (2015). MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: The long and winding road. *Nature Reviews.Cancer; Nat Rev Cancer*, 15(10), 577-592. doi:10.1038/nrc4000
- Chakrabarti, G., Moore, Z. R., Luo, X., Ilcheva, M., Ali, A., Padanad, M., *et al.*, (2015). Targeting glutamine metabolism sensitizes pancreatic cancer to PARP-driven metabolic catastrophe induced by ss-lapachone. *Cancer y Metabolism*, 3(1), 1-12.
- Chakrabarty, S., Monlish, D. A., Gupta, M., Wright, T. D., Hoang, V. T., Fedak, M., Cavanaugh, J. E. (2018). Structure activity relationships of anthranilic acid-based compounds on cellular and in vivo mitogen activated protein kinase-5 signaling pathways. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 28(13), 2294-2301. doi:https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.05.029
- Charni, S., de Bettignies, G., Rathore, M. G., Aguilo, J. I., van den Elsen, P. J., Haouzi, D., *et al.*, (2010). Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor

- cells through the ERK5 pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(6), 3498-3503. doi:10.4049/jimmunol.1001250 [doi]
- Chaudhary, S., Jabre, I., Reddy, A. S., Staiger, D., y Syed, N. H. (2019). Perspective on alternative splicing and proteome complexity in plants. *Trends in Plant Science*, 24(6), 496-506.
- Chen, L., y Cui, H. (2015). Targeting glutamine induces apoptosis: A cancer therapy approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22830-22855.
- Chiariello, M., Marinissen, M. J., y Gutkind, J. S. (2000). Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation. *Molecular and Cellular Biology; Mol Cell Biol*, 20(5), 1747-1758. doi:10.1128/MCB.20.5.1747-1758.2000
- Colomer, R., Montero, S., Ropero, S., Menéndez, J., Cortés Funes, H., Solanas, M., y Escrich, E. (2001). El oncogén HER2 como ejemplo del progreso diagnóstico y terapéutico en cáncer de mama. *Revista De Senología y Patología Mamaria - Journal of Breast Science*, 14(1), 8-19.
- Cook, S., Tucker, J. A., y Lochhead, P. (2020). Small molecule ERK5 kinase inhibitors paradoxically activate ERK5 signalling: Be careful what you wish for. doi:10.1042/BST20190338
- Coulombe, P., y Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochimica Et Biophysica Acta.Molecular Cell Research; Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1376-1387. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.11.001
- Craig, J. E., Miller, J. N., Rayavarapu, R. R., Hong, Z., Bulut, G. B., Zhuang, W., *et al.*, (2020). MEKK3-MEK5-ERK5 signaling promotes mitochondrial degradation. *Cell Death Discovery*, 6(1), 1-13.
- Cristea, S., Coles, G. L., Hornburg, D., Gershkovitz, M., Arand, J., Cao, S., *et al.*, (2020). The MEK5-ERK5 kinase axis controls lipid metabolism in small-cell lung cancer. *Cancer Research*, 80(6), 1293-1303. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-1027 [doi]
- Cruzat, V. F., y Newsholme, P. (2017). An introduction to glutamine metabolism. *Glutamine* (pp. 1-18) CRC Press.
- Csibi, A., Lee, G., Yoon, S., Tong, H., Ilter, D., Elia, I., *et al.*, (2014). The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eIF4B-dependent control of c-myc translation. *Current Biology*, 24(19), 2274-2280.

- Curthoys, N. (2017). 3 glutaminase isoforms and glutamine metabolism: Biochemistry, physiology, and clinical applications. (pp. 31-46) doi:10.1201/9781315373164-4
- de la Rosa, V., Campos-Sandoval, J., Martín-Rufián, M., Cardona, C., Matés, J.,M., Segura, J. A., *et al.*, (2009). A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochemistry International; Neurochem Int*, 55(1), 76-84. doi:10.1016/j.neuint.2009.02.021
- de Sousa, V. M. L., y Carvalho, L. (2018). Heterogeneity in lung cancer. *Pathobiology : Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 85(1-2), 96-107. doi:10.1159/000487440 [doi]
- DeBerardinis, R. J., y Chandel, N. S. (2020). We need to talk about the warburg effect. *Nature Metabolism*, 2(2), 127-129.
- Demine, S., Reddy, N., Renard, P., Raes, M., y Arnould, T. (2014). Unraveling biochemical pathways affected by mitochondrial dysfunctions using metabolomic approaches. *Metabolites; Metabolites*, 4(3), 831-878. doi:10.3390/metabo4030831
- Díaz-Rodríguez, E., y Pandiella, A. (2010). Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *Journal of Cell Science; J Cell Sci*, 123, 3146-3156. doi:10.1242/jcs.070516
- Drew, B. A., Burow, M. E., y Beckman, B. S. (2012). MEK5/ERK5 pathway: The first fifteen years. *Biochimica Et Biophysica Acta.Reviews on Cancer; Biochim Biophys Acta*, 1825(1), 37-48. doi:10.1016/j.bbcan.2011.10.002
- Drosten, M., y Barbacid, M. (2020). Targeting the MAPK pathway in KRAS-driven tumors. *Cancer Cell; Cancer Cell*, 37(4), 543-550. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.013
- Duong-Ly, K. C., y Peterson, J. R. (2013). The human kinome and kinase inhibition. *Current Protocols in Pharmacology*, 60(1), 2.9. 1-2.9. 14.
- Elgadi, K. M., Meguid, R. A., Qian, M., Souba, W. W., y Abcouwer, S. F. (1999). Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiological Genomics*, 1(2), 51-62.
- Erazo, T., Espinosa-Gil, S., Diéguez-Martínez, N., Gómez, N., y Lizcano, J. M. (2020). SUMOylation is required for ERK5 nuclear translocation and ERK5-mediated cancer cell proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2203. doi:10.3390/ijms21062203

- Erazo, T., Moreno, A., Ruiz-Babot, G., Rodríguez-Asiain, A., Morrice, N. A., Espadamala, J., *et al.*, (2013). Canonical and kinase activity-independent mechanisms for extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) nuclear translocation require dissociation of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 complex. *Molecular and Cellular Biology; Mol Cell Biol*, 33(8), 1671-1686. doi:10.1128/MCB.01246-12
- Esparís-Ogando, A., Díaz-Rodríguez, E., Montero, J. C., Yuste, L., Crespo, P., y Pandiella, A. (2002). Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Molecular and Cellular Biology; Mol Cell Biol*, 22(1), 270-285. doi:10.1128/MCB.22.1.270-285.2002
- Finegan, K. G., Wang, X., Lee, E., Robinson, A. C., y Tournier, C. (2009). Regulation of neuronal survival by the extracellular signal-regulated protein kinase 5. *Cell Death and Differentiation; Cell Death Differ*, 16(5), 674-683. doi:10.1038/cdd.2008.193
- Fukuhara, S., Marinissen, M. J., Chiariello, M., y Gutkind, J. S. (2000). Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves galpha q and galpha 12/13 families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel ras AND rho-independent pathway. *The Journal of Biological Chemistry; J Biol Chem*, 275(28), 21730-21736.
- Gaglio, D., Metallo, C. M., Gameiro, P. A., Hiller, K., Danna, L. S., Balestrieri, C., *et al.*, (2011). Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Molecular Systems Biology; Mol Syst Biol*, 7(1), 523-n/a. doi:10.1038/msb.2011.56
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., y Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 204-224.
- Glatz, G., Gógl, G., Alexa, A., y Reményi, A. (2013). Structural mechanism for the specific assembly and activation of the extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) module. *The Journal of Biological Chemistry; J Biol Chem*, 288(12), 8596-8609. doi:10.1074/jbc.M113.452235
- Goldsmith, Z. G., y Dhanasekaran, D. N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*, 26(22), 3122-3142. doi:10.1038/sj.onc.1210407
- Gomez, N., Erazo, T., y Lizcano, J. M. (2016). ERK5 and cell proliferation: Nuclear localization is what matters. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 105.
- Hanks, S. K., y Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification 1. *The FASEB Journal*, 9(8), 576-596.

- Hanks, S. K., Quinn, A. M., y Hunter, T. (1988). The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science (American Association for the Advancement of Science); Science*, 241(4861), 42-52. doi:10.1126/science.3291115
- Hanks, S. K. (2003). Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: A perspective. *Genome Biology; Genome Biol*, 4(5), 111-111. doi:10.1186/gb-2003-4-5-111
- Hayashi, M., Kim, S. W., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., Abel, E. D., Eliceiri, B., *et al.*, (2004). Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(8), 1138-1148. doi:10.1172/JCI19890 [doi]
- Hessmann, E., Schneider, G., Ellenrieder, V., y Siveke, J. (2016). MYC in pancreatic cancer: Novel mechanistic insights and their translation into therapeutic strategies. *Oncogene*, 35(13), 1609-1618.
- Hoang, V. T., Yan, T. J., Cavanaugh, J. E., Flaherty, P. T., Beckman, B. S., y Burow, M. E. (2017b). MEK5-ERK5 signaling in cancer: Implications for targeted therapy. *Cancer Letters*, 392, 51-59. doi:10.1016/j.canlet.2017.01.034
- Hoang, V. T., Yan, T. J., Cavanaugh, J. E., Flaherty, P. T., Beckman, B. S., y Burow, M. E. (2017a). Oncogenic signaling of MEK5-ERK5. *Cancer Letters; Cancer Lett*, 392, 51-59. doi:10.1016/j.canlet.2017.01.034
- Honda, T., Obara, Y., Yamauchi, A., Couvillon, A. D., Mason, J. J., Ishii, K., y Nakahata, N. (2015). Phosphorylation of ERK5 on Thr732 is associated with ERK5 nuclear localization and ERK5-dependent transcription. *PLoS One; PLoS One*, 10(2), e0117914-e0117914. doi:10.1371/journal.pone.0117914
- Horie, T., Park, G., Inaba, Y., Hashiuchi, E., Iezaki, T., Tokumura, K., *et al.*, (2019). MAPK Erk5 in leptin Receptor-Expressing neurons controls body weight and systemic energy homeostasis in female mice. *Endocrinology*, 160(12), 2837-2848.
- Iñesta-Vaquera, F., A., Campbell, D. G., Tournier, C., Gómez, N., Lizcano, J. M., y Cuenda, A. (2010). Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cellular Signalling; Cell Signal*, 22(12), 1829-1837. doi:10.1016/j.cellsig.2010.07.010

- Jiang, W., Cai, F., Xu, H., Lu, Y., Chen, J., Liu, J., Huang, Q. (2020). Extracellular signal regulated kinase 5 promotes cell migration, invasion and lung metastasis in a FAK-dependent manner. *Protein y Cell*, 11(11), 825-845.
- Jin, L., Alesi, G. N., y Kang, S. (2016). Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 35(28), 3619-3625. doi:10.1038/onc.2015.447
- Kalkat, M., De Melo, J., Hickman, K. A., Lourenco, C., Redel, C., Resetca, D., *et al.*, (2017). MYC deregulation in primary human cancers. *Genes*, 8(6), 151.
- Karin, M., y Chang, L. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature (London); Nature*, 410(6824), 37-40. doi:10.1038/35065000
- Kasler, H. G., Victoria, J., Duramad, O., y Winoto, A. (2000). ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Molecular and Cellular Biology; Mol Cell Biol*, 20(22), 8382-8389. doi:10.1128/MCB.20.22.8382-8389.2000
- Kato, Y., Kravchenko, V. V., Tapping, R. I., Han, J., Ulevitch, R. J., y Lee, J. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *The EMBO Journal*, 16(23), 7054-7066.
- Kato, Y., Zhao, M., Morikawa, A., Sugiyama, T., Chakravorty, D., Koide, N., *et al.*, (2000). Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *The Journal of Biological Chemistry; J Biol Chem*, 275(24), 18534-18540. doi:10.1074/jbc.M001573200
- Katt, W. P., Lukey, M. J., y Cerione, R. A. (2017). A tale of two glutaminases: Homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Medicinal Chemistry*, 9(2), 223-243.
- Kim, S., y Baek, K. (2021). Regulation of cancer metabolism by deubiquitinating enzymes: The warburg effect. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6173. doi:10.3390/ijms22126173
- Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheyas, F., Wang, L., Qiu, P., *et al.*, (2002). Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biology; Genome Biol*, 3(9), -Research0043.

- Krebs, H. A. (1935). Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochemical Journal*, 29(8), 1951.
- Krey, J. F., Wilmarth, P. A., Shin, J., Klimek, J., Sherman, N. E., Jeffery, E. D., *et al.*, (2014). Accurate label-free protein quantitation with high-and low-resolution mass spectrometers. *Journal of Proteome Research*, 13(2), 1034-1044.
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology; BMC Biol*, 13(1), 89-89. doi:10.1186/s12915-015-0201-x
- Le, N., Yang, J., y Abe, J. (2012). Mek5/Erk5. In S. Choi (Ed.), *Encyclopedia of signaling molecules* (pp. 1065-1074). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4419-0461-4_617 Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0461-4_617
- Lee, J., Ulevitch, R. J., y Han, J. (1995). Primary structure of BMK1: A new mammalian Map kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213(2), 715-724.
- Li, C., Zhang, G., Zhao, L., Ma, Z., y Chen, H. (2016). Metabolic reprogramming in cancer cells: Glycolysis, glutaminolysis, and bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World Journal of Surgical Oncology; World J Surg Oncol*, 14(1), 15-15. doi:10.1186/s12957-016-0769-9
- Li, T., Copeland, C., y Le, A. (2021). Glutamine metabolism in cancer. In A. Le (Ed.), *The heterogeneity of cancer metabolism* (pp. 17-38). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-030-65768-0_2 Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_2
- Lin, E. C. K., Amantea, C. M., Nomanbhoy, T. K., Weissig, H., Ishiyama, J., Hu, Y., *et al.*, (2016). ERK5 kinase activity is dispensable for cellular immune response and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS; Proc Natl Acad Sci USA*, 113(42), 11865-11870. doi:10.1073/pnas.1609019113
- Linnerth, N. M., Baldwin, M., Campbell, C., Brown, M., McGowan, H., y Moorehead, R. A. (2005). IGF-II induces CREB phosphorylation and cell survival in human lung cancer cells. *Oncogene*, 24(49), 7310-7319.
- Lochhead, P. A., Gilley, R., y Cook, S. J. (2012). ERK5 and its role in tumour development. *Biochemical Society Transactions*, 40(1), 251-256. doi:10.1042/BST20110663

- Lopez-Royuela, N., Rathore, M. G., Allende-Vega, N., Annicotte, J., Fajas, L., Ramachandran, B., *et al.*, (2014). Extracellular-signal-regulated kinase 5 modulates the antioxidant response by transcriptionally controlling sirtuin 1 expression in leukemic cells. *The International Journal of Biochemistry y Cell Biology; Int J Biochem Cell Biol*, 53, 253-261. doi:10.1016/j.biocel.2014.05.026
- Loussouarn, C., Pers, Y., Bony, C., Jorgensen, C., y Noël, D. (2021). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles regulate the mitochondrial metabolism via transfer of miRNAs. *Frontiers in Immunology*, 12, 171.
- Low, H. B., y Zhang, Y. (2016). Regulatory roles of MAPK phosphatases in cancer. *Immune Network; Immune Netw*, 16(2), 85-98. doi:10.4110/in.2016.16.2.85
- Lu, Y., Liu, B., Liu, Y., Yu, X., y Cheng, G. (2020). Dual effects of active ERK in cancer: A potential target for enhancing radiosensitivity. *Oncology Letters*, 20(2), 993-1000.
- Maik-Rachline, G., Hacoheh-Lev-Ran, A., y Seger, R. (2019). Nuclear ERK: Mechanism of translocation, substrates, and role in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1194.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., y Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science (American Association for the Advancement of Science); Science*, 298(5600), 1912-1934. doi:10.1126/science.1075762
- Marks, A. D., Lieberman, M. A. (., Marks, D. B., y Smith, C. M. (2005). In Marks A. D., Lieberman M. A., Marks D. B. (Eds.), *Marks' basic medical biochemistry : A clinical approach* (2nd ed. ed.). Philadelphia: Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins.
- Márquez, J., Martín-Rufián, M., Segura, J. A., Matés, J., M., Campos-Sandoval, J., y Alonso, F. J. (2010). Brain glutaminases. *Biomolecular Concepts; BioMolecular Concepts*, 1(1), 3-15. doi:10.1515/bmc.2010.006
- Márquez, J., Matés, J. M., Alonso, F. J., Martín-Rufián, M., Lobo, C., y Campos-Sandoval, J. (2015). Canceromics studies unravel Tumor's glutamine addiction after metabolic reprogramming. In S. Mazurek, y M. Shoshan (Eds.), *Tumor cell metabolism: Pathways, regulation and biology* (pp. 257-286). Vienna: Springer Vienna. doi:10.1007/978-3-7091-1824-5_12 Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1824-5_12

- Márquez, J., Matés, J. M., y Campos-Sandoval, J. (2016). Glutaminases. In A. Schousboe, y U. Sonnewald (Eds.), *The Glutamate/GABA-glutamine cycle: Amino acid neurotransmitter homeostasis* (pp. 133-171). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-45096-4_6 Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_6
- Masisi, B. K., El Ansari, R., Alfarsi, L., Rakha, E. A., Green, A. R., y Craze, M. L. (2020). The role of glutaminase in cancer. *Histopathology*, 76(4), 498-508.
- Matés, J. M., Campos-Sandoval, J. A., y Márquez, J. (2018). Glutaminase isoenzymes in the metabolic therapy of cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1870(2), 158-164.
- Matés, J., M., Di Paola, F., J., Campos-Sandoval, J., Mazurek, S., y Márquez, J. (2020). Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. *Seminars in Cell y Developmental Biology; Semin Cell Dev Biol*, 98, 34-43. doi:10.1016/j.semcdb.2019.05.012
- Melkonian EA, Schury MP. Biochemistry, Anaerobic Glycolysis. [Updated 2021 Aug 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546695/>
- Miranda, M. S., Saunus, J. M., Akgül, S., Marjaneh, M. M., Kutasovic, J. R., Shi, W., et al (2021). A short ERK5 isoform modulates nucleocytoplasmic shuttling of active ERK5 and associates with poor survival in breast cancer. *Biorxiv*,
- Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., y Shroff, R. T. (2020). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 395(10242), 2008-2020.
- Mody, N., Campbell, D. G., Morrice, N., Peggie, M., y Cohen, P. (2003). An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *The Biochemical Journal*, 372, 567-575. doi:10.1042/BJ20030193
- Montero, J. C., Ocana, A., Abad, M., Ortiz-Ruiz, M. J., Pandiella, A., y Esparís-Ogando, A. (2009). Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target. *PloS One*, 4(5), e5565.
- Morimoto, H., Kondoh, K., Nishimoto, S., Terasawa, K., y Nishida, E. (2007). Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry; J Biol Chem*, 282(49), 35449-35456. doi:10.1074/jbc.M704079200

- Murray, R. K., y Harper, H. A. (2010). *Harper, Bioquímica ilustrada* (28th ed.). México :: McGraw-Hill.
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., y Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia; Hypoxia (Auckl)*, 3, 83-92. doi:10.2147/HP.S93413
- Nakamura, K., Uhlik, M. T., Johnson, N. L., Hahn, K. M., y Johnson, G. L. (2006). PB1 domain-dependent signaling complex is required for extracellular signal-regulated kinase 5 activation. *Molecular and Cellular Biology; Mol Cell Biol*, 26(6), 2065-2079. doi:10.1128/MCB.26.6.2065-2079.2006
- Nakaoka, Y., Nishida, K., Fujio, Y., Izumi, M., Terai, K., Oshima, Y., *et al.* (2003). Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of Scaffolding/Docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. *Circulation Research; Circ Res*, 93(3), 221-229. doi:10.1161/01.RES.0000085562.48906.4A
- Neefjes, J., Jongmsma, M. L., Paul, P., y Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 823-836.
- Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M. M. R., Pithon-Curi, T., y Curi, R. (2003). Glutamine and glutamate-their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function; Cell Biochem.Funct*, 21(1), 1-9. doi:10.1002/cbf.1003
- Nithianandarajah-Jones, G., Wilm, B., Goldring, C. E. P., Müller, J., y Cross, M. J. (2012). ERK5: Structure, regulation and function. *Cellular Signalling; Cell Signal*, 24(11), 2187-2196. doi:10.1016/j.cellsig.2012.07.007
- Obre, E., Bellance, N., Jose, C., Benard, G., Nouette-Gaulain, K., y Rossignol, R. (2014). Relevance of mitochondrial functions and plasticity in tumor biology. *Mitochondria: The anti-cancer target for the third millennium* (pp. 291-325) Springer.
- Ortiz-Ruiz, M. J., Alvarez-Fernandez, S., Parrott, T., Zaknoen, S., Burrows, F. J., Ocana, A., *et al* (2014). Therapeutic potential of ERK5 targeting in triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 5(22), 11308-11318. doi:2324 [pii]

- Patterson, H., Nibbs, R., McInnes, I., y Siebert, S. (2014). Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases: Protein kinase inhibitors for inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 176(1), 1-10. doi:10.1111/cei.12248
- Paudel, R., Fusi, L., y Schmidt, M. (2021). The MEK5/ERK5 pathway in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7594. doi:10.3390/ijms22147594
- Pereira, D. M., y Rodrigues, C. M. P. (2020). Targeted avenues for cancer treatment: The MEK5–ERK5 signaling pathway. *Trends in Molecular Medicine; Trends Mol Med*, 26(4), 394-407. doi:10.1016/j.molmed.2020.01.006
- Perez-Madrigal, D., Finegan, K. G., Paramo, B., y Tournier, C. (2012). The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs). *Cellular Signalling*, 24(12), 2360-2368.
- Pfanner, N., Warscheid, B., y Wiedemann, N. (2019). Mitochondrial proteins: From biogenesis to functional networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(5), 267-284.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., y Seger, R. (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619-1633.
- Purandare, S., Lee, J., y Patel, P. (1998). Assignment of big MAP kinase (PRKM7) to human chromosome 17 band p11. 2 with somatic cell hybrids. *Cytogenetic and Genome Research*, 83(3-4), 258.
- Qin, C., Yang, G., Yang, J., Ren, B., Wang, H., Chen, G., et al., (2020). Metabolism of pancreatic cancer: Paving the way to better anticancer strategies. *Molecular Cancer*, 19(1), 1-19.
- Rasola, A., y Chiara, F. (2013). GSK-3 and mitochondria in cancer cells. *Frontiers in Oncology*, 3, 16.
- Rasola, A., Sciacovelli, M., Chiara, F., Pantic, B., Brusilow, W. S., y Bernardi, P. (2010). Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), 726-731. doi:10.1073/pnas.0912742107 [doi]

- Rawla, P., Sunkara, T., y Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of pancreatic cancer: Global trends, etiology and risk factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10-27. doi:10.14740/wjon1166 [doi]
- Rigoulet, M., Bouchez, C. L., Paumard, P., Ransac, S., Cuvellier, S., Duvezin-Caubet, S., *et al.*, (2020). Cell energy metabolism: An update. *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics; Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1861(11), 148276-148276. doi:10.1016/j.bbabi.2020.148276
- Rose, B. A., Force, T., y Wang, Y. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: Angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiological Reviews*, 90(4), 1507-1546.
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research; Pharmacol Res*, 66(2), 105-143. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005
- Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research; Pharmacol Res*, 100, 1-23. doi:10.1016/j.phrs.2015.07.010
- Roskoski, R. (2016). Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacological Research; Pharmacol Res*, 103, 26-48. doi:10.1016/j.phrs.2015.10.021
- Roskoski, R. (2019). Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacological Research; Pharmacol Res*, 142, 151-168. doi:10.1016/j.phrs.2019.01.039
- Ruiz-Perez, M., Sanchez-Jimenez, F., Alonso, F. J., Segura, J. A., Marquez, J., y Medina, M. A. (2014). Glutamine, glucose and other fuels for cancer. *Current Pharmaceutical Design; CPD*, 20(15), 2557-2579. doi:10.2174/13816128113199990482
- Sánchez-Fdez, A., Re-Louhau, M. F., Rodríguez-Núñez, P., Ludeña, D., Matilla-Almazán, S., Pandiella, A., y Esparís-Ogando, A. (2021). Clinical, genetic and pharmacological data support targeting the MEK5/ERK5 module in lung cancer. *NPJ Precision Oncology*, 5(1), 1-13.
- Sanchez-Fdez, A., Ortiz-Ruiz, M. J., Re-Louhau, M. F., Ramos, I., Blanco-Munoz, O., Ludena, D., Esparis-Ogando, A. (2019). MEK5 promotes lung adenocarcinoma. *The European Respiratory Journal*, 53(2), 10.1183/13993003.01327-2018. Print 2019 Feb. doi:10.1183/13993003.01327-2018 [pii]

- Schmidt, T., Samaras, P., Frejno, M., Gessulat, S., Barnert, M., Kienegger, H., *et al.* (2018). Proteomicsdb. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1271-D1281.
- Seger, R., y Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*, 9(9), 726-735.
- Sengupta, D., Cassel, T., Teng, K., Aljuhani, M., Chowdhary, V. K., Hu, P., *et al.*, (2020). Regulation of hepatic glutamine metabolism by miR-122. *Molecular Metabolism*, 34, 174-186.
- Shaulian, E., y Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival: AP-1. *Oncogene; Oncogene*, 20(19), 2390-2400. doi:10.1038/sj.onc.1204383
- Spinelli, J. B., y Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology; Nat Cell Biol*, 20(7), 745-754. doi:10.1038/s41556-018-0124-1
- Stalneck, C. A., Erickson, J. W., y Cerione, R. A. (2017). Conformational changes in the activation loop of mitochondrial glutaminase C: A direct fluorescence readout that distinguishes the binding of allosteric inhibitors from activators. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(15), 6095-6107. doi:10.1074/jbc.M116.758219 [doi]
- Stecca, B., y Rovida, E. (2019). Impact of ERK5 on the hallmarks of cancer. *International Journal of Molecular Sciences; Int J Mol Sci*, 20(6), 1426. doi:10.3390/ijms20061426
- Sun, W., Kesavan, K., Schaefer, B. C., Garrington, T. P., Ware, M., Johnson, N. L., *et al.*, (2001). MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *The Journal of Biological Chemistry; J Biol Chem*, 276(7), 5093-5100. doi:10.1074/jbc.M003719200
- Süveges, D., y Jura, N. (2015). Structural features of the kinase domain. In D. L. Wheeler, Y. Yarden (Eds.), *Receptor tyrosine kinases: Structure, functions and role in human disease* (pp. 195-223). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4939-2053-2_9 Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2053-2_9
- Tanoue, T., y Nishida, E. (2002). Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacology y Therapeutics (Oxford); Pharmacol Ther*, 93(2), 193-202. doi:10.1016/S0163-7258(02)00188-2
- Tatake, R. J., O'Neill, M. M., Kennedy, C. A., Wayne, A. L., Jakes, S., Wu, D., *et al.*, (2008). Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway. *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications*, 377(1), 120-125. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.087>
- Taylor, S. S., y Kornev, A. P. (2011). Protein kinases: Evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences (Amsterdam.Regular Ed.); Trends Biochem Sci*, 36(2), 65-77. doi:10.1016/j.tibs.2010.09.006
- Thangavelu, K., Pan, C. Q., Karlberg, T., Balaji, G., Uttamchandani, M., Suresh, V., *et al.*, (2012). Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 7705-7710. doi:10.1073/pnas.1116573109 [doi]
- Tubita, A., Lombardi, Z., Tusa, I., Dello Sbarba, P., y Rovida, E. (2020). Beyond kinase activity: ERK5 nucleo-cytoplasmic shuttling as a novel target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences; Int J Mol Sci*, 21(3), 938. doi:10.3390/ijms21030938
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Židek, A., *et al.* (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, 596(7873), 590-596.
- Vaseva, A. V., Blake, D. R., Gilbert, T. S., Ng, S., Hostetter, G., Azam, S. H., *et al.*, (2018). KRAS suppression-induced degradation of MYC is antagonized by a MEK5-ERK5 compensatory mechanism. *Cancer Cell*, 34(5), 807-822. e7.
- Vaupel, P., y Multhoff, G. (2021). Revisiting the warburg effect: Historical dogma versus current understanding. *The Journal of Physiology; J Physiol*, 599(6), 1745-1757. doi:10.1113/JP278810
- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., y Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of Cell Biology; J Cell Biol*, 175(2), 237-247. doi:10.1083/jcb.200605138
- Volmat, V., Camps, M., Arkinstall, S., Pouysségur, J., y Lenormand, P. (2001). The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *Journal of Cell Science; J Cell Sci*, 114, 3433-3443.
- Von Kriegsheim, A., Baiocchi, D., Birtwistle, M., Sumpton, D., Bienvenut, W., Morrice, N., *et al.*, (2009). Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nature Cell Biology*, 11(12), 1458-1464.

- Wang, J., Erazo, T., Ferguson, F. M., Buckley, D. L., Gomez, N., Muñoz-Guardiola, P., *et al.*, (2018). Structural and atropisomeric factors governing the selectivity of pyrimido-benzodiazepinones as inhibitors of kinases and bromodomains. *ACS Chemical Biology; ACS Chem.Biol*, 13(9), 2438-2448. doi:10.1021/acscchembio.7b00638
- Wang, X., y Tournier, C. (2006). Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cellular Signalling; Cell Signal*, 18(6), 753-760. doi:10.1016/j.cellsig.2005.11.003
- Wolpaw, A. J., y Dang, C. V. (2018). Exploiting metabolic vulnerabilities of cancer with precision and accuracy. *Trends in Cell Biology; Trends Cell Biol*, 28(3), 201-212. doi:10.1016/j.tcb.2017.11.006
- Xiong, J. (2018). Fatty acid oxidation in cell fate determination. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(11), 854-857.
- Xu, Q., Zhang, J., Telfer, B. A., Zhang, H., Ali, N., Chen, F., *et al.*, (2021). The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) enhances metastatic burden in triple-negative breast cancer through focal adhesion protein kinase (FAK)-mediated regulation of cell adhesion. *Oncogene*, 40(23), 3929-3941.
- Xu, X., Meng, Y., Li, L., Xu, P., Wang, J., Li, Z., y Bian, J. (2018). Overview of the development of glutaminase inhibitors: Achievements and future directions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(3), 1096-1115.
- Xu, B., Stippec, S., Lenertz, L., Lee, B., Zhang, W., Lee, Y., y Cobb, M. H. (2004). WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry; J Biol Chem*, 279(9), 7826-7831. doi:10.1074/jbc.M313465200
- Yang, L., Venneti, S., y Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A hallmark of cancer metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering; Annu Rev Biomed Eng*, 19(1), 163-194. doi:10.1146/annurev-bioeng-071516-044546
- Yang, Q., Deng, X., Lu, B., Cameron, M., Fearn, C., Patricelli, M. P., *et al.*, (2010). Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through PML. *Cancer Cell*, 18(3), 258-267. doi:10.1016/j.ccr.2010.08.008
- Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., *et al.*, (2012). Oncogenic kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149(3), 656-670.

- Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., y Han, J. M. (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental y Molecular Medicine; Exp Mol Med*, 52(9), 1496-1516. doi:10.1038/s12276-020-00504-8
- Zhang, J., Mao, S., Guo, Y., Wu, Y., Yao, X., y Huang, Y. (2019). Inhibition of GLS suppresses proliferation and promotes apoptosis in prostate cancer. *Bioscience Reports*, 39(6), BSR20181826.
- Zheng, J., Lin, C., Fang, Z., y Li, H. (2020). Intron retention as a mode for RNA-seq data analysis. *Frontiers in Genetics*, 11, 586.
- Zhong, C. (2005). *Regulation of MAPK/AP-1 and NF- κ B signal pathways in tobacco smoke-induced pulmonary cell proliferation and apoptosis* University of California, Davis.
- Zhou, G., Bao, Z. Q., y Dixon, J. E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(21), 12665-12669. doi:10.1074/jbc.270.21.12665 [doi]
- Zhuang, K., Zhang, J., Xiong, M., Wang, X., Luo, X., Han, L., *et al.*, (2016). CDK5 functions as a tumor promoter in human colorectal cancer via modulating the ERK5-AP-1 axis. *Cell Death y Disease; Cell Death Dis*, 7(10), e2415-e2415. doi:10.1038/cddis.2016.333
- Zou, J., Lei, T., Guo, P., Yu, J., Xu, Q., Luo, Y., *et al.*, (2019). Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence. *Molecular Medicine Reports*, 19(2), 759-770.

Páginas Web consultadas

DepMap portal (<https://depmap.org/portal/interactive/>)

EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

GLOBOCAN 2020 (<https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>)

Kinasenet <http://www.kinasenet.ca/>).

PDB (Protein Data Bank) <https://www.rcsb.org/structure/5HL1>

PDBsum *AlphaFold model* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>)

Pfam <http://pfam.xfam.org/>, <http://www.kinasenet.ca/>

BIBLIOGRAFÍA

ProteomicsDB (<https://www.ProteomicsDB.org>)

The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166484-MAPK7/pathology>)

The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115419-GLS/pathology>)

Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13164>)

Visor MView del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/>)

FINANCIACIÓN

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido subvencionado por el Instituto de Salud Carlos III mediante los proyectos “PS09/00868” y “PI15/01180” concedidos a la Dra. Azucena Esparís Ogando. Esta subvención ha sido cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa”.

La autora de este trabajo, Yolanda María Guillén Pérez ha sido beneficiaria parcialmente de una ayuda asociada al proyecto “Nuevas estrategias para tratar el cáncer de mama HER2” financiado por la AECC Asociación Española Contra el Cáncer.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Esparís Ogando, directora de mi Tesis, sin cuya dedicación, guía y apoyo esta Tesis no hubiera sido posible, mi agradecimiento y reconocimiento. Muchas gracias por todo Azu.

Muchas personas han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral. Han sido años de aprendizaje, trabajo y esfuerzo en el laboratorio, dirigido por el Dr. Pandiella con eficiente y prudente liderazgo.

Mi reconocimiento para todo el equipo de ese laboratorio, y de manera especial para los investigadores Dr. Montero y Dra. Díaz-Rodríguez por sus orientaciones metodológicas y su siempre amable disponibilidad.

Dentro del ámbito del Centro de Investigación del Cáncer, debo agradecer la colaboración recibida de las Unidades de Proteómica, de Microscopía, de Informática, de Genómica, de Lavado y Esterilización, Almacén, Mantenimiento y Conserjería.

Mención especial para la inefable Marga, ayuda insustituible en todos los procesos administrativos y de coordinación con la USAL.

Mi reconocimiento a la Escuela de Doctorado de la USAL, personificada por su director D. Pablo Moreno y de la jefa de Unidad de la Escuela de Doctorado D.^a Teresa Díaz siempre aportando las soluciones posibles a nuestros problemas.

Al catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Málaga, Dr. Márquez y a los miembros de su Laboratorio, por recibirme en su casa y facilitarme la incursión en el mundo de los geles nativos y los ensayos enzimáticos. Muchas gracias.

A mi familia, mi faro de Alejandría en esta singladura, mi cariño, compromiso y orgullo de pertenencia.

