(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 560 604**

(51) Int. CI.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2011 E 11004729 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2532747**

(54) Título: **Moduladores de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD2) para terapia**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2016

(73) Titular/es:

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE

(72) Inventor/es:

KAMINSKI, MARCIN M.;
GÜLOW, KARSTEN;
KRAMMER, PETER y
SAUER, SVEN W.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moduladores de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD2) para terapia

La presente invención proporciona un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD2) o (b) la expresión del gen que codifica GPD2 para su uso en un procedimiento para tratar un neoplasma, una enfermedad autoinmune o una enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) por inhibición de inducción de NF-κB.

A pesar de enormes inversiones de recursos financieros y humanos, el cáncer sigue siendo una de las causas principales de muerte. Existen muchas opciones de tratamiento para el cáncer, que incluyen: quimioterapia, terapia de radiación, cirugía, terapia con anticuerpos monoclonales y otros procedimientos. Los tratamientos que se utilicen dependen del tipo de cáncer, la localización y el grado del tumor y la fase de la enfermedad, así como del estado general de salud de una persona. La eliminación completa del cáncer sin deterioro del resto del cuerpo es el objetivo del tratamiento para la mayoría de los cánceres. A veces esto puede realizarse por cirugía, pero la tendencia de los cánceres a invadir el tejido adyacente o a propagarse a sitios distantes por metástasis microscópica limita a menudo su eficacia. La cirugía requiere a menudo la eliminación de un amplio margen quirúrgico o un margen libre. La amplitud del margen libre depende del tipo de cáncer, el procedimiento de eliminación (CCPDMA, cirugía de Mohs, POMA, etc.). El margen puede ser tan pequeño como 1 mm para cáncer de células basales utilizando CCPDMA o cirugía de Mohs, hasta varios centímetros para cánceres agresivos. La eficacia de la quimioterapia se ve limitada a menudo por la toxicidad para otros tejidos del cuerpo. La radiación puede causar también deterioro del tejido normal. Dado que el cáncer es una clase de enfermedades, es improbable que pueda disponerse en algún momento de una sola "curación del cáncer" con mayor probabilidad de que haya un tratamiento simple para todas las enfermedades infecciosas. Se pensó tiempo atrás que los inhibidores de la angiogénesis tendrían potencial como tratamiento de tipo "panacea" aplicable a muchos tipos de cáncer, pero esto no ha sido el caso en la práctica.

La inmunoterapia del cáncer se ha descrito también en la técnica para cierto número de procedimientos, que incluyen intentos tempranos de vacunas del cáncer basadas en células que consisten en células tumorales autólogas muertas o lisados de células tumorales mezclados con adyuvantes, tales como el *Bacillus* Calmette Guerin (BCG) y *Corynebacterium parvum*, en un intento de ampliar las respuestas inmunes específicas de tumores. Estrategias inmunoterapéuticas adicionales incluyen terapia génica, administración de inhibidores y activadores de moléculas pequeñas, oligonucleótidos antisentido, vacunas, células autólogas activadas, anticuerpos, así como citocinas y quimiocinas, proteínas naturales o recombinantes y células autólogas modificadas in vitro.

La inhibición de glucolisis en relación con el efecto Warburg se ha descrito en el tratamiento de cáncer (50, 51, 52, 53).

Se ha descrito GPD2 como un biomarcador adecuado para la detección de procedimientos oncogénicos, en particular como un biomarcador en relación con el hígado, la próstata y el cáncer de ovarios (54).

A pesar del largo tiempo que se han investigado estas terapias, persiste una necesidad de estrategias mejoradas para terapia de los tumores, así como la terapia de las enfermedades inmunes.

Así, es el objeto de la presente invención proporcionar un medio seguro y eficaz para dichas terapias.

Conforme a la invención, esto se consigue por las materias objeto definidas en las reivindicaciones.

La activación por el receptor de las células T (TCR) estimula las células T a proliferación y diferenciación rápidas. En la fase de inducción de PLCγ1, la respuesta de TCR se divide en dos rutas. El inositol-3,4,5-trifosfato induce un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y activación de factores de transcripción dependientes de Ca^{2+}, *v.g.*, NF-AT. El diacilglicerol (DAG) activa las proteínas PKCθ y RasGRP que conducen a la puesta en marcha de NF-κB y AP-1. Estos tres factores de transcripción controlan esencialmente la expresión del gen inducido por activación de las células T. Así, el tratamiento simultáneo con el ionóforo Ca^{2+}, *v.g.*, ionomicina (Iono) y un mimético de DAG, 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA), produce una respuesta de transcripción completa estimulada por activación de las células T. Se ha demostrado que la activación de las células T es paralela a la generación transitoria de niveles bajos, fisiológicamente relevantes de ROS, es decir una señal oxidativa mediada por H_2O_2, lo que facilita la activación de factores de transcripción dependientes de oxidación, NF-κB y AP-1 (*1,2*). La señal oxidativa es indispensable para activación de las células T. Junto con el aflujo de Ca^{2+}, la misma constituye un requerimiento mínimo para la expresión de genes inducida por activación de las células T (*v.g.* IL-2, IL-4, CD95L). Ninguna señal es suficiente por sí misma (*1,3,4*).

Varias fuentes enzimáticas diferentes, tales como la cadena respiratoria mitocondrial, lipooxigenasas y NADPH-oxidasas, NOX2 y DUOX2, se describieron como participantes en la producción de ROS puesta en marcha por activación de las células T (*1,3,5-8*). Un trabajo anterior demuestra un papel crucial de mitocondrias como la fuente de la señal oxidativa. Utilizando una diversidad de procedimientos experimentales, pudo demostrarse que la activación de PKCθ mediada por signalosomas proximales de TCR dirige la producción de ROS por el complejo respiratorio mitocondrial I. Además, se demostró que la generación de la señal oxidativa se bloqueaba por metformina, un fármaco antidiabético (3).

La expresión de genes inducida por activación de las células T depende de la absorción de glucosa (*9,10*). Además, la activación de las células T está acompañada por un cambio metabólico desde la producción de ATP mitocondrial a la glucolisis aerobia, *es decir*, el efecto Warburg (*11-13*), un fenómeno característico también para las células cancerosas de proliferación rápida (*11,14*). Además, las células cancerosas están dotadas a menudo de producción intrínseca alta de ROS y activación constitutiva de la ruta de NF-κB (*15-18*). De forma interesante, se demostró que un metabolismo de la glucosa regulado al alza en condiciones hiperglucémicas e hipóxicas induce liberación de ROS mitocondrial en diferentes sistemas celulares (*18-21*). Estos descubrimientos demuestran que después de la activación de las células T la cadena respiratoria mitocondrial cambia desde una maquinaria productora de ATP a una maquinaria de señalización.

Durante los experimentos que dieron como resultado la presente invención se estudiaron los cambios metabólicos que acompañan a la generación de la señal oxidativa (es decir que tienen lugar en el transcurso de 1 hora después de la puesta en marcha de TCR o PMA (*1,3*)) en células proliferantes parcialmente glucolíticas - células T humanas periféricas expandidas *in vitro* (*13,22*) y células T Jurkat (23). Pudo demostrarse que la activación puesta en marcha por TCR de la glucocinasa dependiente de ADP (ADPGK), una enzima glucolítica alternativa, típicamente arqueal, media la generación de la señal oxidativa. El aumento del flujo glucolítico estimulado por ADPGK coincide con la captación de glucosa inducida por TCR, la regulación a la baja de la respiración mitocondrial y la desviación de la glucolisis hacia la lanzadera mitocondrial glicerol-3-fosfato (GPD), es decir un cambio metabólico de Warburg. La activación de GPD2 asociada a la cadena respiratoria da como resultado la hiper-reducción de ubiquinona y liberación de ROS del complejo mitocondrial I. En paralelo, se alteran la bioenergética mitocondrial y la ultraestructura. Dado que la señal oxidativa estimula la expresión de genes mediada por NF-κB, la regulación a la baja de ADPGK y GPD2 inhibe la inducción de NF-κB, mientras que la sobreexpresión de ADPGK potencia la misma. De forma interesante, una expresión mejorada de ADPGK y GPD2 en las células de la leucemia linfocítica crónica (CLL) sugiere una función tumorígena. La nueva ruta de señalización y el metabolismo descritos pueden tener un significado profundo para la tumorigénesis y pueden proporcionar nuevos medios para terapia.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

(**A**) Se monitorizó la tasa respiratoria de células T periféricas expandidas *in vitro* después de estimulación con anticuerpo anti-CD3 soluble o PMA. Disminución de la "tasa respiratoria mitocondrial" calculada entre el estado de "control" (15 minutos antes de la inducción) y el estado "estimulado" (intervalos de tiempo indicados); experimentos (es decir, donantes) (n = 3).

(**B**) Captación de glucosa D-[3-^{3}H] medida en células **T** 1 hora después de activación (como en **A**). Los resultados se muestran como [%] del control (GAM - para anti-CD3; sin tratar - para PMA), (n = 8) experimentos +/- DE.

(**C**) Contenido de ATP intracelular de células T activadas (como en **A** y **B**), resultados de (n = 3) experimentos +/- DE.

(**D-J**) Las células se estimularon durante 1 hora con anticuerpo CD3 unido a placa (30 µg/ml) o PMA (10 ng/ml). **D** y **E,** señal oxidativa inducida por estimulación, medida después de preincubación: (**D**) en tampón HANKS + 110 µg/ml de piruvato + Glc/DOG (30 min) o (**E**) en medio de cultivo + BrPyr (20 min). **F**, se determinó la expresión de IL-2 e IκBα en células T tratadas como en (**E**) - medida representativa por triplicado. **G**, las células se congelaron bruscamente, se permeabilizaron y se midieron las actividades enzimáticas en estado estacionario de los complejos ETC. Los resultados para los experimentos (n = 8, panel superior) o (**n** = 4, panel inferior) se representan como [%] del control sin tratar (ajustado al 100 %, línea de trazos) +/- DE. **H** e **I**, las células se pretrataron (20 min) con BIM. En (**H**) la generación de la señal oxidativa se midió y se muestra la medida +/- DE triplicada representativa. En (**I**) se midieron las actividades enzimáticas en estado estacionario y se presentan como en (**G**). **J**, se midió el flujo de electrones desde complejo **I** (CI)/complejo II (CII) a complejo III (CIII) en células permeabilizadas o fracciones mitocondriales. Se presentan los datos para (n) experimentos +/- DE (como en **G**). **K**, se separaron los extractos celulares y se analizaron por HPLC. El cambio en el estatus redox de la ubiquinona se presentó como [%] de diferencia entre la proporción ubiquilonol/-ona de células de control (ajustadas a 0) y células activadas. Los datos se presentan como valor medio +/- DE para (n) experimentos (es decir donantes). Pruebat t de Student: $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*).

Figura 2: cambios ultraestructurales rápidos de las mitocondrias después de la activación de las células T

(**A-C**) Células T humanas periféricas expandidas *in vitro* se dejaron sin tratar (**A**) o se activaron durante 1 hora (**B, C**) con PMA (10 ng/ml) (**B**) o anticuerpo anti-CD3 unido a placa (30 µg/ml) (**C**). Las células se unieron, se tiñeron y se sometieron a microscopía electrónica. Se presentan imágenes representativas. Barras de escala: 1 µM (aumento 7000 X) o 200 nM (aumento 50.000 X).

Figura 3: la activación de las células T desvía el flujo glucolítico hacia la lanzadera GPD mitocondrial

(**A**) La ruta glucolítica (las flechas de bloque indican el flujo metabólico desviado). Se estimularon durante 1 hora

células T expandidas *in vitro* con anticuerpo CD3 unido a placa (30 µg/ml) (**B, C, E**), anticuerpo anti-CD3 reticulado con GAM (10 µg/ml) (**D**, control - GAM solo) o PMA (10 ng/ml) (**E, G**).

(**B**) Estatus de las enzimas glucolíticas después de activación de las células T (acrónimos - véase **A**). Los resultados se muestran como [%] del control sin tratar (ajustado al 100 %, línea de trazos); (n = 3) experimentos (es decir donantes) +/- DE.

(**C**) Flujo metabólico de fructosa-6-fosfato (F6P) hacia GPD1/GAPDH medido en el citosol de células T activadas. Activación y presentación de los datos como en (**B**).

(**D**) Cambio de la concentración de lactato después de activación de células T expandidas; (n) experimentos +/- DE.

(**E**) Cambio de la actividad de GPD2 en fracciones mitocondriales de células T activadas +/- pre-tratamiento con BIM, mostrado como [%] del control no estimulado; (n) experimentos (es decir donantes) +/- DE.

(**F**) Análisis qRT-PCR en tiempo real (panel izquierdo) y WB (panel derecho) de la silenciación de GP2 mediada por ARNip en células Jurkat.

(**G-I**) La expresión de GPD2 se silenció en células Jurkat (**G, I**) o células Jurkat estables del informador NF-κB-luciferasa (**H**). Las células se activaron con PMA (10 ng/ml) +/- Iono (1 µM) y se ensayaron ROS (**G**), la activación de NF-κB (**H**) o la inducción de la expresión de IL-2 (**I**). Los datos se presentan como experimentos representativos o valor medio de (n) experimentos +/- DE. Pruebaa t de Student: $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*).

Figura 4: la activación de las células T pone en marcha la actividad enzimática de ADPGK. Las células se estimularon durante 1 hora con un anticuerpo CD3 unido a placa (30 µg/ml) (B-D) o PMA (10 ng/ml) (C, E)

(**A**) Una disposición experimental para medir la actividad de hexocinasa (HK) acoplada a la respiración en mitocondrias de células T expandidas (fracción "rica en g").

(**B**) Resultados del experimento representado en (**A**); CCCP (0,125 µM), NaCN (10 mM).

(**C**) Panel izquierdo, actividad de ADPGK medida en las mitocondrias (fracción "rica en g") de células T activadas o células Jurkat +/pretratamiento con BIM (20 min). Los resultados para (n) experimentos (es decir donantes) se muestran como [%] del control sin tratar +/- DE. Panel derecho, WB de ADPGK humana en los lisados totales de células T humanas expandidas o células Jurkat.

(**D**) Análisis WB de fracciones mitocondrial ("rica en g") y citosólica de células T expandidas, activadas.

(**E**) Expresión de la construcción FLAG-ADPGK en células Jurkat (F-ADPGK Jurkat, EV Jurkat - células de control de vector vacío). Panel izquierdo, WB (flechas - proteínas F-ADPGK y ADPGK) y análisis de qRT-PCR en tiempo real del contenido y la expresión de (F-) ADPGK. Panel derecho superior, una construcción retroviral. Panel derecho inferior, actividad de ADPGK en fracciones "enriquecidas en ER" de células activadas F-ADPGK y EV Jurkat. Se presenta un experimento representativo triplicado +/- DE como en **C** (actividad para muestras de células Jurkat EV sin tratar ajustada a 0).

(**F**) Panel superior, WB de F-ADPGK inmunoprecipitada (IP; flechas: proteínas F-ADPGK y ADPGK; FLAG WB - anticuerpos anti-FLAG de conejo; ADPGK WB - anticuerpos de ratón, banda superior en ADPGK WB en la cadena H del anticuerpo anti-FLAG de ratón (M2) del linaje de "lavado" de EV Jurkat). Panel inferior, actividad de ADPGK en los inmunoprecipitados ("eluido"). Prueba t de Student: $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**).

Figura 5: el contenido reducido de ADPGK inhibe la generación de señal oxidativa inducida por activación y la respuesta de NF-κB

(**A**) Las células Jurkat se transfectaron con ARNip y se analizaron la expresión y el contenido de ADPGK por qRT-PCR en tiempo real y WB.

(**B-D**) Después de silenciación de ADPGK, células Jurkat (**B, D**) o células Jurkat del informador NF-κB-luciferasa estables (**C**), se activaron con PMA (10 ng/ml) +/- Iono (1 µM) y se analizaron la generación de la señal oxidativa (**B**), la activación de NF-κB (**C**), o la inducción de la expresión de IL-2 (**D**). Se presentan experimentos representativos realizados por triplicado (**C** y **D**, panel superior) o comparación inter-experimental (**B** y **D**, panel inferior).

(**E**) Niveles de proteína ADPGK en células T humanas "en reposo" y expandidas *in vitro* ("pre-activadas").

(**F**) Cambio de actividad de ASDPGK y GPD2 en fracciones mitocondriales "ricas en g" de células T humanas "en reposo" estimuladas durante 1 hora con anticuerpos anti-CD3 unidos a placa (30 µg/ml). Se muestran los resultados para (n) experimentos (es decir donantes) como [%] de los controles no estimulados +/- DE.

(**G**) Panel izquierdo, un análisis qRT-PCR en tiempo real de la silenciación mediada por ARNip de la expresión de

ADPGK en células T "en reposo". Panel derecho, después de la silenciación de ADPGK, las células T se estimularon con PMA (10 ng/ml) durante 1 hora y se midió la generación de la señal oxidativa (n = 3 experimentos). Prueba t de Student: p < 0,001 (***); p < 0,01 (**); p < 0,05 (*).

Figura 6

(**A-C**) Células Jurkat que expresaban establemente la proteína FLAG-ADPGK (F-ADPGK) (**A, C**) o células Jurkat (**C**) y células Jurkat del informador de NF-κB-luciferasa (**B**) que sobre-expresaban transitoriamente la proteína WT-ADPGK durante 24 horas (**B, C**) se activaron con PMA (10 ng/ml) +/- Iono (10 µM) durante 1 hora (**A, C**) o 6 horas (**B**). Después de ello, se analizaron (**A**) la señal oxidativa, (**B**) la activación de NF-κB, (**C**) la inducción de la expresión de IL-2, IL-8 o IκBα. Se presenta la comparación estadística de (n) experimentos triplicados (respuesta de las células de control EV ajustada a 100). **B,** análisis WB de la sobreexpresión transitoria de WT-ADPGK.

(**D**) Se midieron las actividades enzimáticas específicas de ADPGK y HK en fracciones mitocondriales "ricas en g" de células T humanas expandidas a 25 ºC, 30 ºC, 35 ºC y 42 ºC. La actividad de ADPGK a 25 ºC se ajustó al 100 %.

(**E**) La expresión de los genes ADPGK y GPD2 en células B normales (n = 9) y células CLL (n = 10) se analizó por qRT-PCR en tiempo real. Los valores de los niveles de "expresión relativa del gen" (normalizados a transcritos de actina) de dos reservas experimentales se presentan como "registros z". Prueba t de Student: p < 0,001 (***); p < 0,01 (**); p < 0,05 (*), los valores "aberrantes" se marcan con círculos. (**F**) Esquema de la ruta descrita. Flechas de bloque: cambios en actividad enzimática, transporte (glucosa), contenido de ubiquinol o dirección del flujo metabólico desviado.

Figura 7:

(**A**) Tasa de consumo de oxígeno mitocondrial representada como ΔCO_2 [ml O_2/l] de células **T** periféricas humanas expandidas *in vitro* antes y después de la activación. Flechas - estimulación con anticuerpos anti-CD3 soluble (10 µg/ml + 2 µg/ml GAM) o PMA (10 ng/ml). Se muestran registros representativos para tres experimentos independientes.

(**B** y **C**) Se tiñeron células T Jurkat o células T humanas primarias con H_2DCF-DA y se trataron con glucosa (Glc), 2-desoxi-glucosa (DOG) o 3-bromopiruvato (BrPyr) y se activaron luego como se describe en la Figura 1D y E. **B**, el estatus oxidativo intracelular se estimó por intensidad de tinción (unidades MFI relativas). **C**, señal oxidativa anti-CD3 medida como en la Figura **1E**. **D**, las células se trataron y se estimularon como en la Figura 1F y la expresión del gen IL-4 se ensayó por qRT-PCR en tiempo real.

Figura 8

(**A**) Las células T periféricas humanas expandidas *in vitro* se estimularon con anticuerpo anti-CD3 unido a placa (30 µg/ml) durante los periodos de tiempo indicados. A continuación, el contenido intracelular de los componentes de la cadena respiratoria seleccionados se analizó por WB.

(**B**) Panel izquierdo, fracciones mitocondriales de células T tratadas con anti-CD3 (como en **A**; dos donantes) se solubilizaron en tampón que contenía digitonina al 0,01 % y se resolvieron por BN-PAGE. Líneas rectas - influencia de la digitonina sobre el comportamiento migratorio del complejo III (complejo DC1). Recuadro de guiones – codos para el complejo III/GPD2. Panel derecho, marcador de masa molecular y análisis WB del gel BN-PAGE para GPD2.

Figura 9

(**A**) Células T periféricas humanas expandidas *in vitro* se tiñeron con H_2DCF-DA, se pretrataron durante 15 minutos con el inhibidor respectivo y se estimularon con anticuerpo anti-CD3 unido a placa (30 µg/ml) o PMA (10 ng/ml) durante 1 hora. A continuación, se midió la generación de la señal oxidativa por FACS.

(**B**) Actividad específica de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en mitocondrias aisladas a partir de células T periféricas humanas expandidas *in vitro* o tejido muscular de corazón de ratón.

Figura 10

(**A** y **B**) las células T humanas expandidas *in vitro* se pretrataron con bis-indolil-maleimidato I (BIM) durante 20 minutos y se estimularon con anticuerpos anti-CD3 unidos a placa (30 µg/ml) durante 1 hora. Las fracciones mitocondriales "ricas en g" se evaluaron respecto al contenido de HK1 y HK2 (**A**) o la actividad de HK (**B**). En **A**, las flechas indican bandas WB para anticuerpos anti-HK2. En **B**, se muestran los resultados para (n) experimentos independientes (*es decir* donantes) como [%] del control sin tratar (ajustado al 100 %, línea de trazos) +/- DE inter-experimental, prueba *t* p > 0,05 (no significativo).

Figura 11

(**A**) Células T Jurkat que expresaban de manera estable la proteína FLAG-ADPGK (F-ADPGK) y (**B**) células T

humanas periféricas expandidas *in vitro* (anticuerpo anti-CD3 unido a placa estimulado +/-, 30 µg/ml) se sometieron a fraccionamiento sub-celular en fracciones citosólicas, "enriquecidas en mitocondrias" y "enriquecidas en ER". Los contenidos de ADPGK se analizaron por WB; MnSOD - marcador mitocondrial, calreticulina - marcador ER soluble, ZnCuSOD - marcador citoplásmico. **B**, banda superior en ADPGK WB - cadena H de anticuerpo anti-CD3 de ratón utilizada para estimulación.

Figura 12:

Células T Jurkat después de regulación a la baja mediada por ARNip de la expresión de ADPGK (72 horas después de la transfección) se estimularon durante 1 hora con PMA (10 ng/ml) y ionomicina (Iono, 1 µM). La inducción de la expresión de los genes IL-8 e IκBα (normalizada para transcritos de actina) se analizó por qRT-PCR en tiempo real.

Figura 13:

Niveles de expresión de los genes basales IL-2, IκBα e IL-8 en células Jurkat no estimuladas que expresan de manera estable la proteína FLAG-ADPGK (F-ADPGK) o que sobre-expresan transitoriamente la proteína WT ADPGK (WT-ADPGK, 24 horas después de la transfección). Los niveles de transcrito se normalizaron para expresión de actina y se compararon con los niveles de expresión de células de control de vector vacío (EV) respectivas (ajustados a 1, línea de trazos). Se muestran los resultados para (n) experimentos independientes +/DE inter-experimental.

Figura 14: una comparación de las secuencias de aminoácidos (aa) y las estructuras secundarias de proteínas ADPGK de *Homo sapiens y Pyrococcus horikoshii* OT3

Para *H. sapiens* - predicción de la estructura secundaria por Jpred v.3 (*14*) (UniProtKB, secuencia canónica Q9BRR6-1), para *P. horikoshii* - restos de estructura secundaria basados en la estructura cristalina (código del Bancos de Datos de Proteínas: 1L2L) (*15*) comunes para estructuras cristalinas conocidas de proteínas termófilas ADPGK (*16*). Cuadrados grises - aminoácidos homólogos; cuadrados vacíos - aminoácidos similares; restos NXXD y GXGD - centro activo conservado; recuadro - péptido señal predicho.

Así, la presente invención se refiere a un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD2) o (b) la expresión del gen codificante de GPD2 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un neoplasma, una enfermedad autoinmune o la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) inhibiendo inducción de NF-κB.

La reducción o inhibición de la actividad biológica puede efectuarse por interacción directa o unión de un compuesto a GPD2 o por interacción indirecta, v.g., por interacción con un compuesto que está asociado con la actividad biológica de GPD2. La reducción o inhibición de la actividad biológica puede conseguirse también por aplicación de formas alteradas, v.g., formas inactivas de GPD2 preferiblemente en exceso.

Ejemplos de compuestos adecuados que reducen o inhiben la actividad biológica de GPD2, v.g., moduladores inmunosupresores, o la expresión del gen correspondiente con objeto de conseguir un efecto terapéutico son:

(a) plásmidos, vectores o virus naturales/sintéticos/mutados, oligonucleótidos de diversos tipos de modificación (v.g. PTO, LNA, 2F-ANA, complejos de proteínas-nucleótidos, ARN. ARNip o microARN$_{mi}$, metilmetoxi-, fosforoamidatos, PNA, morfolino, fosforoamidato, ciclohexen (CeNA), gap-meros, ribozima, aptámeros, oligos de CpG, ADN-zimas, riborreguladores , o lípidos o moléculas que contienen lípidos;

(b) péptidos, complejos peptídicos, incluyendo todos los tipos de engarces;

(c) moléculas pequeñas;

(d) anticuerpos y sus derivados, especialmente quimeras, fragmentos Fab, fragmentos Fc, o

(e) vehículos, liposomas, nanopartículas, complejos, o cualesquiera otros sistemas de administración que contienen las construcciones nombradas anteriormente,

(f) agentes oxidantes o agentes que modifican sulfhidrilos (grupos SH).

Compuestos adicionales adecuados para los propósitos de la presente invención y procedimientos para identificar/seleccionar tales compuestos se describen con mayor detalle más adelante.

Preferiblemente, en una composición farmacéutica, compuestos tales como los descritos arriba y más adelante están combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" debe entenderse que abarca cualquier vehículo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el paciente al que se administra. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales vehículos pueden formularse por procedimientos convencionales y el compuesto activo puede administrarse al individuo a una dosis eficaz.

Una "dosis eficaz" se refiere a una cantidad del ingrediente activo que es suficiente para afectar al curso y la gravedad de la enfermedad, v.g., neoplasia, conduciendo a la reducción o remisión de dicha patología. Una "dosis eficaz" útil para tratamiento puede determinarse utilizando procedimientos conocidos para un experto en la técnica.

La administración de las composiciones adecuadas pueden efectuarse por vías diferentes, v.g. por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La ruta de administración, por supuesto, depende de la clase de terapia y la clase de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado del tratamiento y otros factores clínicos. Como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, que incluyen el volumen del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular a administrar, el tiempo y la vía de administración, la clase de terapia, el estado general de salud y otros fármacos que se administren concurrentemente.

La persona experta en la técnica puede identificar o generar fácilmente compuestos útiles para los tratamientos de la presente invención basándose en el conocimiento de las secuencias de aminoácidos de GPD2 y las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican estas proteínas (GPD2, secuencia de nucleótidos: NCBI NM_001083112.2; secuencia de aminoácidos, secuencia canónica de UniProtKB P43304-1).

En una realización adicionalmente preferida de la presente invención, el compuesto útil para reducir o inhibir la expresión del gen que codifica GPD2 es un oligonucleótido antisentido o ARNip específico para dicho gen.

La generación de oligonucleótidos antisentido adecuados incluye determinación de un sitio o sitios en el gen que codifica GPD2 para que ocurra la interacción antisentido de tal modo que resulte el efecto deseado, v.g., inhibición de la expresión de la proteína. Un sitio intragénico preferido es (a) la región que abarca el codón de iniciación o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del gen o (b) una región del ARNm que es un "bucle" o "protuberancia", es decir no forma parte de una estructura secundaria. Si se han identificado uno o más sitios diana, se seleccionan oligonucleótidos que sean suficientemente complementarios a la diana, es decir, se hibriden suficientemente bien y con suficiente especificidad, para producir el efecto deseado. En el contexto de esta invención, "hibridación" significa unión por enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inversos, entre bases complementarias nucleosídicas o nucleotídicas. "Complementario", como se utiliza en el presente documento, alude a la capacidad para apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en cierta posición de un oligonucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces el oligonucleótido y el ADN o ARN se considera que son complementarios entre sí en dicha posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Así, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso de tal modo que ocurre unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de ADN o ARN. En la técnica se entiende que la secuencia de un compuesto antisentido no precisa ser complementaria al 100 % a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula diana de ADN o ARN interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para causar una pérdida de utilidad y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión inespecífica del compuesto antisentido a las secuencias distintas de la diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en el caso de tratamiento terapéutico.

La persona experta puede generar compuestos antisentido y ARNip conforme a la presente invención sobre la base de las secuencias de ADN conocidas para GPD2.

"Oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases existentes en la naturaleza, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (cadena principal) así como oligonucleótidos que tienen porciones no existentes en la naturaleza que funcionan de modo análogo. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren a menudo a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, absorción celular mejorada, afinidad mejorada para el ácido nucleico diana y estabilidad incrementada en presencia de nucleasas. Si bien los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida del compuesto antisentido, la presente invención comprende otros compuestos antisentido oligómeros, que incluyen, pero sin carácter limitante, miméticos de oligonucleótidos tales como los descritos más adelante. Los compuestos antisentido conforme a la presente invención comprenden desde aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleobases (es decir desde aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleósidos enlazados). Compuestos antisentido particularmente preferidos son oligonucleótidos antisentido, aún más preferiblemente aquellos que comprenden desde aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleobases. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, secuencias guía externas (EGS), oligonucleótidos (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que se hibridan al ácido nucleico diana e inhiben su expresión.

Alternativamente, el compuesto de la invención es un vector que permite transcribir un oligonucleótido antisentido de la invención, v.g., en un hospedador mamífero. Preferiblemente, un vector de este tipo es un vector útil para terapia génica. Vectores preferidos útiles para terapia génica son vectores virales, v.g. adenovirus, herpesvirus, vaccinia, o,

más preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Todavía más preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de tales vectores retrovirales que pueden utilizarse en la presente invención son: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus de tumor mamario murino (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Lo más preferiblemente, se emplea un vector retroviral de primate no humano, tal como el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), que proporciona una gama de hospedadores más amplia comparado con los vectores murinos. Dado que los retrovirus recombinantes son defectuosos, se requiere ayuda a fin de producir partículas infecciosas. Dicha ayuda puede proporcionarse, v.g., por utilización de linajes de células adyuvantes que contienen plásmidos que codifican la totalidad de los genes estructurales del retrovirus sometidos al control de secuencias reguladoras en la LTR. Linajes adecuados de células adyuvantes se conocen bien por los expertos en la técnica. Dichos vectores pueden contener adicionalmente un gen que codifique un marcador seleccionable a fin de que puedan identificarse las células transducidas. Además, los vectores retrovirales pueden modificarse de tal modo que lleguen a ser específicos de la diana. Esto puede conseguirse, v.g., insertando un polinucleótido que codifica un azúcar, un glucolípido, o una proteína, preferiblemente un anticuerpo. Los expertos en la técnica conocen procedimientos adicionales para generación de vectores específicos de la diana. Vectores adecuados adicionales y procedimientos para terapia génica in vitro o in vivo se describen en la bibliografía y son conocidos por las personas expertas en la técnica; véanse, v.g., documentos WO 94/29469 o WO 97/00957.

Para lograr la expresión únicamente en el órgano diana las secuencias de ADN para transcripción de los oligonucleótidos antisentido pueden enlazarse a un promotor específico de tejido y utilizarse para terapia génica. Tales promotores se conocen bien por los expertos en la técnica.

En una estructura de oligonucleótido, se hace comúnmente referencia a los grupos fosfato como formadores de la cadena principal internucleosídica del oligonucleótido. El enlace o cadena principal normal de ARN y ADN es un enlace 3' a 5' fosfodiéster. Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Cadenas principales de oligonucleótidos modificados que pueden dar como resultado estabilidad incrementada se conocen por las personas expertas en la técnica, siendo preferiblemente dicha modificación un enlace fosforotioato.

Un mimético de oligonucleótido preferido es un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado tiene propiedades de hibridación excelentes y se hace referencia al mismo como ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido está reemplazada con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y están unidas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal.

Oligonucleótidos modificados pueden contener también uno o más restos azúcar sustituidos o modificados. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; u O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, el alquenilo y el alquinilo pueden ser alquilo C_1 a C_{10} o alquenilo y alquinilo C_2 a C_{10} sustituidos o insustituidos. Un resto azúcar modificado particularmente preferido es un resto azúcar 2'-O-metoxietilo.

Los oligonucleótidos de la invención pueden incluir también modificaciones o sustituciones de nucleobases. Nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil- y otros alquil-derivados de adenina y guanina, 2-propil- y otros alquil-derivados de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, etc., con sustituciones de 5-metilcitosina prefiriéndose dado que se ha demostrado que estas modificaciones aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la absorción celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, un tiocolesterol, una cadena alifática, v.g., residuos dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano-acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, constituida cada una por al menos una unidad monómera, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleotídico. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado a fin de conferir al oligonucleótido resistencia incrementada a la degradación por las nucleasas, captación celular incrementada, y/o afinidad de unión incrementada para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la ARNasa H, por tanto, da como resultado la escisión de la diana ARN, aumentado con ello notablemente la eficiencia de

inhibición del oligonucleótido de la expresión génica. Por consiguiente, pueden obtenerse a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, comparados con los desoxioligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. Compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleosidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se han descrito anteriormente. A tales compuestos se ha hecho referencia también en la técnica como híbridos o gápmeros.

Conforme a la presente invención el compuesto de la presente invención se utiliza para el tratamiento de (i) un neoplasma o (b) una enfermedad autoinmune, o la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD).

"Neoplasma" es una masa anormal de tejido como resultado de una neoplasia. "Neoplasia" es la proliferación anormal de las células. El crecimiento de las células excede y está descoordinado con respecto a los tejidos normales a su alrededor. El crecimiento persiste de la misma manera excesiva, incluso después de cesación de los estímulos. El mismo causa usualmente un bulto o un tumor. Los neoplasmas pueden ser benignos, pre-malignos (carcinoma-in-situ) o malignos (cáncer). Los neoplasmas a tratar conforme a la presente invención comprenden aquellos que (sobre)expresan ADPGK. Así, la determinación de GPD2 en un neoplasma es una indicación para el comienzo con una terapia inhibidora de GPD2. Un neoplasma a tratar es particularmente leucemia linfocítica crónica de las células B o cualquier neoplasma caracterizado porque la activación de las células T exhibe un efecto beneficioso, es decir, tumores del sistema inmune y tumores caracterizados por activación constitutiva de los niveles de NF-kappaB y/o niveles de ROS incrementados. Ejemplos de tales tumores son Mieloma Múltiple (MM), linfoma de células B grandes difusas, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), linfoma de las células T adultas (ATL) y leucemia linfoblástica aguda de la infancia/las células T (ALL/T-ALL), linfoma de Hodgkin (HN), linfoma no-Hodgkin, linfoma de Malta, linfoma de las células T cutáneas (CTCL), v.g., Síndrome de Sézary (SS) y Carcinoma Hepatocelular (HCC).

Enfermedades autoinmunes preferidas que pueden tratarse con un compuesto de la presente invención son v.g., reumatismo, lupus eritematoso, psoriasis, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, o diabetes.

Ejemplos adicionales de compuestos capaces de reducir o inhibir la actividad biológica de GPD2 son anticuerpos (neutralizantes) dirigidos contra estas proteínas o fragmentos de los mismos que tienen sustancialmente la misma especificidad de unión o seudo-sustratos. El término "anticuerpo", preferiblemente, se refiere a anticuerpos que están constituidos esencialmente por anticuerpos monoclonales agrupados con especificidades epitópicas diferentes, así como a preparaciones de anticuerpos monoclonales distintos. Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de un antígeno que contiene, v.g., un fragmento de ADPGK por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, v.g., Köhler et al., Nature 256 (1975), 495). Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) debe entenderse que incluye moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')2) que son capaces de unirse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')2 carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión a tejidos inespecíficos que un anticuerpo intacto. (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)). Por ello, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de una biblioteca de expresión de FAB u otra expresión de inmunoglobulinas. Además, los anticuerpos útiles para los propósitos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados.

Alternativamente, compuestos preferidos para los propósitos de la invención son versiones inactivas de GPD2, o secuencias de ácidos nucleicos que codifican versiones inactivas de estas proteínas que pueden introducirse conforme a los procedimientos/vectores arriba descritos. Tales versiones inactivas pueden generarse conforme a procedimientos de mutagénesis bien conocidos. Tales compuestos pueden tener un efecto terapéutico en el cuerpo humano por desplazamiento de su contrapartida funcionalmente activa, en particular cuando se aplican en exceso. Análisis de versiones potencialmente inactivas de GPD2 pueden realizarse ensayando la transaminación (reversible) de L-aminoácidos de cadena ramificada a alfa-cetoácidos de cadena ramificada, v.g., por determinación de la producción de glutamato. Ensayos adecuados se describen en la bibliografía.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar un compuesto capaz de modular la actividad biológica de GPD2 y/o la expresión de GPD2, que comprende las etapas de:

(a) incubar un compuesto candidato con un sistema de prueba que comprende GPD2 o el gen que codifica GPD2; y

(b) ensayar una actividad biológica de GPD2;

en las que una reducción de la actividad biológica de GPD2, comparada preferiblemente con un sistema de prueba en ausencia de dicho compuesto de prueba, es indicativa de la presencia de un compuesto candidato que tiene la propiedad deseada de inhibir la activación de NF-κB.

La reducción de la actividad biológica de GPD2 puede ensayarse por determinación de la concentración de la proteína, v.g., por el uso de un anticuerpo específico o por determinación directa de la actividad enzimática de la proteína, v.g., determinando el cambio de la concentración de un sustrato o producto final específico como se describe, v.g., en el Ejemplo 1.

Ejemplos de tales moléculas candidatas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas, o moléculas pequeñas. Tales moléculas pueden diseñarse racionalmente utilizando técnicas conocidas.

Preferiblemente, dicho sistema de prueba utilizado para cribado comprende sustancias de propiedades químicas y/o físicas similares, lo más preferentemente dichas sustancias son casi idénticas. Los compuestos que se pueden preparar e identificar conforme a un uso de la presente invención pueden ser bibliotecas de expresión, v.g., bibliotecas de expresión de ADNc, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, ligandos, hormonas, peptidomiméticos, PNA o análogos.

El documento WO 98/25146 describe procedimientos adicionales para cribado de bibliotecas de complejos respecto a compuestos que tengan una propiedad deseada, especialmente, la capacidad de agonizar, unirse a, o antagonizar un polipéptido o su receptor celular. Los complejos en tales bibliotecas comprenden un compuesto sometido a prueba, una etiqueta que registra al menos una etapa en la síntesis del compuesto y una atadura susceptible de modificación por una molécula informadora. La modificación de la atadura se utiliza para significar que un complejo contiene un compuesto que tiene una propiedad deseada. La etiqueta puede descodificarse para revelar al menos una etapa en la síntesis de un compuesto tal. Otros procedimientos para identificación de compuestos que interaccionan con GPD2, respectivamente, o moléculas de ácido nucleico que codifican tales moléculas son, por ejemplo, el cribado in vitro con el sistema de presentación de fago así como ensayos de unión en filtro o medida de la interacción en "tiempo real".

Se sabe también bien por el experto en la técnica que es posible diseñar, sintetizar y evaluar miméticos de compuestos orgánicos pequeños que, por ejemplo, pueden actuar como sustrato o ligando para GPD2.

Todos estos procedimientos pueden utilizarse conforme a la presente invención para identificar un compuesto que module, v.g., reduzca o inhiba la actividad biológica de GPD2 o su expresión.

El gen que codifica GPD2 puede servir también como diana para el cribado de activadores o inhibidores, v.g., moduladores inmunosupresores. Los inhibidores pueden comprender, por ejemplo, proteínas que se unen al ARNm de los genes que codifican ADPGK o GPD2, desestabilizando con ello la conformación natural del ARNm y dificultando la transcripción y/o traducción. Además, se describen en la bibliografía procedimientos para identificar moléculas de ácido nucleico tales como un fragmento de ARN que mimetiza la estructura de una molécula de ARN diana definida o indefinida a la que se une un compuesto en el interior de una célula dando como resultado el retardo del crecimiento de la célula o la muerte de la célula; véase, v.g., WO 98/18947 y las referencias citadas en él. Estas moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para identificar compuestos desconocidos de interés farmacéutico y para identificar dianas de ARN desconocidas para su uso en el tratamiento de una enfermedad. Estos procedimientos y composiciones pueden utilizarse para identificar compuestos útiles para reducir los niveles de expresión de GPD2.

Los compuestos que pueden probarse e identificarse conforme al procedimiento de la invención pueden ser bibliotecas de expresión, v.g., bibliotecas de expresión de ADNc, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, hormonas, peptidomiméticos, PNA o análogos. Además, los genes que codifican un regulador supuesto de GPD2 y/o que ejerce sus efectos aguas arriba o aguas abajo de GPD2 pueden identificarse utilizando mutagénesis de inserción empleando, por ejemplo, vectores de direccionamiento de genes conocidos en la técnica. Dichos compuestos pueden ser también derivados funcionales o análogos de inhibidores, sustratos o moduladores conocidos. Tales compuestos útiles pueden ser por ejemplo factores de transacción que se unen a ADPGK o a secuencias reguladoras del gen que codifica la misma. La identificación de factores de transacción puede llevarse a cabo utilizando procedimientos estándar en la técnica. Para determinar si una proteína se une a la proteína propiamente dicha o a secuencias reguladoras, pueden realizarse análisis de desplazamiento de gel nativo estándar. Con objeto de identificar un factor de transacción que une a la proteína o a la secuencia reguladora, la proteína o secuencia reguladora puede utilizarse como un reactivo de afinidad en procedimientos estándar de purificación de proteínas, o como una sonda para cribado de una biblioteca de expresión. La identificación de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que interaccionan con GPD2 puede realizarse también, por ejemplo, por el uso del denominado "sistema de dos híbridos" de levadura. En este sistema se une GPD2 al dominio de unión del ADN del factor de transcripción GAL4. La cepa de levadura que expresa este polipéptido de fusión y que comprende un gen informador lacZ estimulado por un promotor apropiado, que es reconocido por el factor de transcripción GAL4, se transforma con una biblioteca de ADNc que expresará proteínas vegetales o péptidos de las mismas fusionados a un dominio de activación. Así, si el péptido codificado por uno de los ADNc es capaz de interaccionar con el péptido de fusión que comprende un péptido de GPD2, el complejo es capaz de dirigir la expresión del gen informador. De esta manera, GPD2 y el gen codificante de GPD2 pueden utilizarse para identificar péptidos y proteínas que interaccionan con GPD2. Es evidente para las personas expertas en la técnica que este sistema y sistemas similares pueden ser aprovechados luego para la identificación de inhibidores. Finalmente, la presente solicitud describe un procedimiento de seleccionar una modalidad de terapia para un paciente afligido con una enfermedad como se ha caracterizado anteriormente, que comprende

(a) obtener una muestra de dicho paciente; y

(b) determinar el nivel y/o la actividad de GPD2;

por el que el modo de tratamiento depende del nivel y/o actividad de GPD2.

Preferiblemente, el nivel de GPD2 se determina sobre el nivel de proteínas utilizando un anticuerpo que se une específicamente a GPD2 o por determinación de una actividad biológica de la proteína.

En el procedimiento que se relaciona con la selección de una modalidad de terapia para un paciente, los términos "modalidad de terapia" o "modo de tratamiento" se refieren a una administración secuencial o simultánea en el tiempo de compuestos que tienen un efecto sobre el nivel/actividad de GPD2, respectivamente, con tal que los resultados del procedimiento de la invención indiquen que la enfermedad está asociada con un nivel/actividad aberrante de ADPGK.

Los ejemplos que siguen explican la invención con mayor detalle.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

(A) Productos químicos

Si no se indica nada en contrario, todos los reactivos y enzimas utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Munich, Alemania). El diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF-DA) se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). El Iono se adquirió de Merck (Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos primarios para la transferencia Western (WB) eran: de Sigma-Aldrich (Munich, Alemania) - anti-FLAG monoclonal de ratón (M2), anti-FLAG policlonal de conejo, anti-γ-tubulina monoclonal de ratón, anti-GPD2 policlonal de conejo (Human Protein Atlas Antibodies); de Cell Signaling (Denvers, MA, EE.UU.) - anti-HK1 policlonal de conejo y anti-HK2 policlonal de conejo; de Abcam (Cambridge, Reino Unido) - ADPGK anti-humana monoclonal de ratón (1E4); de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.) - anti-SOD1 policlonal de cabra; de Millipore (Darmstadt, Alemania) - anti-SOD2 policlonal de conejo, de ABR (Golden, CO, EE.UU.) - anti-calreticulina policlonal de conejo; de GeneTex, Irvine, CA, EE.UU.) - anti-β-actina policlonal de conejo y de Thermo Scientific (Bonn, Alemania) - anticuerpo anti-PHB1 monoclonal de ratón (II-14-10). El contenido de los complejos respiratorios mitocondriales se analizó utilizando Cóctel de Anticuerpos WB OXPHOS Total de Mito Sciences (Eugene, OR, EE.UU.). Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD20 conjugados con FITC eran de Becton Dickinson (Heidelberg, Alemania). El anticuerpo anti-ratón reticulante policlonal de cabra (GAM) se obtuvo de Southern Biotech (Birmingham, AL, EE.UU.). El anticuerpo monoclonal de ratón (OKT3) contra CD3 humano se preparó como se describe (*1*).

(B) Aislamiento de células T y células B humanas periféricas

Generalmente, los linfocitos T de sangre periférica humana se purificaron como se ha descrito anteriormente (1). Los linfocitos B de sangre periférica humana se prepararon a partir del anillo de la interfase en gradiente Ficoll por clasificación MACS negativa ("B Cell Isolation Kit II", Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). La homogeneidad de las células T y B preparadas se comprobó por tinción con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD20 conjugados con FITC, seguida por análisis FACS y se estimó que era > 93 % (células B) y > 90 % (células T).

(C) Pacientes

Se obtuvo consentimiento informado de todos los individuos antes de la inclusión. Nueve de diez pacientes no recibieron tratamiento alguno antes de la terapia. Los datos de los pacientes (edad, sexo y análisis genético de muestras CLL) pueden encontrarse en la Tabla 1. Las células B de los pacientes CLL se aislaron por centrifugación Ficoll-Paque (GE Healthcare; Chalfont St. Giles, Reino Unido). Se estimó que la pureza era > 90 %. El estudio se condujo conforme a las orientaciones éticas del Centro de Investigación del Cáncer Alemán (DKFZ, Heidelberg) y la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética II de la Universidad Ruprecht-Karls de Heidelberg, Alemania.

(D) Cultivo de células

Las células J16-145 Jurkat del linaje de células T, sub-clon J16 (2) se cultivaron en RPMI1640 (+L-glutamina), suero de ternero fetal al 10 % (FCS). Células J16-145 informadoras de NF-κB de luciferasa de *Gaussia* se cultivaron en IMDM, FCS al 10 %. Células T humanas periféricas aisladas recientemente ("en reposo") o activadas con fitohemaglutinina (PHA) y expandidas *in vitro* durante 6-8 días ("pre-activadas") se cultivaron a una concentración inicial de 2 x 10^6 células/ml en RPMI1640 (+L-glutamina), FCS al 10 %. Para la expansión inducida por pre-activación, las células T "en reposo" se trataron con 1 µg/ml de PHA durante 16 horas, se lavaron y se cultivaron subsiguientemente en presencia de 25 U/ml de IL-2 durante 6-8 días. Se hace referencia a estas células como "células T" en el texto, si no se indica otra cosa.

(E) Determinación de la generación de ROS

Se tiñeron las células con H_2DCF-DA (5 µM) durante 30 min. A continuación, las células se dividieron y se estimularon durante 1 h con anticuerpo anti-CD3 unido a placa (30 µg/ml) o PMA (10 ng/ml). El tratamiento se terminó por PBS enfriado en hielo y la generación de ROS se determinó por análisis FACS (Canto II, Becton

Dickinson). La generación de ROS se cuantificó como el aumento en intensidad media de fluorescencia (MFI), calculada conforme a la fórmula siguiente: aumento en MFI (%) = [($MFI_{estimulada}$ - $MFI_{no\ estimulada}$)/$MFI_{no\ estimulada}$] x 100 (3).

(F) Células permeabilizadas con digitonina

Células T expandidas *in vitro* (al menos 0,5 x 10^8) se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido y se incubaron subsiguientemente sobre hielo en tampón ETC (Tris-HCl 20 mM de pH 7,4, sacarosa 250 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM) con digitonina al 0,015 % durante 30 min conforme a Chretien *et al*. (4) con modificaciones de menor importancia. Después de ello, las células se lavaron dos veces con tampón ETC enfriado en hielo y se sometieron a los ensayos.

(G) Preparación de fracciones sub-celulares

Las células se disgregaron utilizando una aguja de 27x1/2" en tampón ETC enfriado en hielo y los homogeneizados se centrifugaron a 600 x g, 4 ºC durante 10 min. Para preparación de la fracción mitocondrial "rica en g" (sedimento) así como la fracción citosólica (sobrenadante) se centrifugó el sobrenadante de 600 x g a 11.000 x g, 4 ºC durante 20 min. Para preparación de las fracciones "enriquecidas en mitocondrias", el sobrenadante de 600 x g se centrifugó 10 min, 4 ºC a 3.500 x g (sedimento). Subsiguientemente, para preparación de la "fracción enriquecida en RE" se centrifugó el sobrenadante de 3.500 x g a 11.000 x g, 4 ºC durante 20 min. Las mitocondrias musculares de corazón de ratón se prepararon conforme al procedimiento para fracción "enriquecida en mitocondrias" como se describe en (5).

(H) Cadena de transporte de electrones (ETC) y flujo de electrones

La actividad en estado estacionario de complejos enzimáticos ETC se determinó como se describe (5, 6) utilizando un espectrofotómetro ajustable por computadora (Spectramax Plus Microplate Reader, Molecular Devices; Sunny Vale, CA, EE.UU.) que operaba en el modo de longitud de onda dual; las muestras se analizaron en placas de 96 pocillos controladas en temperatura en un volumen final de 300 µl. La adición de inhibidores de la cadena respiratoria estándar se utilizó para comprobar la especificidad de los ensayos enzimáticos. Todas las actividades enzimáticas se normalizaron a la concentración de proteína. Para las células T estimuladas se midieron las actividades enzimáticas de ETC después de congelación brusca y permeabilización con digitonina (como se ha descrito anteriormente). Para estudiar el flujo de electrones del complejo I o complejo II al complejo III se incubaron células permeabilizadas con digitonina o fracciones mitocondriales con NADH o succinato y se midió la reducción del citocromo c en presencia de NaCN.

(I) Medida de la actividad de las enzimas glucolíticas

Todas las enzimas aplicadas se adquirieron de Sigma-Aldrich y se prepararon a partir de músculo de conejo.

- La actividad de hexocinasa (HK) se ensayó como reducción de NADP en tampón ETC que contenía ATP 1 mM, glucosa 1 mM, NADP 0,5 mM, 0,05 U/ml de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

- La actividad de gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) se detectó como reducción de NAD en un tampón que contenía KPi 10 mM, NAD 1 mM, cisteína 3,3 mM, EDTA 0,2 mM, $MgCl_2$ 0,2 mM, ADP 1 mM.

- La actividad de glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GPD2) se midió como reducción del citocromo c en tampón de ETC que contenía glicerol-3-fosfato 5 mM, NaCN 2 mM y citocromo c 60 µM.

- La actividad de triosa-fosfato-isomerasa (TPI) se ensayó como oxidación de NADH en tampón de ETC que contenía NADH 0,2 mM, DL-gliceraldehído-3-fosfato 4,9 mM, 0,4 U/ml de α-glicerofosfato-deshidrogenasa (GPD1).

- La actividad de fosfofructocinasa (PFK) se detectó como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía fructosa-6-fosfato 4 mM, ATP 2 mM, NADH 0,5 mM, 0,2 U/ml de aldolasa, 0,8 U/ml de TPI, 0,1 U/ml de GPD1.

- La actividad de piruvato-cinasa (PK) se detectó como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía fosfoenolpiruvato 1 mM, ADP 1 mM, NADH 0,5 mM, 2 U/ml de LDH.

- La actividad de lactato-deshidrogenasa (LDH) se registró como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía piruvato 1 mM, NADH 0,5 mM.

- La reacción directa de enolasa (ENO) se midió como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía 2-fosfoglicerato 1 mM, ADP 1 mM, NADH 0,5 mM, 2 U/ml de LDH, 2 U/ml de PK. La reacción inversa se ensayó en tampón ETC que contenía fosfoenolpiruvato 1 mM, ATP 1 mM, NADH 0,5 mM, 2 U/ml de NDH, 2 U/ml de PK.

- La actividad de fosfoglicerato-mutasa (PGM) se registró como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía 2-fosfoglicerato 1 mM, ATP 1 mM, fosfoenolpiruvato1 mM, NADH 0,5 mM, 2 U/ml de LDH, 2 U/ml de PK. La reacción inversa se ensayó en tampón ETC que contenía 3-fosfoglicerato 1 mM, ADP 1 mM, NADH 0,5 mM, 2 U/ml de LDH, 2 U/ml de PK.

- La reacción inversa de fosfoglicerato-cinasa (PGK) se ensayó en tampón ETC que contenía 3-fosfoglicerato 1 mM, ATP 1 mM, NADH 0,5 mM, 2 U/ml de LDH, 2 U/ml de PK.

(J) Flujo de fructosa-6-fosfato

El flujo de fructosa-6-fosfato por la ruta GPD se midió como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía fructosa-6-fosfato 1 mM, ATP 1 mM, NADH 0,5 mM, 0,1 U/ml de GPD1. El flujo a través de la rama GAPDH se registró en tampón ETC que contenía KPi 1 mM, fructosa-6-fosfato 1 mM, ATP 1 mM, NAD 0,5 mM y 0,1 U/ml de GAPDH.

(K) Captación de glucosa

Después del tratamiento, las células (1-2 x 10^7 células) se lavaron y se suspendieron en tampón Krebs-Ringer. Subsiguientemente, se incubaron las células con 1 µCi/ml de D-[3-^{3}H]-glucosa durante 10 min a 37 ºC. Después de ello, las células se lavaron dos veces con tampón Krebs-Ringer enfriado en hielo y se detectó la D-[3-^{3}H]-glucosa intracelular utilizando un contador de centelleo (LS 6500 Liquid Scintillation Counter Beckman Coulter; Brea, CA, EE.UU.).

(L) Electrodo de oxígeno

La tasa respiratoria mitocondrial se midió conforme a un protocolo descrito previamente (7) utilizando el sistema de oxígrafo Oroboros 1 de alta resolución con soporte por computadora (Para, Graz, Austria). Células T expandidas *in vitro* (5-10 x 10^7 células) se pusieron en cada cámara de electrodo y se activaron con anticuerpo anti-CD3 soluble (10 µg/m, reticulado con GAM, 2 µg/ml) o PMA (10 ng/ml). La disposición experimental era como se ha descrito previamente (8). La "tasa respiratoria mitocondrial" se calculó sustrayendo la "tasa de consumo de oxígeno de fondo" (registrada con un electrodo de referencia en presencia de oligomicina 5 µM) de la "tasa de consumo de oxígeno total" (como se describe en (8)).

(M) Cuantificación de lactato

Al menos 2 x 10^7 células T expandidas se suspendieron en medio RPMI 1640 recién preparado (+ suplementos e IL-2), se activaron luego con anticuerpo anti-CD3 soluble (10 µg/ml) reticulado con GAM (2 µg/ml) durante 1 hora. Las concentraciones de lactato en el medio se detectaron utilizando un sistema Olympus AU400 (Olympus, Tokio, Japón) y se normalizaron a la concentración de proteínas de los lisados de células respectivos.

(N) Ensayo de actividad de glucocinasa dependiente de ADP (ADPGK)

La actividad de ADPGK se ensayó como reducción de NADP en tampón ETC que contenía ADP 1 mM, glucosa 1 mM, NADP 0,5 mM, diadenosina-pentafosfato 5 µM y 0,05 U/ml de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa a pH 6,0 y 37 ºC o 42 ºC. El ensayo estaba basado esencialmente en el descrito previamente para la proteína ADPGK recombinante de ratón (9).

(O) Ensayo de actividad de adenilato-cinasa (AK)

La actividad de AK se ensayó como reducción de NADP en tampón ETC que contenía ADP 1 mM, glucosa 1 mM, NADP 0,5 mM, 1 U/ml de HK y 0,05 U/ml de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa a pH 7,5 y 37 ºC.

(P) Determinación del contenido de ATP

La concentración de ATP se determinó utilizando un ensayo "CellTiter Glo" (Promega) conforme a las instrucciones del fabricante y un luminómetro de 96 pocillos (Orion L, Berthold; Bad Wildbad, Alemania). Los resultados se normalizaron a la concentración de proteínas.

(Q) Determinación del contenido de ubiquinol/ubiquinona

Al menos 5 x 10^7 células T humanas expandidas *in vitro* se trataron con anticuerpo anti-CD3 unido a placa (30 µg/ml) o PMA (10 ng/ml) durante 1 hora. Las células se lavaron, se redujeron a un sedimento, se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido y se pusieron en hielo seco. La extracción de ubiquinol/ona se realizó por adición de 300 µl de hexano:isopropanol (2:1) enfriado en hielo y centrifugación subsiguiente (15.000 g) durante 5 min a 0 ºC. A continuación, se inyectaron inmediatamente 150 µl del sobrenadante y se separaron por RP-HPLC. Las condiciones de separación e identificación por HPLC estaban basadas en procedimientos publicados previamente (*10, 11*). Sistema de cromatografía aplicado: bomba de gradiente de baja presión LaChrom LC-7100 con válvulas de dosificación, columna L-7350 termostatizada con módulo de refrigeración L-7350/L-7351 Peltier, detector de red de diodos L-7450A UV/VIS-DAD (Merck-Hitachi; Darmstadt, Alemania), detector amperométrico pulsado (PAD) 817 Bioscan (Metrohm; Herisau, Suiza), columna LiChrospher RP18e 125x4 mm (Merck; Darmstadt, Alemania), desgasificador de 4 canales (Knauer; Berlín, Alemania), elución isocrática con metanol:hexano:isopropanol:ácido acético (83:27,5:1,5:1,5 v/v + acetato de sodio 4,2 g/l; pH = 6), caudal - 1 ml/min, temperatura 25 ºC. La identificación estaba basada en los espectros de absorción UV/VIS-DAD y se facilitaba por la respuesta redox detectada con detector voltamperométrico. La cuantificación se realizó basándose en cromatogramas UV-VIS a longitudes de onda:

275 nm (ubiquinona) y 289 nm (ubiquinol). Los resultados cualitativos y cuantitativos seleccionados del análisis UV-UVIS-DAD se confirmaron por HPLC-EM/IE (Agilent; Santa Clara, CA, EE.UU.).

(R) Ensayo del informador de luciferasa para activación de NF-κB

Las células T Jurkat J16-145 transfectadas de manera estable con el informador NF-κB basado en luciferasa de *Gaussia* fueron proporcionadas amablemente por Dr. Marcus Brechman y Dr. Rüdiger Arnold. Brevemente, después de intercambiar el medio, las células se indujeron con Iono (10 µM) y/o PMA (10 ng/ml) durante 6 horas por triplicado para cada condición experimental. Se aplicaron 20 µl del medio recogido para lectura de luminiscencia utilizando "Jugo Gaussia" (P.J.K.; Kleinblittersdorf, Alemania) y un luminómetro de placa de 96 pocillos (Orion L; Berthold, Bad Wildbad, Alemania). La señal de luminiscencia se normalizó al número de células vivas evaluado por el procedimiento de exclusión con Azul Tripán.

(S) Inmunoprecipitación y WB

Al menos 8 x 10^7 células T Jurkat F-ADPGK o EV se lisaron en un tampón que contenía NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris-HCl 10 mM, Tritón X-100 al 0,5 % durante 45 min a 4 ºC. Los lisados se centrifugaron a 11.000 g, 4 ºC durante 10 min. Los sobrenadantes se aplicaron sobre perlas de agarosa reticulados covalentemente con anticuerpos anti-FLAG M2 (ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, Sigma). Las etapas de lavado y elución con el péptido FLAG se realizaron conforme al protocolo del fabricante. Los productos eluidos se sometieron directamente al ensayo de actividad de ADPGK o se congelaron y se analizaron por WB (3).

(T) Experimentos de sobreexpresión de ADPGK

Para expresión transitoria de WT-ADPGK se utilizaron la secuencia de ADNc de la variante 1 de un transcrito de ADPGK humana (UniProtKB, secuencia canónica Q9BRR6-1) clonada en el plásmido pCMV6-AC (proporcionado por Origene; Rockville, MD, EE.UU.) o el vector vacío pCMV6-AC de control (Origene). Células J16-145 o el clon J16-145 informador de luciferasa de Gaussia de NF-κB se transfectaron con 2 µg de ADN plasmídico/transfección utilizando tecnología de nucleofección AMAXA ("Cell Line Nucleoceptor® V kit", Lonza; Colonia, Alemania) conforme a las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, se sometieron las células a los procedimientos experimentales. Se generaron agrupaciones de células J16-145 que expresaban establemente la proteína FLAG-ADPGK (células Jurkat F-ADPGK) o vector vacío (células de control) utilizando vectores de expresión retrovirales proporcionados por Addgene (Cambridge, MA, EE.UU.): pWZL-Neo-Myr-Flag-ADPGK (plásmido Addgene 20417, etiqueta FLAG N-terminal sobre una cadena principal de proteína, UniProtKB Q9BRR6-1) o pWZL-Neo-Myr-Flag-DEST (plásmido Addgene 15300), respectivamente (12). Se transfectaron vectores retrovirales por el procedimiento del fosfato de calcio en células productoras Phenix-Ampfo (Allele Biotechnology; San Diego, CA, EE.UU.). La transducción viral se realizó conforme al protocolo del fabricante utilizando polibrene e infección por rotación (2 h/2000 g). Las células se cultivaron sometidas a una presión de selección en RPMI1640 (+ L-glutamina), FCS al 10 % suplementado con 1 µg/ml de G418-sulfato (Roth; Karlsruhe, Alemania).

(U) PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR en tiempo real)

Se aisló ARN con reactivo TRIzol (Invitrogen) (células CLL y células B de control) o kit "RNeasy Mini" (QIAGEN; Hilden, Alemania) (todas las muestras que quedan) conforme a las instrucciones del fabricante. El ARN total (1 µg) se sometió a transcripción inversa con un "Reverse Transcription (RT)-PCR kit" (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, EE.UU.). Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el "Power SYBR Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems). La expresión de genes se analizó utilizando los sistemas PCR 7500 en tiempo real y Sequence Detection Software, Applied Biosystems, v.2.0.2. Los niveles de expresión de los genes se normalizaron utilizando expresión de β-actina como referencia endógena. Las proporciones de inducción (*X*) se calcularon utilizando la fórmula $X = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde Ct representa el umbral del ciclo y $\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen de referencia}}$. ΔΔCt es la diferencia entre los valores de ΔCt de las muestras "inducidas" y el valor ΔCt de la muestra "no inducida" correspondiente. Se calcularon las proporciones de inducción medias. Los niveles relativos de expresión basal de ADPGK en las muestras de células B de los pacientes CLL y donantes sanos se compararon utilizando el factor $Y = 2^{(Ct\ \text{gen de interés} - Ct\ GAPDH)}$ x 1000 (*1*). Para corregir por la variación inter-experimental los valores obtenidos de dos experimentos separados (dos placas separadas de 96 pocillos con 5 muestras de CLL triplicadas y 4 o 5 muestras de donantes sanos cada una) se sometieron a transformación z. Se utilizaron los cebadores siguientes para el análisis de la expresión génica: β-actina, sentido 5-ACCGTGAGAAGATGACCCACA-3', antisentido 5'-TCACCGCAGTCCCATGACGAT-3'; IL-2, sentido 5'-CAACTGGAGCATTTACTGCTG-3', antisentido 5'-TCAGTTCTGTGGCCTTCTTGG-3'; IL-8, sentido 5'-GAATGGGTTTGCTAGAATGTGATA-3', antisentido 5'-CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC-3', ADPGK, sentido 5'-TCATTGCAGGAAGTGGATGA-3', antisentido 5'-GCATGGGGAGCTTTTAACTG-3', IκBα, sentido 5'-GTCAAGGAGCTGCAGGAGAT-3', antisentido 5'-GATGGCCAAGTGCAGGAA-3', GPD2, sentido 5'-ACCCTGGCTGGAGGAACT-3', antisentido, 5'-CCCTTTCACTGCCTTTTGAA-3' y cebadores IL-4 como se ha publicado en otro lugar (1).

(V) Transfección y silenciación de ARNip

Los oligonucleótidos de ARNip utilizados para transfección fueron como sigue: control no-silenciador ("AllStars" no-silenciador, ARNip validado, QIAGEN), específico para ADPGK humana (Hs_ADPGK_5-8 FlexiTube ARNip,

QIAGEN) o GPD2 humana (Hs_GPD2_1, 4-6 FlexiTube ARNip, QIAGEN). Células T Jurkat o células T humanas "en reposo" se transfectaron por nucleofección ("kit Cell Line Nucleofector® V" o "kit T Cell Nulcleofector®", Lonza) realizada con 800 nM de oligonucleótidos ARNip conforme a las instrucciones del fabricante.

(W) Electroforesis en gel de poliacrilamida azul nativo (BN-PAGE) y WB

El análisis BN-PAGE de las fracciones enriquecidas en mitocondrias se realizó conforme a Haeger *et al*. (13) con modificaciones. Los complejos proteínicos de la membrana mitocondrial se solubilizaron en presencia de ácido 6-aminocaproico 1,5 M, Bis-Tris 50 mM y digitonina (6 g/g proteína) a 4 ºC durante 30 min. Subsiguientemente, se centrifugaron las muestras a 11.000 x g y 4 ºC durante 30 min. El sobrenadante se suplementó con tampón de muestra (ácido 6-aminocaproico 1,5 M, glicerol al 50 %, Azul Coomasie G250 al 1 % (p/v)) y se aplicó inmediatamente sobre un gel BN (3-13 %). El gel se corrió durante 16 h a una corriente continua de 35 V. Las proteínas se transfirieron durante 2 horas con una corriente limitada a 0,8 mA/cm^2 de membrana. El complejo III purificado de corazón de bovino (complejo BC1) fue un obsequio amable del Prof. Ulrich Brand.

Ejemplo 2

La puesta en marcha de TCR induce un cambio metabólico semejante al efecto Warburg en las células T preactivadas

Una reducción de la respiración mitocondrial y un aumento en la glucolisis son fundamentales para el efecto Warburg (11-14). Se aplicó un electrodo de oxígeno para medir los cambios inducidos por activación en la respiración mitocondrial de células T humanas intactas. En línea con el fenotipo Warburg, el tratamiento con anticuerpo anti-CD3 agonista o PMA dio como resultado una inhibición significativa del consumo de oxígeno mitocondrial (Figura 1A y Figura 7A), mientras que la absorción celular de glucosa marcada radiactivamente aumentaba con rapidez después de la estimulación (Figura 1B). El aumento consecutivo en los niveles de ATP intracelulares (Figura 1C) ponía de manifiesto que a pesar de la normoxia, la puesta en marcha del TCR de las células T periféricas humanas expandidas *in vitro* conducía a un cambio rápido hacia un fenotipo aún más glucolítico.

Para verificar una relación causal entre los cambios metabólicos observados y la producción de ROS mitocondrial incrementada, se puso a prueba la influencia de 2-desoxi-glucosa (DOG) y 3-bromopiruvato (PrByr), bloqueantes del metabolismo de la glucosa, sobre la generación de ROS inducida por activación. Después de pre-incubación breve (30 min) con DOG-piruvato, las células T humanas expandidas y las células T Jurkat generaban cantidades menores de ROS inducido por activación en comparación con las células pre-incubadas con concentraciones equimolares de glucosa (Glc)/piruvato (Figura 1D). El tratamiento con el inhibidor más potente, BrPyr, dio como resultado inhibición completa de la generación de ROS mitocondrial inducida por TCR y la expresión de genes IL-2, IL-4 e IκBα dependiente de NF-κB e inducida por activación (Figura 1E y F, Figura 7C y D). Además, ambos agentes reducían el ruido de fondo por oxidación intracelular (Figura 7B). Así, la generación de ROS mitocondrial inducida por activación de las células T está asociada con un cambio metabólico rápido hacia la glucolisis, definido comúnmente como efecto Warburg.

Ejemplo 3

La generación de la señal oxidativa va acompañada por cambios bioenergéticos y ultraestructurales importantes en las mitocondrias

La PKCθ puesta en marcha por TCR induce generación de señales oxidativas por el complejo respiratorio mitocondrial I (*3*). Para comprender mejor la relación entre el cambio metabólico Warburg inducido por activación y el mecanismo de la liberación de ROS mitocondrial se investigó el estatus bioenergético de los complejos de la cadena respiratoria. A este fin, se aplicaron células T humanas expandidas *in vitro* congeladas bruscamente y permeabilizadas con digitonina. Como se muestra en la Figura 1G (panel superior) la puesta en marcha de TCR daba como resultado una disminución importante de las actividades enzimáticas de los complejos I y II, mientras que la actividad del complejo III se incrementaba. Pudo observarse un patrón similar en células tratadas con PMA (Figura 1G, panel inferior). Los datos muestran que estos fenómenos son independientes de la captación del Ca^{2+} mitocondrial puesta en marcha por TCR. Además, los mismos sugieren que está implicada una ruta dependiente de DAG/PKCθ. En línea con esta hipótesis, el pretratamiento de las células T con bis-indolil-maleimidato I (BIM), un inhibidor de la generación de ROS inducida por PKC y TCR, bloqueaba significativamente los cambios observados (Figura 1H e I).

Adicionalmente, el patrón diferencial observado de actividades enzimáticas no se correspondía con los cambios en el contenido de proteínas de los complejos respectivos (Figura 8A) y la migración en geles (BN)-PAGE Azul Nativo (Figura 8B). De forma interesante, la ultraestructura de las mitocondrias cambiaba después de puesta en marcha por TCR o PMA (Figura 2). El desordenamiento y la distorsión de los cristales eran particularmente pronunciados en las mitocondrias de las células activadas por TCR (Figura 2C), mientras que el tratamiento con PMA conducía a diversos grados de alteraciones (Figura 2B). No pudo detectarse ruptura alguna de las membranas mitocondriales exteriores e interiores. Además, dado que estos cambios se observaban rápidamente (1 hora) y eran dependientes del fenotipo de activación de las células (*v.g.*, aumento en el nivel de ATP, regulación ascendente del transporte de

glucosa y relajación de la cromatina), su origen apoptótico estaba excluido. Las alteraciones observadas se asemejaban estrechamente a las típicas para células de tumores altamente glucolíticos y se había informado previamente que ocurren como respuesta adaptativa a la hipoxia (*24*) o a la adaptación metabólica mitocondrial transitoria a la fase IV de la respiración (contenido de ADP bajo limitante de la velocidad, producción alta de ROS) (*25*). Así, las micrografías electrónicas de las mitocondrias indican una actividad respiratoria baja, que es paralela al fenotipo glucolítico intensificado de las células T activadas.

Para comprender mejor estos fenómenos, se analizaron las velocidades de flujo electrónico del complejo I/II al complejo III utilizando células permeabilizadas o mitocondrias aisladas (Figura 1J). En el primer caso, la activación de las células T conducía a una tasa de flujo electrónico disminuida entre el complejo I o II y el complejo III, en línea con los resultados presentados en la Figura 1G. El aislamiento de las mitocondrias anulaba estos efectos y daba como resultado un flujo electrónico intensificado hacia el complejo III después de activación de las células T (Figura 1J). Estos resultados sugieren un carácter transitorio de la disminución inducida por activación de las actividades de los complejos I/II debido a la implicación de un agente lábil. El hecho de que la actividad del complejo III intensificada no se deteriore por el procedimiento de aislamiento de las mitocondrias implica una modificación estable del complejo III.

Los cambios bioenergéticos observados podrían atribuirse al estado hiper-reducido de la ubiquinona, el transportador de electrones entre los complejos I/II y el complejo III (*26,27*). La acumulación de ubiquinona reducida (ubiquinol) es probable que disminuya las actividades de los complejos I y II en las células intactas por bloqueo del flujo electrónico. Este efecto se perdería después del aislamiento de las mitocondrias debido a la oxidación del ubiquinol (Figura 1J). Además, la transferencia inversa de electrones (RET), un mecanismo importante de la generación de ROS mitocondrial por medio del complejo I, esta mediada por una reserva muy reducida de ubiquinona (*26, 27*). La acumulación de ubiquinol es crucial también para la liberación de ROS mitocondrial inducida por hiperglucemia/hipoxia (*18-21*).

Para conseguir una mejor comprensión en cuando al estado redox de la ubiquinona después de activación de las células T, se puso a prueba la influencia de un panel de inhibidores de la cadena respiratoria sobre la generación de la señal oxidativa. Conforme a la bibliografía, la inhibición observada por los bloqueadores del complejo I, rotenona y metformina (*1, 3*), así como la inhibición moderada por el bloqueador del complejo II, TTFA, sugieren un mecanismo basado en RET de la liberación de ROS mitocondrial inducida por activación (Figura 9A) (*26*). La señal de ROS no se bloqueaba por NaN_3, un inhibidor del complejo IV y oligomicina, un inhibidor de la ATP-sintasa (Figura 9A). Llamativamente, la generación de ROS mitocondrial inducida por activación de las células T se incrementó por la antimicina, un inhibidor del complejo III que se une al sitio matriz, pero no por mixotiazol, un inhibidor que interacciona con la parte del espacio intermembranal del complejo III (Figura 9A). Estos resultados sugieren una importancia de la ciclación de ubiquinona intra-complejo III como se comunicó para la liberación de ROS mitocondrial inducida por hipoxia (*20*). Es digno de mención que, en las células T humanas, la actividad del complejo IV endógeno detectada es aproximadamente 8 veces menor que la actividad del complejo III (Figura 9B) formando un cuello de botella para la regeneración de la ubiquinona. Así, se investigaron los cambios del estatus redox de la ubiquinona después de activación de las células T. El análisis basado en HPLC de los extractos de células T activadas congeladas bruscamente reveló un aumento significativo en el contenido de ubiquinol sobre ubiquinona, que alcanzaba 30 % después de la puesta en marcha mediada por TCR y 57 % después de la puesta en marcha mediada por PMA (Figura 1K). Los datos obtenidos demuestran un estatus hiper-reducido de la reserva de ubiquinona después de la activación de las células T y sugieren fuertemente un papel causal de RET en la generación de la señal oxidativa.

Ejemplo 4

El flujo glucolítico desviado conduce a una liberación de ROS mitocondrial mediada por GPD2

Se sabe que la función de ROS mitocondrial inducida por ubiquinona hiper-reducida está asociada con un metabolismo incrementado de la glucosa en las células hiperglucémicas o hipóxicas (*18-21*). Para someter a ensayo el flujo metabólico glucolítico inmediatamente después de la puesta en marcha por TCR, se midieron las actividades de todas las enzimas glucolíticas importantes (Figura 3A y B). De forma interesante, la única actividad enzimática que cambiaba significativamente después de la estimulación de TCR era la reacción inversa de la enolasa (ENO) (Figura 3B). Dado que el ensayo utilizado detecta únicamente una hidrólisis de ATP específica de fosfoenolpiruvato (PEP) por monitorización de la reducción de piruvato en presencia de NADH, se utilizaron inhibidores para caracterizar adicionalmente la actividad enzimática detectada. NaF, un inhibidor de ENO, bloqueaba la actividad de ENO inversa detectada. De forma interesante $NaVO_3$, un inhibidor de la fosforilación de histidina (*28*), reducía la actividad pero no la bloqueaba. En primer lugar, anulaba su aumento inducido por TCR (datos no presentados). Es notable que la activación de la fosfoglicerato-mutasa (PGM) mediada por fosforilación de la histidina dependiente de PEP, se ha descrito recientemente en células de proliferación rápida normales y cancerosas, que expresan la isoforma M2 de piruvato-cinasa (PK) (PK-M2) (*29,30*). Dado que PK-M2 se expresa fuertemente en las células T activadas (*31*), el aumento detectado en la actividad semejante a ENO inversa podría estar mediado por la recientemente descrita histidina-cinasa desconocida que utiliza PEP (*29*). Esto está respaldado adicionalmente por el descubrimiento de que la actividad semejante a ENO observada era solo parcialmente dependiente de ATP y su aumento inducido por activación era independiente de ATP.

Se sugirió que la fosforilación de la histidina PGM invierte el flujo por la ruta glucolítica inferior iniciada por GAPDH (*29*) y así, podría redirigirse al flujo alternativo por la ruta de glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GPD 1/2) citosólica. De hecho, la puesta en marcha de TCR aumentaba claramente el metabolismo de fructosa-6-fosfato en la dirección de GPD1, mientras que la renovación de fructosa-6-fosfato mediada por GAPDH disminuía ligeramente (Figura 3C). Adicionalmente, la producción de lactato, el producto final de la ruta de GAPDH, estaba disminuida a pesar de la absorción incrementada de glucosa (Figura 3D y 1B). Por ello, los autores de la invención investigaron el estatus de actividad de GPD2, la isoforma mitocondrial de GPD. La actividad de GPD2 estaba regulada al alza de modo significativo después de la puesta en marcha de TCR (Figura 3E). La inhibición de PKC por BIM bloqueaba significativamente la activación de GPD2 inducida por TCR (Figura 3E). Además, en línea con el informe anterior (*32*), el tratamiento con PMA también regulaba al alza moderadamente la actividad de GPD2 en las fracciones de membrana enriquecidas en mitocondrias de las células T humanas preactivadas (Figura 3E). Dado que GPD2 es una enzima de unión de Ca^{2+}, el aumento inducido por puesta en marcha de anti-CD3 en la concentración intracelular de Ca^{2+} converge con la activación dependiente de PMA consignada (DAG) (*32, 33*).

GPD2 transfiere electrones a la cadena respiratoria por reducción de la ubiquinona. Por tanto, la regulación al alza de su actividad enzimática podría dar como resultado una liberación de ROS mediada por RET debido a ubiquinona hiper-reducida (*26, 27, 34-36*). Para investigar esta posibilidad, se analizaron los efectos de la regulación a la baja de la expresión de GPD2 sobre la generación de la señal oxidativa dependiente de la activación, la puesta en marcha de NF-κB y la expresión génica. La silenciación mediada por ARNip de la expresión de GPD2 daba como resultado una generación reducida de la señal oxidativa (Figura 3F y G). Correspondientemente, la disminución en la abundancia de GPD2 inhibía la activación inducida por PMA o PMA/Iono de un informador de luciferasa NF-κB así como la expresión de IL-2 en las células T Jurkat (Figura 3H e I).

Además, WB basado en BN-PAGE sugería fuertemente una asociación de GPD2 con el complejo respiratorio III (Figura 8B). La interacción directa de GPD2 con super-complejos de la cadena respiratoria puede explicar parcialmente el aumento observado en la actividad del complejo III después de la puesta en marcha de TCR o el tratamiento con PMA (Figura 1G, J). En conclusión, la activación de las células T da como resultado una desviación del flujo glucolítico hacia GPD2, activación de GPD2, hiper-reducción de ubiquinona y liberación de ROS mediada por RET.

Ejemplo 5

La actividad enzimática de ADPGK inducida por activación de las células T regula al alza el flujo glucolítico

Se cree que la hiper-reducción inducida por glucosa de la ubiquinona y la liberación de ROS mitocondrial dependen de un flujo glucolítico regulado al alza (*18, 19*). La glucolisis es una secuencia estrechamente regulada de reacciones con puntos de regulación principales en HK, PFK, GAPDH y PK (Figura 3A). Los resultados de los presentes experimentos no mostraron ningún cambio de cualquiera de estas actividades enzimáticas (Figura 3B). La asociación de HK con VDAC mitocondrial que daba como resultado una pérdida de la inhibición del producto HK actúa como otro mecanismo que regula al alza el flujo de glucosa (*37*). El análisis WB de las fracciones de membrana enriquecidas en mitocondrias de células T humanas expandidas revelaba niveles altos de HK1 y bajos de HK2 (Figura 10A). Sin embargo, la puesta en marcha de TCR no daba como resultado un aumento significativo de la asociación HK1/2 con las mitocondrias o regulación al alza de la actividad de HK asociada a las mitocondrias (Figura 10A y B). A continuación, se investigó la actividad de HK asociada a las mitocondrias acoplada a la generación de ATP mediada por la respiración (Figura 4A). La puesta en marcha de TCR inducía claramente una actividad semejante a HK en presencia de los sustratos respiratorios, ADP y succinato (Figura 4B). Esta actividad era bloqueada solo moderadamente por el inhibidor de adenilato-cinasa (AK) diadenosina-pentafosfato (Ap5A, 5 μM, hasta el 40 % de inhibición), mientras que Ap5 inhibía fuertemente la AK mitocondrial (5 μM, 80-90 % de inhibición). De la forma más importante, el aumento inducido por activación en la actividad semejante a HK no se veía afectado por Ap5A. Sorprendentemente, esta actividad enzimática incrementada era independiente de la adición de succinato, pero claramente dependiente de la presencia de ADP. Además, la insensibilidad al inhibidor de la cadena respiratoria NaCN y el desacoplador CCCP demostraba su independencia real del ATP producido por las mitocondrias (Figura 4B). Intrigados por estos resultados, los autores de la invención investigaron la bibliografía y pudo identificarse una proteína capaz de fosforilar glucosa por utilización de ADP - la glucocinasa dependiente de ADP (ADPGK) (*38*). Aunque típica de *Archaea* termófilas, ADPGK existe en los mamíferos y se expresa fuertemente en las células hematopoyéticas humanas, incluyendo células T (Figura 5E) (*31*, *39*). Adicionalmente, una ausencia comunicada de inhibición por glucosa-6-fosfato hace de ADPGK un activador teórico particularmente bueno del flujo glucolítico (*38*).

De hecho, la actividad incrementada de ADPGK ocurría en fracciones de membrana enriquecidas en mitocondrias (fracciones "ricas en g"), aisladas de células T humanas tratadas con anti-CD3 (Figura 4C). Una regulación al alza comparable de la actividad enzimática pudo conseguirse por tratamiento con PMA de células T humanas o células Jurkat (Figura 4C), indicando una independencia de la señalización de TCR mediada por Ca^{2+}. Además, el aumento inducido por activación de las células T de la actividad enzimática de tipo ADPGK se anuló completamente por el inhibidor BIM de PKC (Figura 4C). No pudo demostrarse regulación al alza alguna del contenido de ADPGK después de estimulación de TCR (Figura 4D). De forma interesante, la secuencia ADPGK contiene un péptido señal supuesto para transporte al retículo endoplásmico (ER) (Figura 4E y Figura 14). Dado que las mitocondrias de las células T

son menores que las de otros tejidos (v.g., el hígado), se utilizó una etapa de centrifugación a 11.000 x g para aumentar el rendimiento de mitocondrias en las fracciones enriquecidas en mitocondrias (fracciones mitocondriales "ricas en g"). Tales fracciones contienen también ER como se ve en las micrografías electrónicas y en WB (calreticulina - un marcador de ER) (Figura 4D). Para adquirir una idea más clara en cuanto a la localización subcelular de ADPGK, se prepararon fracciones "enriquecidas en mitocondrias" y "enriquecidas en ER" (véase el Ejemplo 1), que demostraban claramente una asociación con ER de la proteína ADPGK en las células T y las células T Jurkat (Figura 11).

La actividad de ADPGK en las fracciones "enriquecidas en ER" se caracterizó con respecto a sus parámetros cinéticos. La enzima revelaba un pH óptimo llamativo de 6,0 y un Km para glucosa de 0,086 mM (pH 6,0, 37 ºC). Los valores obtenidos se asemejan a los consignados para ADPGK recombinante de ratón (*38*) y están comprendidos en un intervalo similar a los denominados HKs 1-3 de Km bajo. Adicionalmente, ADPGK era inhibida por el sustrato a concentraciones de glucosa mayores que 5 mM.

A continuación, se generaron células T Jurkat que expresaban de manera estable la proteína ADPGK con una etiqueta FLAG N-terminal (células Jurkat F-ADPGK; Figura 4E). Como para la proteína ADPGK de tipo salvaje (WT-ADPGK), se encontró la proteína FLAG-ADPGK (F-ADPGK) en las fracciones enriquecidas en ER y enriquecidas en mitocondrias pero no en las fracciones citosólicas (Figura 11A y Figura 4D). Las células que expresaban F-ADPGK mostraban una actividad basal mayor así como una actividad de tipo ADPGK inducida por PMA intensificada en comparación con las células de control (Figura 5E, panel inferior). La proteína FLAG-ADPGK inmunoprecipitada demostraba actividad de ADPGK, que no pudo medirse en los precipitados de los lisados de control (Figura 4F, panel inferior). Los resultados se confirmaron por WB (Figura 4F, panel superior). Así, por primera vez, se demostró una ADPGK humana plenamente activa. En conclusión, se encontró que la puesta en marcha de TCR regula al alza el flujo glucolítico por activación de ADPGK de una manera dependiente de PMA (DAG) y PKC.

Ejemplo 6

ADPGK media la generación de la señal oxidativa

A continuación, se sometió a ensayó la influencia de la disminución de la expresión de ADPGK sobre la generación de ROS inducida por activación. La expresión reducida de ADPGK (Figura 5A) inhibía la producción de ROS desencadenada por PMA en las células T Jurkat (Figura 5B). Concomitantemente, la silenciación de ADPGK daba como resultado la inhibición de la activación de NF-κB puesta en marcha por PMA- o PMA/Iono (Figura 5C) y la expresión dependiente de NF-κB de los genes IL-2, IκBα e IL-8 (Figura 5D y Figura 12). Las células T "en reposo", no expandidas, generan también la señal oxidativa de las mitocondrias (*1*). Análogamente, la activación de las células T "en reposo" conducía a un aumento en las actividades enzimáticas de GPD2 y ADPGK (Figura 5F). La inducción baja de las actividades enzimáticas corresponde a un grado menor de generación de ROS en las células T "en reposo" en comparación con las células T "preactivadas" expandidas *in vitro* (*1*). No obstante, la silenciación mediada por ARNip de la expresión de ADPGK en las células T humanas periféricas "en reposo" daba también como resultado disminución de la señal oxidativa inducida por activación (Figura 5G).

Adicionalmente, la actividad de ADPGK intensificada inducida por PMA en células Jurkat F-ADPGK (Figura 4E) daba como resultado producción incrementada de ROS seguida por inducción potenciada de los genes dependientes de NF-κB (IL-2, IL-8 e IκBα) (Figura 6A, C). Se obtuvieron resultados similares para células T Jurkat que sobreexpresaban transitoriamente WT-ADPGK (Figura 6B y C). En estas células la activación daba como resultado la puesta en marcha de NF-κB y la inducción potenciada de genes dependientes de NF-κB en comparación con las células de control transfectadas con vector vacío (EV) (Figura 6B y C). De forma interesante, debido a un mecanismo desconocido hasta ahora, la sobreexpresión de ADPGK tiende a reducir los niveles basales de transcrito de genes dependientes de NF-κB (Figura 13). Considerados en su conjunto, los presentes datos demuestran un papel regulador positivo de ADPGK en el proceso de activación de las células T.

Ejemplo 7

La actividad de ADPGK aumenta a temperatura pro-inflamatoria más alta

La actividad de ADPGK se describió por primera vez para *Archaea* termófilas (*38-40*). Notablemente, una predicción de estructura secundaria para ADPGK de mamífero revela una semejanza estructural alta con estructuras secundarias conocidas de ADPGK arqueal termoestable a pesar de una baja homología de secuencia (Figura 14) (*40, 41*). Por lo tanto, se puso a prueba la dependencia de temperatura de la actividad de ADPGK en las células T humanas. Como se muestra en la Figura 6D, la velocidad de la reacción catalizada por ADPGK aumentaba exponencialmente dentro del intervalo fisiológico de temperatura y era 3,5 veces mayor a 42 ºC que a 37 ºC. En contraste, el aumento de la actividad de HK estimulado por temperatura se mantenía lineal. Además, a 42 ºC la reacción mediada por ADPGK alcanza una velocidad comparable a la de HK. Estos datos sugieren la estabilidad térmica de la ADPGK humana e intensifican su posible papel en la respuesta inflamatoria y la puesta en marcha de NF-κB. Así, la temperatura incrementada en los sitios inflamatorios podría facilitar la activación de las células T y la expresión dependiente de NF-κB de las citocinas proinflamatorias.

Ejemplo 8

ADPGK y GPD2 se expresan fuertemente en las células de la leucemia linfocítica crónica (CLL) maligna

Muchos cánceres dependen estrictamente de la activación constitutiva de la ruta de NF-κB (*16*). Niveles intrínsecos altos de ROS o del fenotipo Warburg son característicos de muchas enfermedades malignas (*11, 14, 42*). Por esta razón, se investigó la expresión de ADPGK en células cancerosas. Los cánceres originados por las células T son raros en humanos en comparación con las enfermedades malignas de las células B. Particularmente, CLL constituye una de las leucemias más comunes con pronóstico fatal (*43*). Además, las células CLL están dotadas de actividad incrementada de NF-κB, glucolisis y niveles intrínsecos altos de ROS (*15, 17, 43-45*). Por ello, se compararon los niveles de expresión de ADPGK y GPD2 en células CLL malignas y células B normales (Tabla 1).

Tabla 1

Información adicional acerca de los pacientes analizados en la Figura 8					
Número	**Edad**	**Sexo**	**Fase**	**Terapia**	**Datos adicionales**
028/09	52	M	Binet A	ninguna	FISH - sin cambios
032/09	46	W	Binet A	ninguna	del 13q14
038/09	70	W	Binet B	ninguna	Trisomía 12
041/09	43	M	Binet B	ninguna	FISH - sin cambios
047/09	86	M	Binet A	ninguna	del 13q14
063/09	70	W	Binet A	ninguna	n.d.
090/09	34	M	n.d.	n.d.	n.d.
119/09	51	M	Binet A	ninguna	Trisomía 12q13
120/09	54	M	Binet A	ninguna	FISH - sin cambios
164/09	69	W	Binet A	Leukeran, Alemtuzumab	del17p13, del13q14 y del6q21
n.d. – no determinada					

Como se muestra en la Figura 6E, los niveles de ARNm de ADPGK y GPD2 están incrementados significativamente en las células CLL. Esto sugiere un papel universal para el mecanismo descrito de la producción de ROS mediada por efecto Warburg/activación de NF-κB e indica su posible importancia para la tumorigénesis.

Conclusión

La activación de las células T está asociada con un cambio metabólico desde respiración mitocondrial a glucolisis aerobia (*12*). Este denominado "fenotipo Warburg" es un rasgo característico de las células normales de proliferación rápida, pero también de células malignas (*11, 14*). Un trabajo anterior ha demostrado que las células T proliferantes se caracterizan por una producción de ROS mitocondrial puesta en marcha por TCR alta (*1, 3*). Esta señal oxidativa generada por las mitocondrias contribuye a la activación de NF-κB y por tanto, estimula la proliferación y una respuesta inflamatoria. De forma interesante, las células cancerosas exhiben a menudo un fenotipo glucolítico aerobio y están dotadas de producción de ROS intrínseca elevada y de activación constitutiva de la ruta de NF-κB (*14, 16, 18, 42*). Además, se sabe que la regulación al alza de la glucolisis en condiciones hiperglucémicas o hipóxicas aumenta la generación de ROS mitocondrial (*18, 19, 21*), mientras que la activación de las células T depende de la captación de glucosa (*9, 10*). Así, el análisis metabólico de la producción de ROS mitocondrial inducida por activación de las células T puede proporcionar un enlace molecular que conecte estos diferentes fenómenos al nivel de señalización.

En los experimentos arriba descritos se demostró que la producción de ROS mitocondrial inducida por activación de las células T y la expresión génica dependen de la activación de ADPGK, una proteína arqueobacteriana con función desconocida hasta ahora en los eucariotas. La activación de ADPGK va acompañada por una captación rápida de glucosa, regulación a la baja del consumo de oxígeno mitocondrial y desviación de glucolisis hacia la lanzadera GPD, es decir el efecto Warburg. A su vez, la activación de GPD2 asociada a la cadena respiratoria conduce a una hiperreducción de ubiquinona y liberación de ROS mediada por RET a partir del complejo I (Figura 6F). Esto ocurre paralelamente a cambios importantes de la bioenergética y ultraestructura mitocondriales. Es digno de mención que todos los eventos ocurren en el transcurso de 1 hora después de la activación del TCR. La regulación a la baja de la

abundancia de ADPGK o GPD2 inhibe la generación de ROS inducida por activación y la expresión génica dependiente de NF-κB, mientras que la sobreexpresión de ADPGK da como resultado su regulación al alza.

Sorprendentemente, las células CLL, dotadas de un nivel de ROS intrínseco y de actividad constitutiva de NF-κB altos (*15, 17*), exhiben una expresión incrementada de ADPGK y GPD2 (Figura 6E). Adicionalmente, es sabido que la respiración mediada por glicerol-3-fosfato y la activación de GPD2 conducen a producción de ROS (también por la vía RET) (*26, 27, 34*). Así pues, el descubrimiento de un papel crucial para GPD2 en la generación de ROS desencadenada por TCR respalda un enlace específico del cáncer entre la actividad/expresión incrementada de GPD2 y los niveles altos de ROS (*35,36*). Además, arroja una nueva luz acerca del fenotipo inflamatorio de las células T en los pacientes diabéticos y obesos (*9, 46*). Un redireccionamiento del flujo glucolítico a favor de la síntesis de un precursor metabólico por la forma dímera, de afinidad baja de PK-M2 es un nuevo foco en el metabolismo del cáncer (*47*). Un informe reciente describe la activación de PGM mediada por PEP en células de proliferación rápida y que expresan PK-M2 que da como resultado una ruta glucolítica alternativa (*29*). Paradójicamente, la glucolisis redireccionada omite la segunda etapa glucolítica de generación de ATP, un inconveniente energético que puede ser contrarrestado por fosforilación de glucosa mediada por ADP. Así pues, la interacción descrita de las rutas de señalización y metabólica puede tener un significado profundo para la tumorigénesis.

En general, la activación de las células inmunes está conectada con un escenario inflamatorio. El descubrimiento de la actividad incrementada de ADPGK a una temperatura pro-inflamatoria subraya la importancia de esta nueva proteína en la respuesta mediada por NF-κB. Además, la semejanza estricta entre la estructura secundaria predicha de ADPGK humano y las estructuras cristalinas de las proteínas ADPGK de *Archaea* termófilas (Figura 14) es indicativa de la estabilidad térmica de ADPGK (*40, 41*). Una homología de secuencia relativamente baja podría ilustrar la evolución convergente de una ADPGK humana.

La localización celular de ADPGK presenta un problema interesante no resuelto hasta ahora. Se ha sugerido con anterioridad que la fosforilación de la glucosa mediada por ADP constituye un mecanismo para preservar la reserva de ATP intracelular en condiciones isquémicas o hipóxicas (*38*). La localización de ER, sin embargo, indica un papel más complejo para esta proteína. ADPGK podría participar en rutas metabólicas mediadas por hexosa-6-fosfato-deshidrogenasa (H6PD) (*48*) o glucosa-6-fosfato-fosfatasa (G6PC3) (*49*), dos enzimas gluconeogénicas que se expresan también fuertemente en tejidos extrahepáticos. Se ha demostrado recientemente que el reciclado de glucosa-6-fosfato/glucosa por G6PC3 es crucial para la activación de los neutrófilos humanos (*49*). Alternativamente, la glucosa-6-fosfato generada por ADPGK podría servir como fuente de energía para la generación de NADPH derivada de H6PD e influir así en el balance ER-redox. Además, en el tejido adiposo, hepático y muscular, la NADPH generada por H6PD contribuye directamente a la activación pre-receptorial mediada por 11β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo 1 (HSD11B1) de los glucocorticoides (*48*). Así, las rutas ADPGK/H6PD/(HSD11B1) o ADPGK/G6PC3 podrían participar en la regulación de la activación y diferenciación de las células T.

En conclusión, se proporcionan pruebas experimentales de un papel inesperado de ADPGK como un regulador novedoso de la activación de las células T. Adicionalmente, basándose en el mecanismo identificado de la liberación de ROS mitocondrial inducida por el flujo glucolítico para las células T, se propone una hipótesis que conecta el fenotipo Warburg con niveles de ROS mitocondriales incrementados y la señalización de NF-κB intensificada en células cancerosas de proliferación rápida.

Lista de referencias

1. M. M. Kaminski et al., J Immunol 184, 4827 (May 1, 2010).

2. W. Droge, Physiol Rev 82, 47 (Jan, 2002).

3. M. Kaminski, M. Kiessling, D. Suss, P. H. Krammer, K. Gulow, Mol Cell Biol 27, 3625 (May, 2007).

4. K. Gulow et al., J Immunol 174, 5249 (May 1, 2005).

5. J. S. Yi, B. C. Holbrook, R. D. Michalek, N. G. Laniewski, J. M. Grayson, J Immunol 177, 852 (Jul 15, 2006).

6. S. H. Jackson, S. Devadas, J. Kwon, L. A. Pinto, M. S. Williams, Nat Immunol 5, 818 (Aug, 2004).

7. M. Los et al., Embo J 14, 3731 (Aug 1, 1995).

8. J. Kwon et al., Sci Signal 3, ra59 (Aug 3, 2010).

9. F. B. Stentz, A. E. Kitabchi, Biochem Biophys Res Commun 335, 491 (Sep 23, 2005).

10. S. R. Jacobs et al., J Immunol 180, 4476 (Apr 1, 2008).

11. O. Warburg, Science 124, 269 (Aug 10, 1956).

12. T. Wang, C. Marquardt, J. Foker, Nature 261, 702 (Jun 24, 1976).

13. C. J. Fox, P. S. Hammerman, C. B. Thompson, Nat Rev Immunol 5, 844 (Nov, 2005).

14. M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson, Science 324, 1029 (May 22, 2009).

15. Y. Zhou, E. O. Hileman, W. Plunkett, M. J. Keating, P. Huang, Blood 101, 4098 (May 15, 2003).

16. S. I. Grivennikov, M. Karin, Curr Opin Genet Dev 20, 65 (Feb, 2010).

17. J. Tomic, B. Lichty, D. E. Spaner, Blood, (Jan 4, 2011).

18. K. E. Wellen, C. B. Thompson, Mol Cell 40, 323 (Oct 22, 2010).

19. M. Brownlee, Nature 414, 813 (Dec 13, 2001).

20. E. L. Bell et al., J Cell Biol 177, 1029 (Jun 18, 2007).

21. R. B. Hamanaka, N. S. Chandel, Curr Opin Cell Biol 21, 894 (Dec, 2009).

22. M. Bental, C. Deutsch, Magn Reson Med 29, 317 (Mar, 1993).

23. A. Miccheli et al., Biochimie 88, 437 (May, 2006).

24. G. Arismendi-Morillo, Biochim Biophys Acta, (Nov 9).

25. C. A. Mannella, Biochim Biophys Acta 1763, 542 (May-Jun, 2006).

26. A. J. Lambert, M. D. Brand, Methods Mol Biol 554, 165 (2009).

27. S. Miwa, J. St-Pierre, L. Partridge, M. D. Brand, Free Radic Biol Med 35, 938 (Oct 15, 2003).

28. J. Krivanek, L. Novakova, FEBS Lett 282, 32 (Apr 22, 1991).

29. M. G. Vander Heiden et al., Science 329, 1492 (Sep 17, 2010).

30. T. Hitosugi et al., Sci Signal 2, ra73 (2009).

31. T. Hruz et al., Adv Bioinformatics 2008, 420747 (2008).

32. K. Y. Tu et al., Biochem Biophys Res Commun 207, 183 (Feb 6, 1995).

33. R. M. Denton, Biochim Biophys Acta 1787, 1309 (Nov, 2009).

34. L. Tretter, K. Takacs, V. Hegedus, V. Adam-Vizi, J Neurochem 100, 650 (Feb, 2007).

35. S. K. Chowdhury, A. Gemin, G. Singh, Biochem Biophys Res Commun 333, 1139 (Aug 12, 2005).

36. S. K. Chowdhury, S. Raha, M. A. Tarnopolsky, G. Singh, Free Radic Res 41, 1116 (Oct, 2007).

37. J. E. Wilson, J Exp Biol 206, 2049 (Jun, 2003).

38. R. S. Ronimus, H. W. Morgan, Biochem Biophys Res Commun 315, 652 (Mar 12, 2004).

39. C. Wu et al., Genome Biol 10, R130 (2009).

40. V. Guixe, F. Merino, IUBMB Life 61, 753 (Jul, 2009).

41. H. Tsuge et al., Protein Sci 11, 2456 (Oct, 2002).

42. E. O. Hileman, J. Liu, M. Albitar, M. J. Keating, P. Huang, Cancer Chemother Pharmacol 53, 209 (Mar, 2004).

43. A. Gaiger, D. Heintel, U. Jager, Eur J Clin Invest 34 Suppl 2, 25 (Aug, 2004).

44. M. Lopez-Guerra, D. Colomer, Expert Opin Ther Targets 14, 275 (Mar).

45. D. Colomer, J. L. Vives-Corrons, A. Pujades, R. Bartrons, Cancer Res 47, 1859 (Apr 1, 1987).

46. F. B. Stentz, A. E. Kitabchi, Curr Drug Targets 4, 493 (Aug, 2003).

47. S. Mazurek, H. C. Drexler, J. Troppmair, E. Eigenbrodt, U. R. Rapp, Anticancer Res 27, 3963 (Nov-Dec, 2007).

48. G. Banhegyi, M. Csala, A. Benedetti, J Mol Endocrinol 42, 283 (Apr, 2009).

49. H. S. Jun et al., Blood 116, 2783 (Oct 14, 2011).

50. Pelicano et al., Oncogene, Vol. 25, No. 34, 4633-4646 (2006)

51. Scatena Roberto et al., Expert Opinion on Investigational Drugs, Vol. 17, No. 10, 1533-1545 (2008)

52. Maciver et al., J. of Leucocyte Biology, Vol. 84, No. 4, 949-957 (2008)

53. Krawczyk et al., Blood, Vol. 115, No. 23, pp. 4742-4749 (2010)

54. Chowdhury et al., BBRC, Vol. 333, No. 4, 1139-1145 (2005)

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD2) o (b) la expresión del gen codificante de GPD2 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un neoplasma, una enfermedad autoinmune o una enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), por inhibición de inducción de NF-κB, en el que dicho compuesto es

- un oligonucleótido antisentido o un ARNip que reduce o inhibe la expresión del gen que codifica GPD2,
- un anticuerpo dirigido contra GPD2 o un fragmento del mismo que tiene igual especificidad,
- una versión inactiva de GPD2, o
- un poli(ácido nucleico) que codifica una versión inactiva de GPD2.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el neoplasma a tratar exhibe (sobre)expresión de GPD2.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el neoplasma a tratar es leucemia linfocítica crónica (CLL) de células B o un tumor que exhibe niveles de NF-κB incrementados.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad autoinmune es reumatismo, lupus eritematoso, psoriasis, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, o diabetes.

5. Un procedimiento in vitro para identificar un compuesto capaz de regular a la baja la actividad biológica de GPD2 o la expresión del gen que codifica GPD2 para inhibir inducción de NF-κB, que comprende las etapas de:

(a) incubar un compuesto candidato con un sistema de prueba que comprende GPD2 o el gen que codifica GPD2; y

(b) someter a ensayo la actividad biológica de GPD2;

en el que una reducción de la actividad biológica de GPD2 es indicativa de la presencia de un compuesto candidato que tiene la propiedad deseada de inhibir inducción de NF-κB.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la reducción de la actividad biológica de GPD2 se determina por comparación con un sistema de prueba **caracterizado por** la ausencia de dicho compuesto de prueba.

Figura 1 A-C:

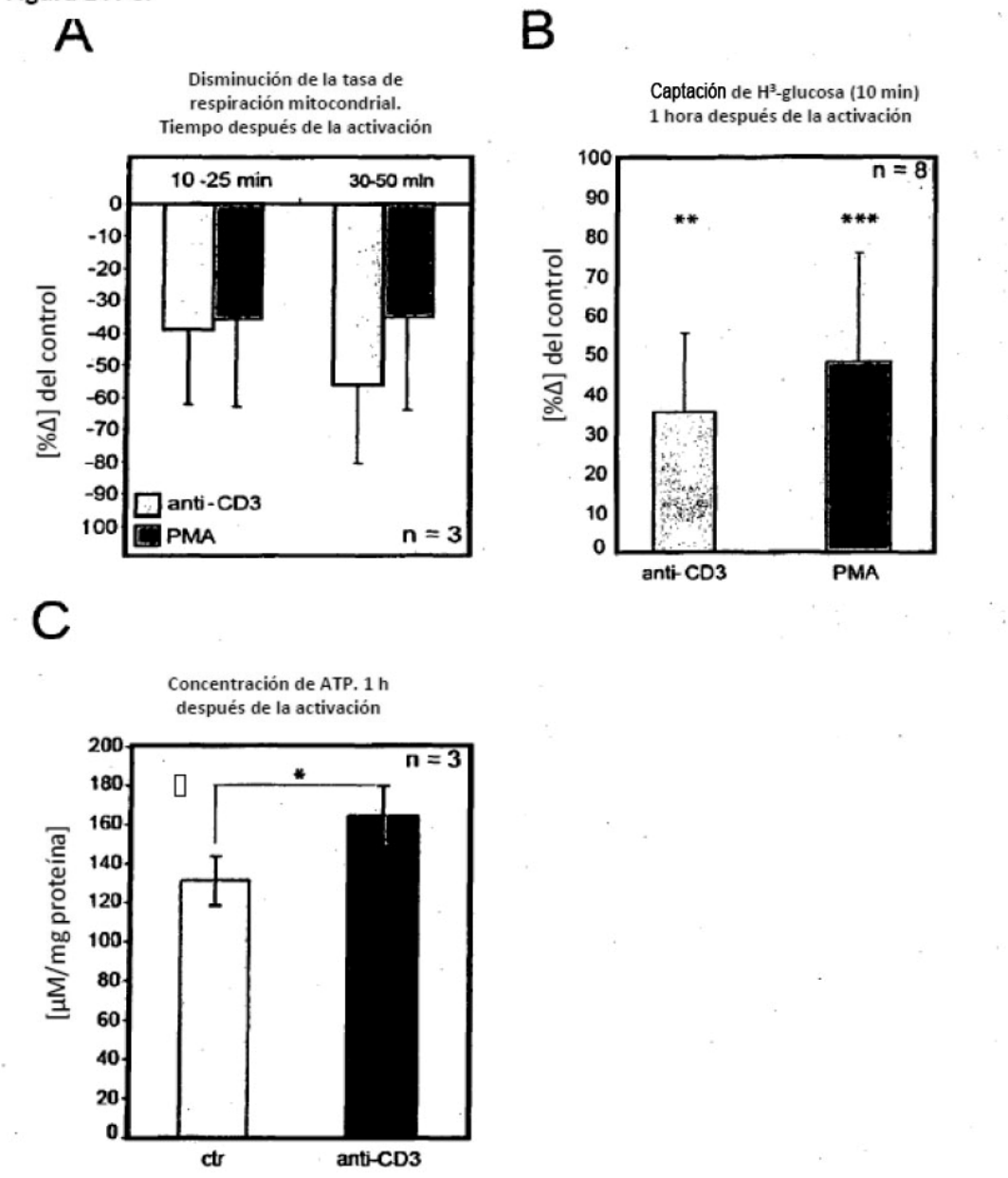

A
Disminución de la tasa de respiración mitocondrial. Tiempo después de la activación
10 -25 min
30-50 min
[%Δ] del control
anti-CD3
PMA
n = 3
B
Captación de H³-glucosa (10 min) 1 hora después de la activación
n = 8
**
***
[%Δ] del control
anti-CD3
PMA
C
Concentración de ATP. 1 h después de la activación
n = 3
*
[µM/mg proteína]
ctr
anti-CD3

Figura 1 D-E:

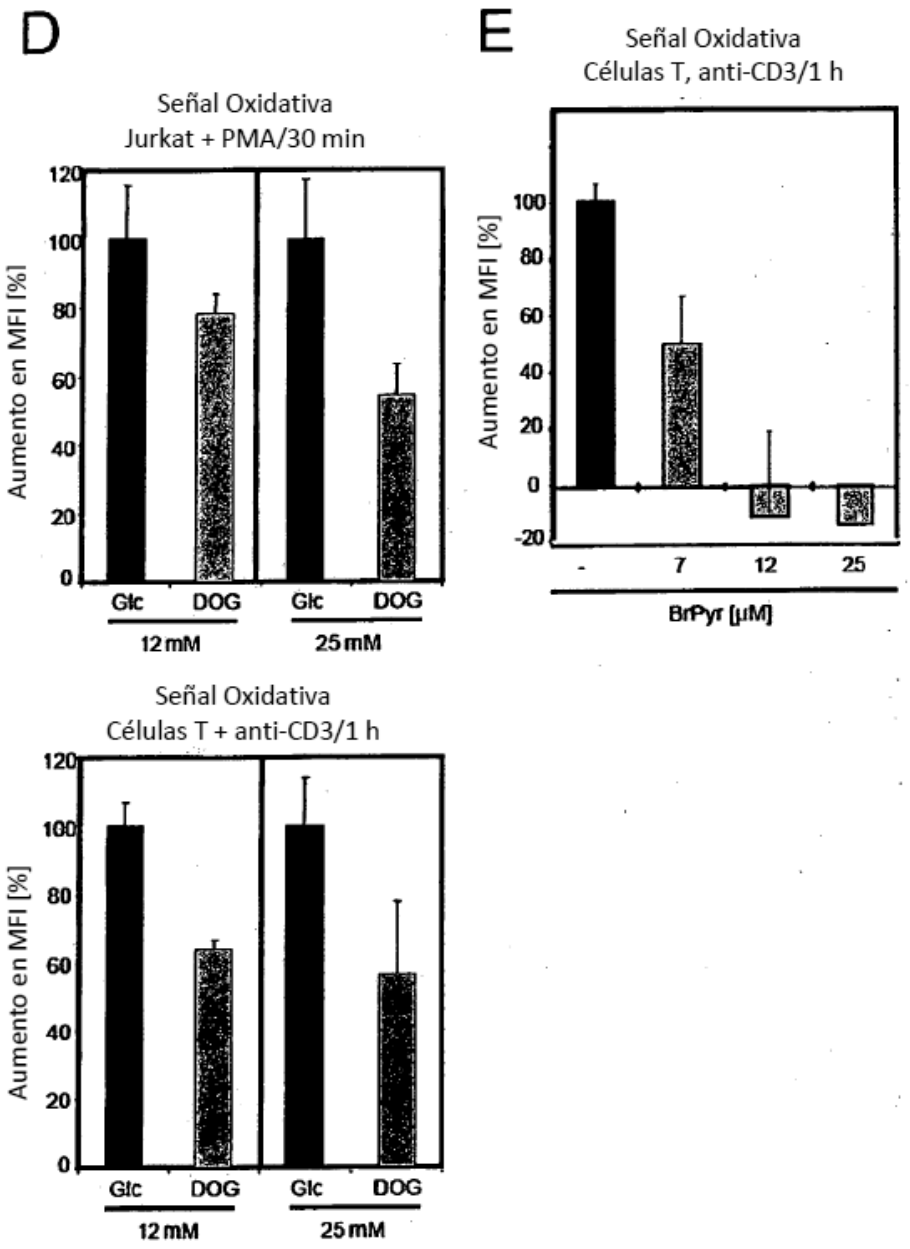

D
Señal Oxidativa
Jurkat + PMA/30 min
Aumento en MFI [%]
120
100
80
60
40
20
0
Glc
DOG
Glc
DOG
12 mM
25 mM
Señal Oxidativa
Células T + anti-CD3/1 h
Aumento en MFI [%]
120
100
80
60
40
20
0
Glc
DOG
Glc
DOG
12 mM
25 mM
E
Señal Oxidativa
Células T, anti-CD3/1 h
Aumento en MFI [%]
100
80
60
40
20
0
-20
-
7
12
25
BrPyr [µM]

Figura 1 F:

F

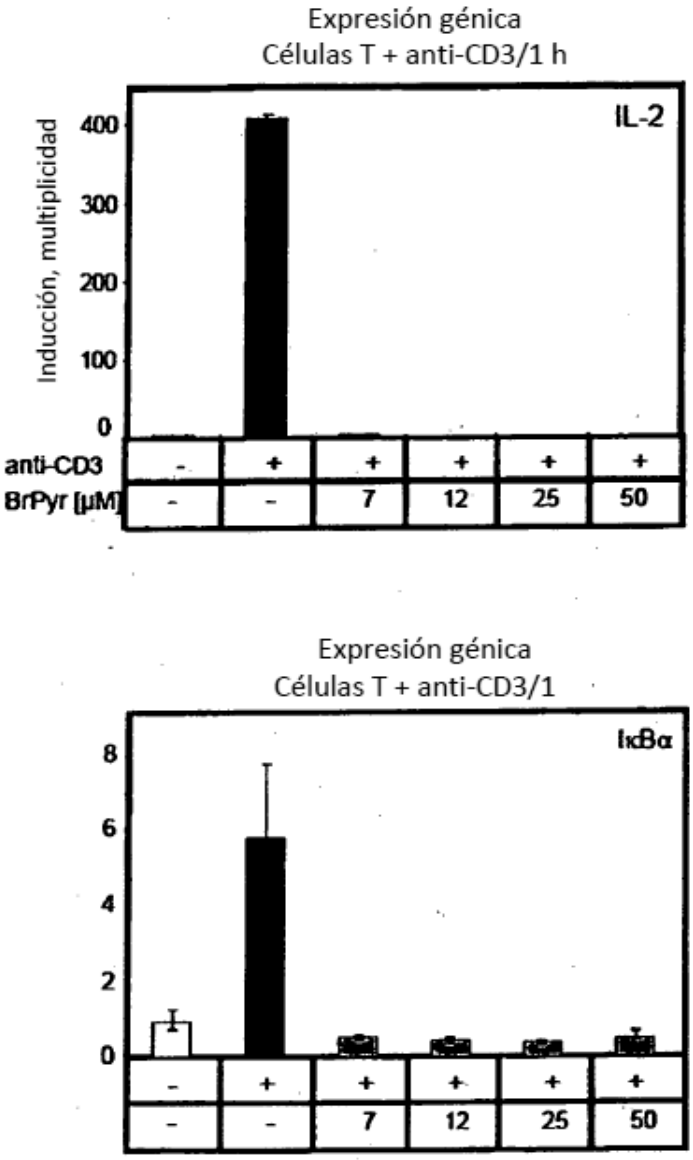

Expresión génica
Células T + anti-CD3/1 h
IL-2
Inducción, multiplicidad
400
300
200
100
0
anti-CD3
BrPyr [µM]
- + + + + +
- - 7 12 25 50
Expresión génica
Células T + anti-CD3/1
IκBα
8
6
4
2
0
- + + + + +
- - 7 12 25 50

Figura 1 G:

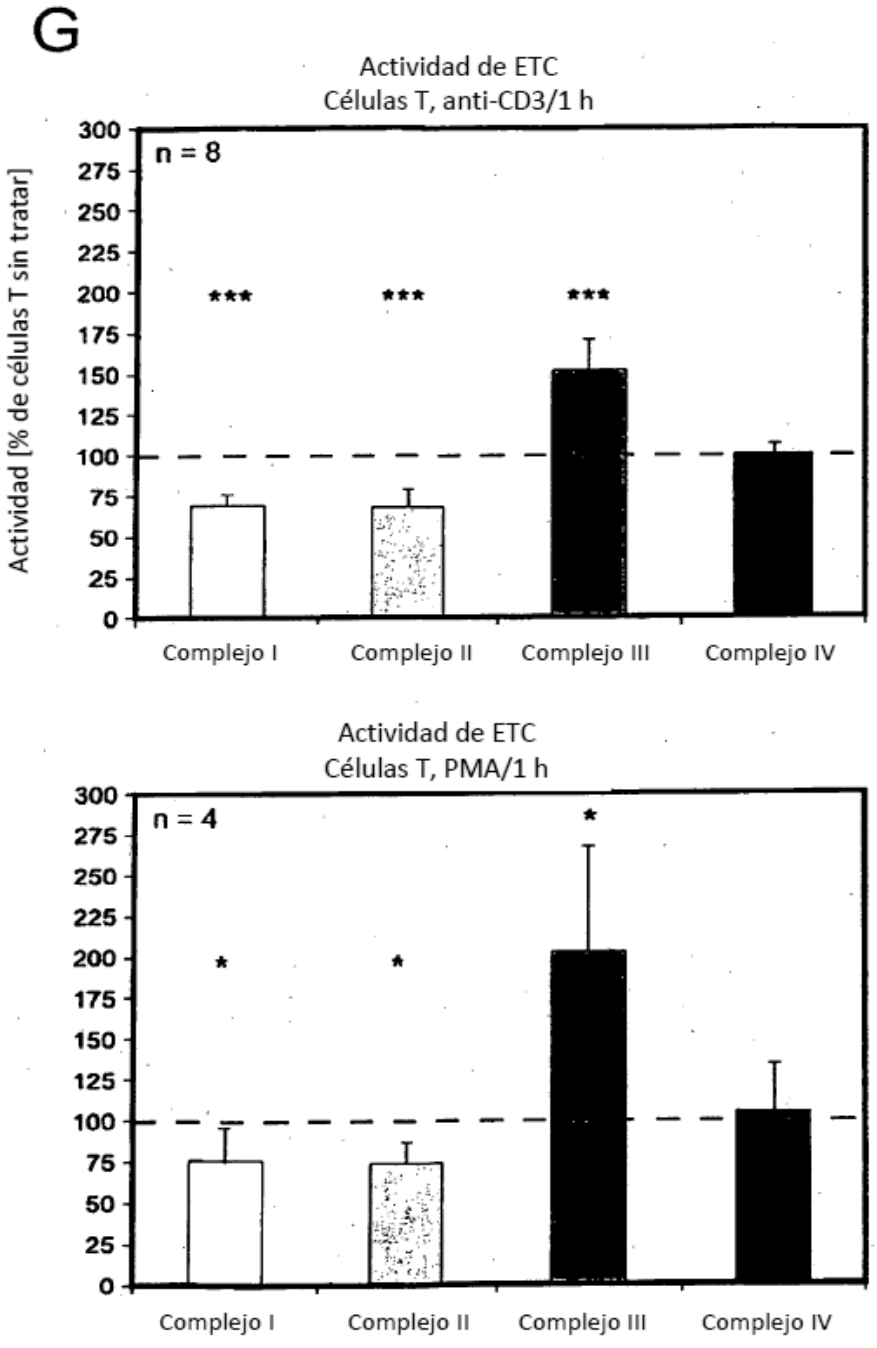

G
Actividad de ETC
Células T, anti-CD3/1 h
n = 8
Actividad [% de células T sin tratar]
300
275
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
***
***
***
Complejo I
Complejo II
Complejo III
Complejo IV
Actividad de ETC
Células T, PMA/1 h
n = 4
*
*
*
Complejo I
Complejo II
Complejo III
Complejo IV

Figura 1 H-K:

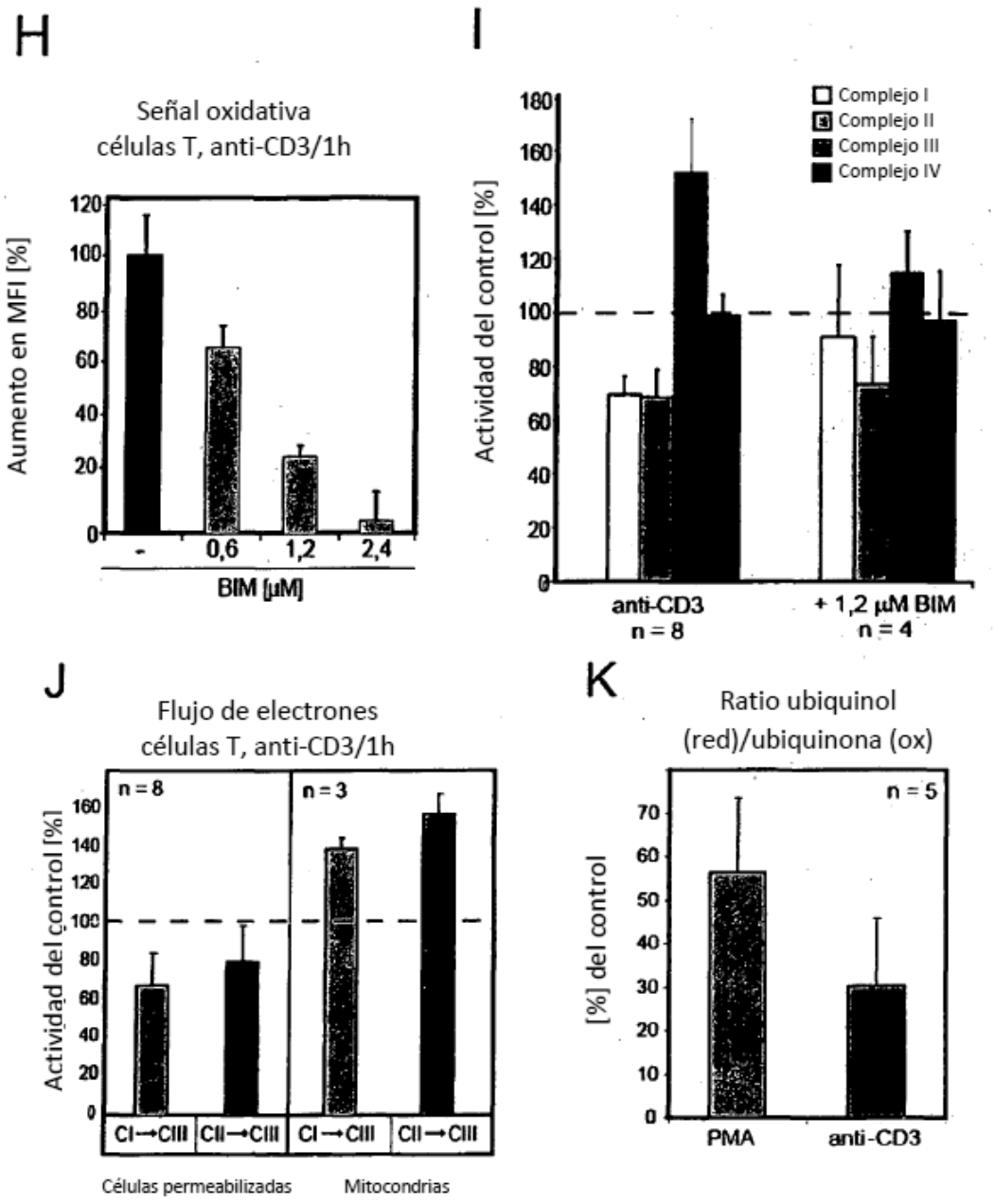

H
Señal oxidativa
células T, anti-CD3/1h
Aumento en MFI [%]
120
100
80
60
40
20
0
-
0,6
1,2
2,4
BIM [µM]
I
Complejo I
Complejo II
Complejo III
Complejo IV
Actividad del control [%]
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
anti-CD3
n = 8
+ 1,2 µM BIM
n = 4
J
Flujo de electrones
células T, anti-CD3/1h
Actividad del control [%]
n = 8
n = 3
160
140
120
100
80
60
40
20
0
CI→CIII
CII→CIII
CI→CIII
CII→CIII
Células permeabilizadas
Mitocondrias
K
Ratio ubiquinol
(red)/ubiquinona (ox)
[%] del control
n = 5
70
60
50
40
30
20
10
0
PMA
anti-CD3

Figura 2 A

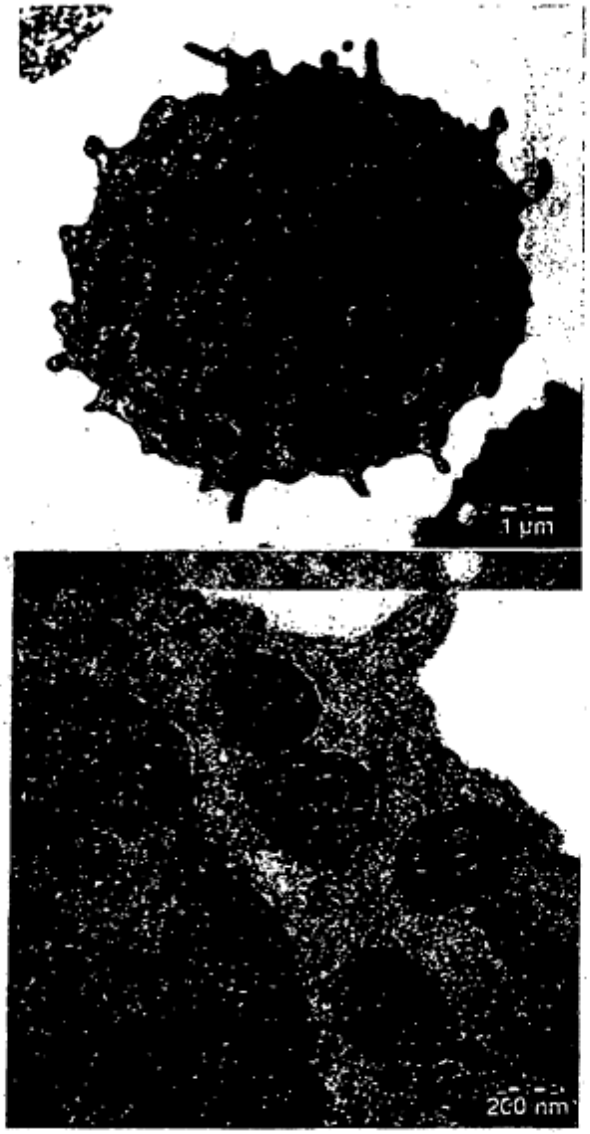


Figura 2 B:

Figura 2 C:

Figura 3 A:

A

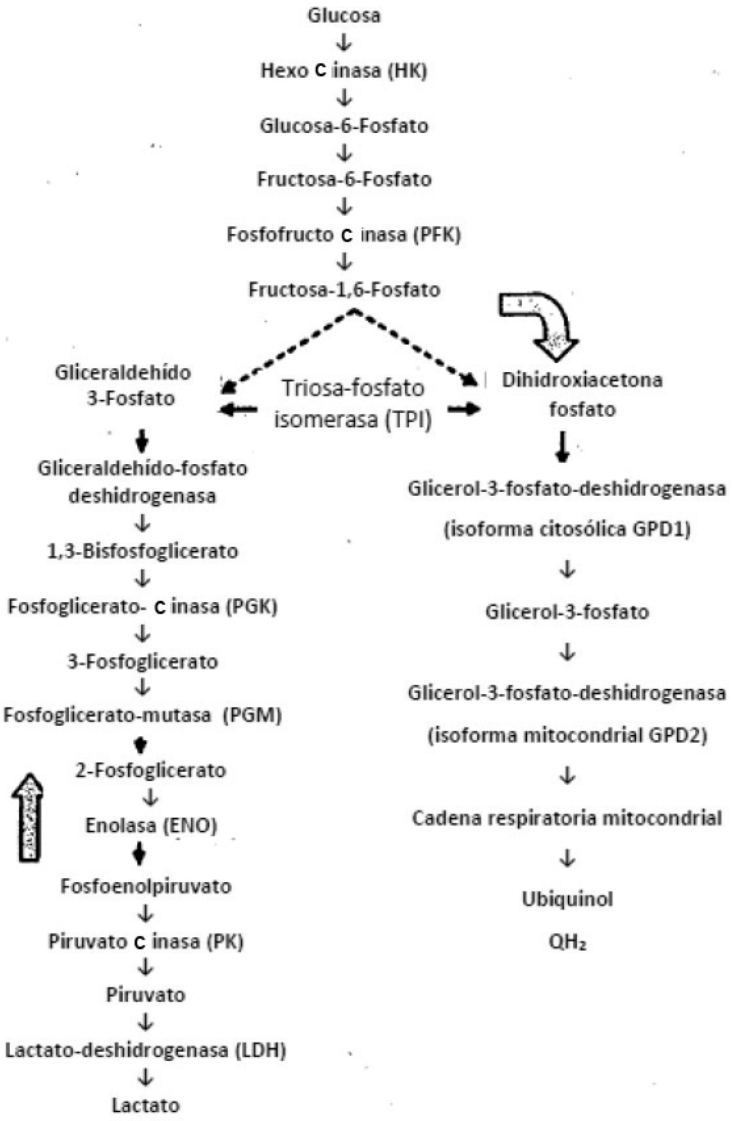

Glucosa
Hexo c inasa (HK)
Glucosa-6-Fosfato
Fructosa-6-Fosfato
Fosfofructo c inasa (PFK)
Fructosa-1,6-Fosfato
Gliceraldehído 3-Fosfato
Triosa-fosfato isomerasa (TPI)
Dihidroxiacetona fosfato
Gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa
1,3-Bisfosfoglicerato
Fosfoglicerato- c inasa (PGK)
3-Fosfoglicerato
Fosfoglicerato-mutasa (PGM)
2-Fosfoglicerato
Enolasa (ENO)
Fosfoenolpiruvato
Piruvato c inasa (PK)
Piruvato
Lactato-deshidrogenasa (LDH)
Lactato
Glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa
(isoforma citosólica GPD1)
Glicerol-3-fosfato
Glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa
(isoforma mitocondrial GPD2)
Cadena respiratoria mitocondrial
Ubiquinol
QH_2

Figura 3 B-D:

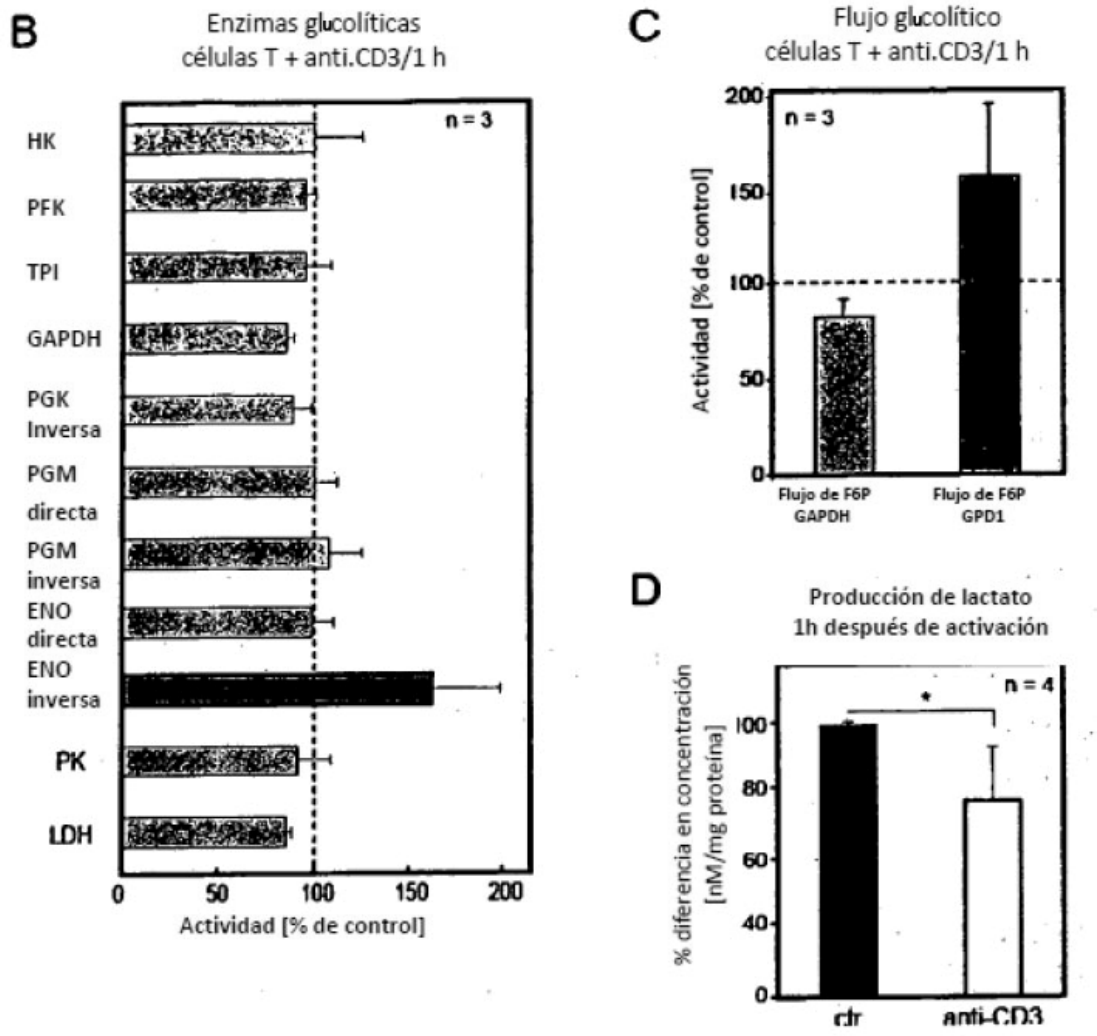

B
Enzimas glucolíticas
células T + anti.CD3/1 h
n = 3
HK
PFK
TPI
GAPDH
PGK Inversa
PGM directa
PGM inversa
ENO directa
ENO inversa
PK
LDH
0
50
100
150
200
Actividad [% de control]
C
Flujo glucolítico
células T + anti.CD3/1 h
n = 3
Actividad [% de control]
200
150
100
50
0
Flujo de F6P GAPDH
Flujo de F6P GPD1
D
Producción de lactato
1h después de activación
n = 4
*
% diferencia en concentración [nM/mg proteína]
100
80
60
40
0
ctr
anti-CD3

Figura 3 E-F:

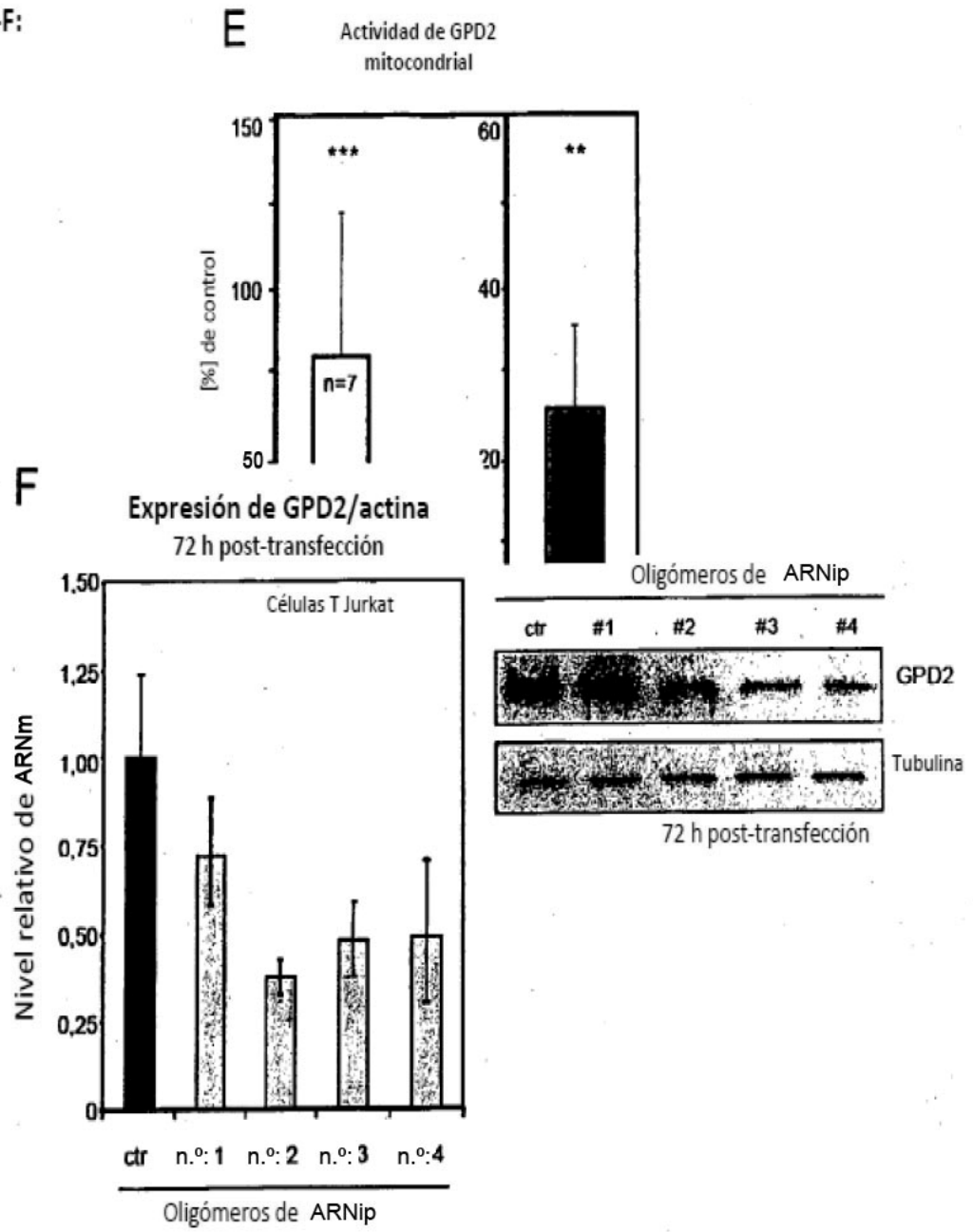

E
Actividad de GPD2 mitocondrial
[%] de control
150
100
50
***
n=7
60
40
20
**
F
Expresión de GPD2/actina
72 h post-transfección
Células T Jurkat
Nivel relativo de ARNm
1,50
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º:4
Oligómeros de ARNip
Oligómeros de ARNip
ctr
#1
#2
#3
#4
GPD2
Tubulina
72 h post-transfección

Figura 3 G-H:

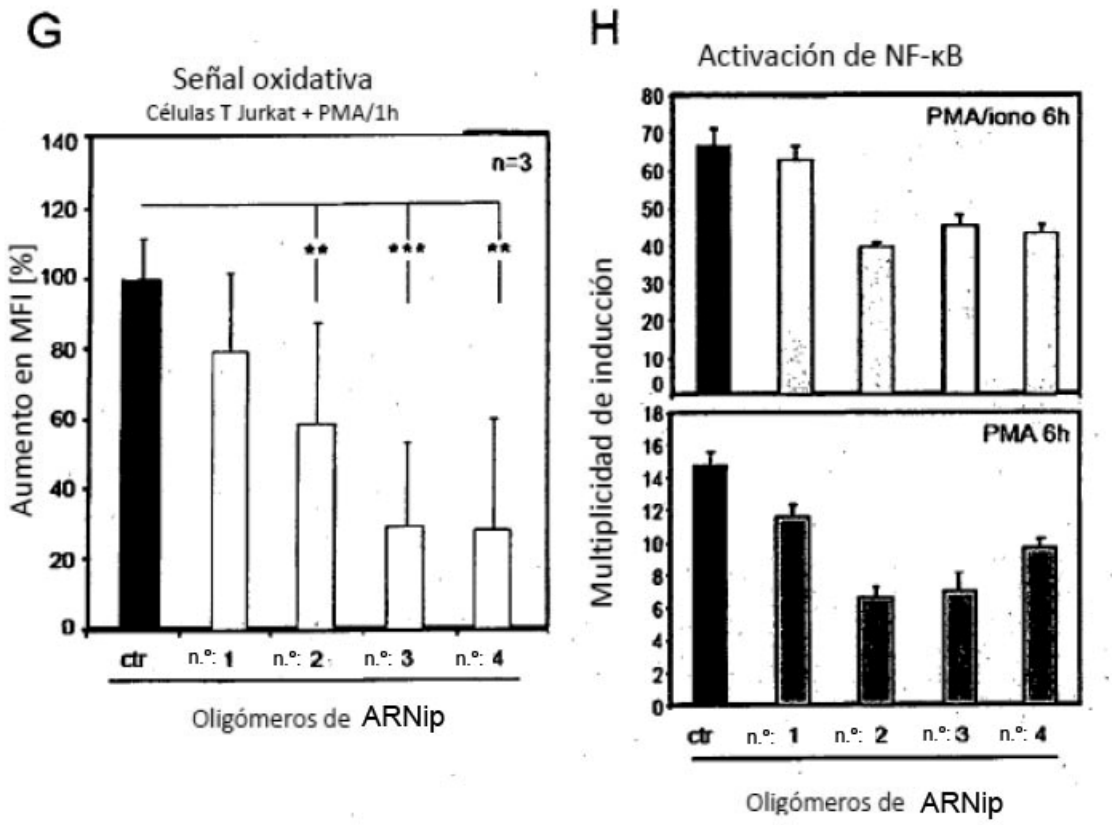

G
Señal oxidativa
Células T Jurkat + PMA/1h
n=3
Aumento en MFI [%]
140
120
100
80
60
40
20
0
**
***
**
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4
Oligómeros de ARNip
H
Activación de NF-κB
PMA/iono 6h
PMA 6h
Multiplicidad de inducción
80
70
60
50
40
30
20
10
0
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4
Oligómeros de ARNip

Figura 3 I:

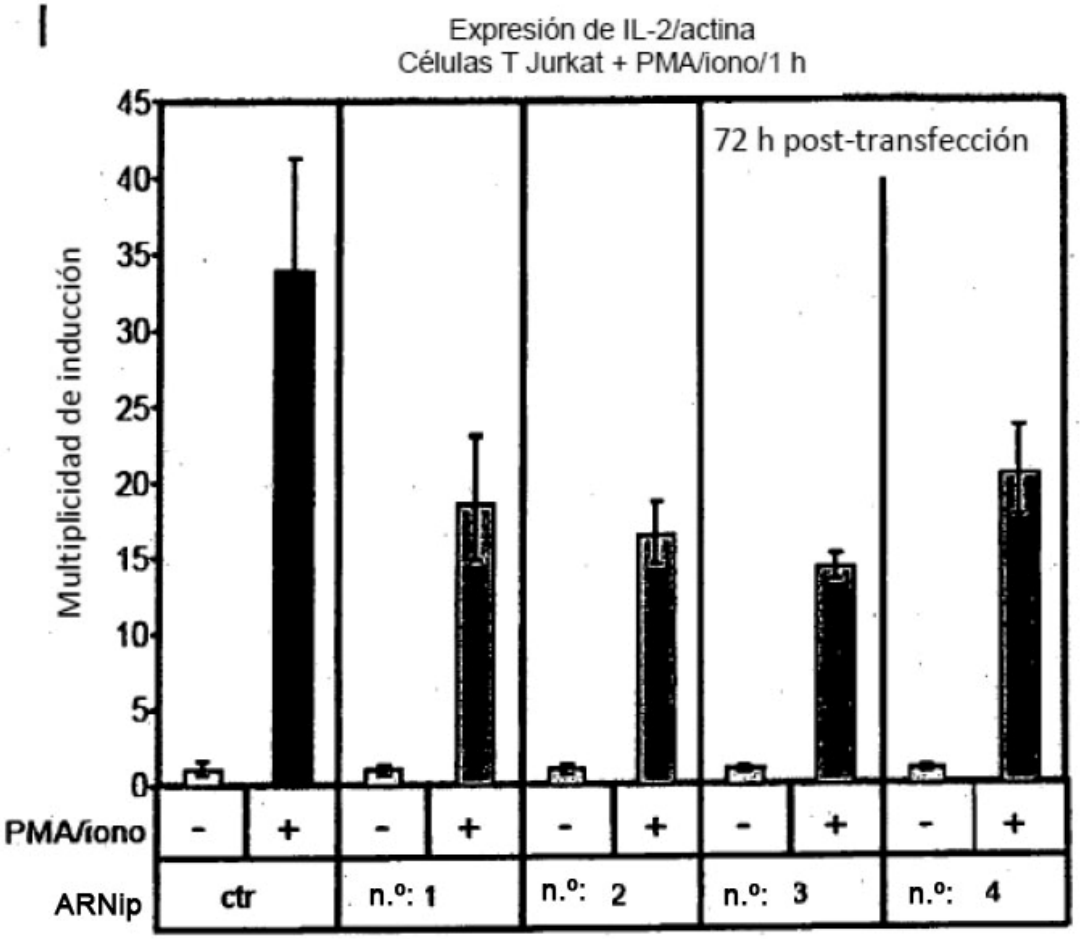
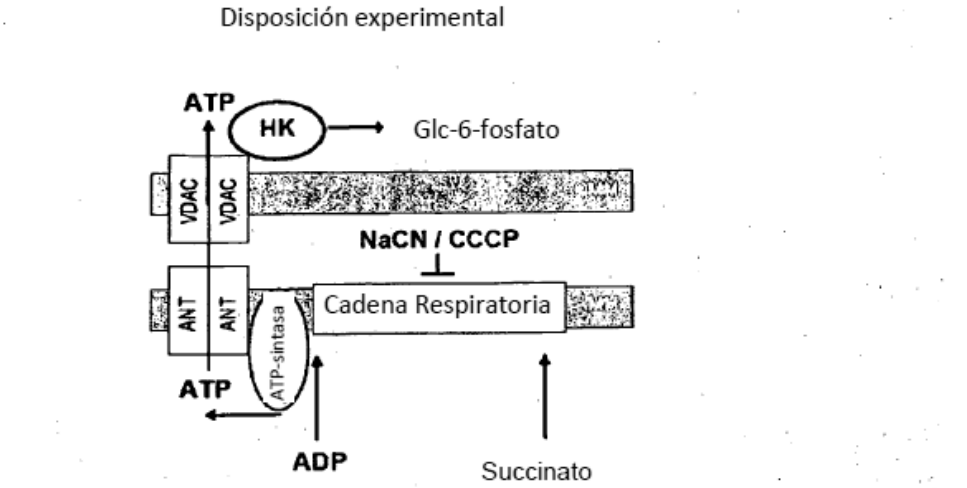

Expresión de IL-2/actina
Células T Jurkat + PMA/iono/1 h
72 h post-transfección
Multiplicidad de inducción
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PMA/iono
-
+
-
+
-
+
-
+
-
+
ARNip
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4

Figura 4 A-B:

A



B

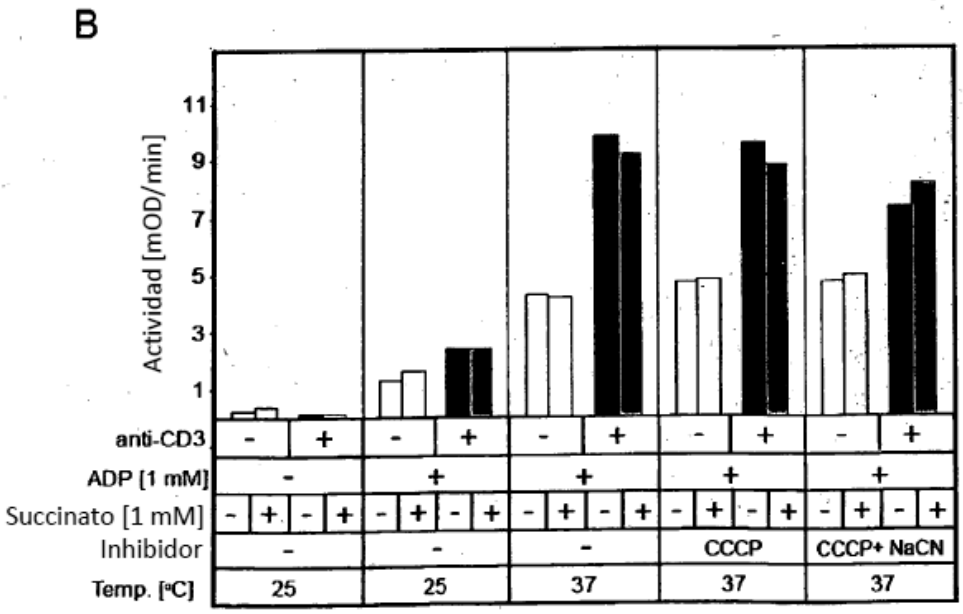
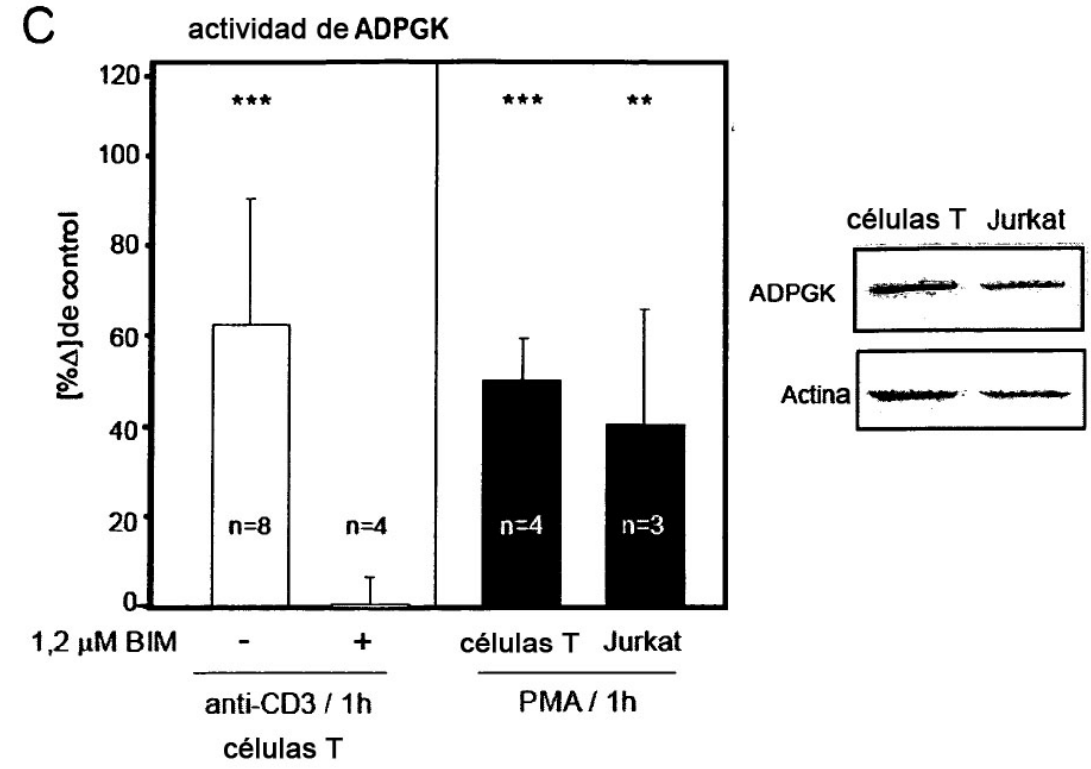


Figura 4 C-D:


C
actividad de ADPGK
[%Δ]de control
120
100
80
60
40
20
0
***
***
**
n=8
n=4
n=4
n=3
células T Jurkat
ADPGK
Actina
1,2 µM BIM
-
+
células T Jurkat
anti-CD3 / 1h
células T
PMA / 1h

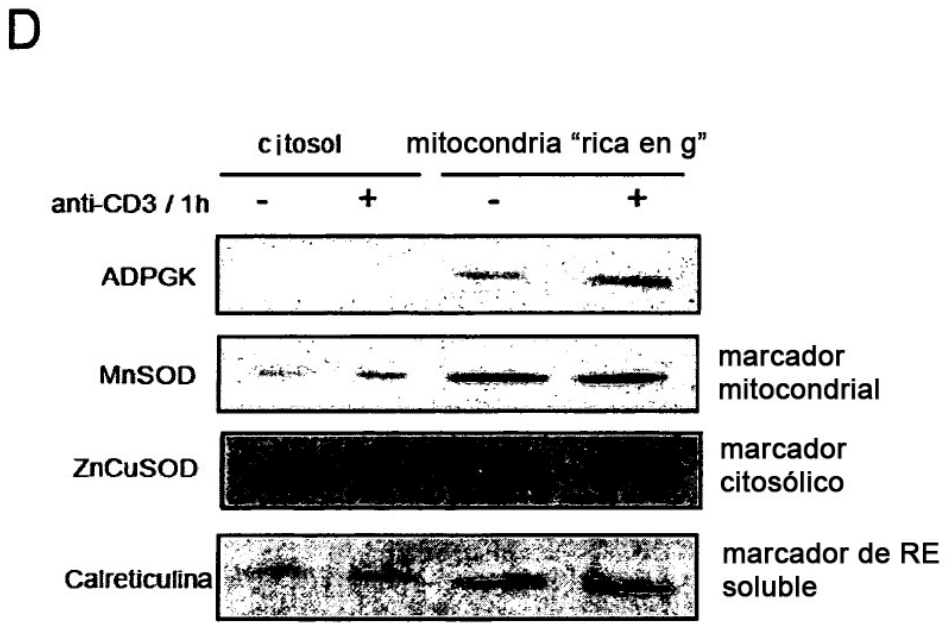

D
citosol
mitocondria "rica en g"
anti-CD3 / 1h
-
+
-
+
ADPGK
MnSOD
ZnCuSOD
Calreticulina
marcador mitocondrial
marcador citosólico
marcador de RE soluble

Figura 4 E:

E

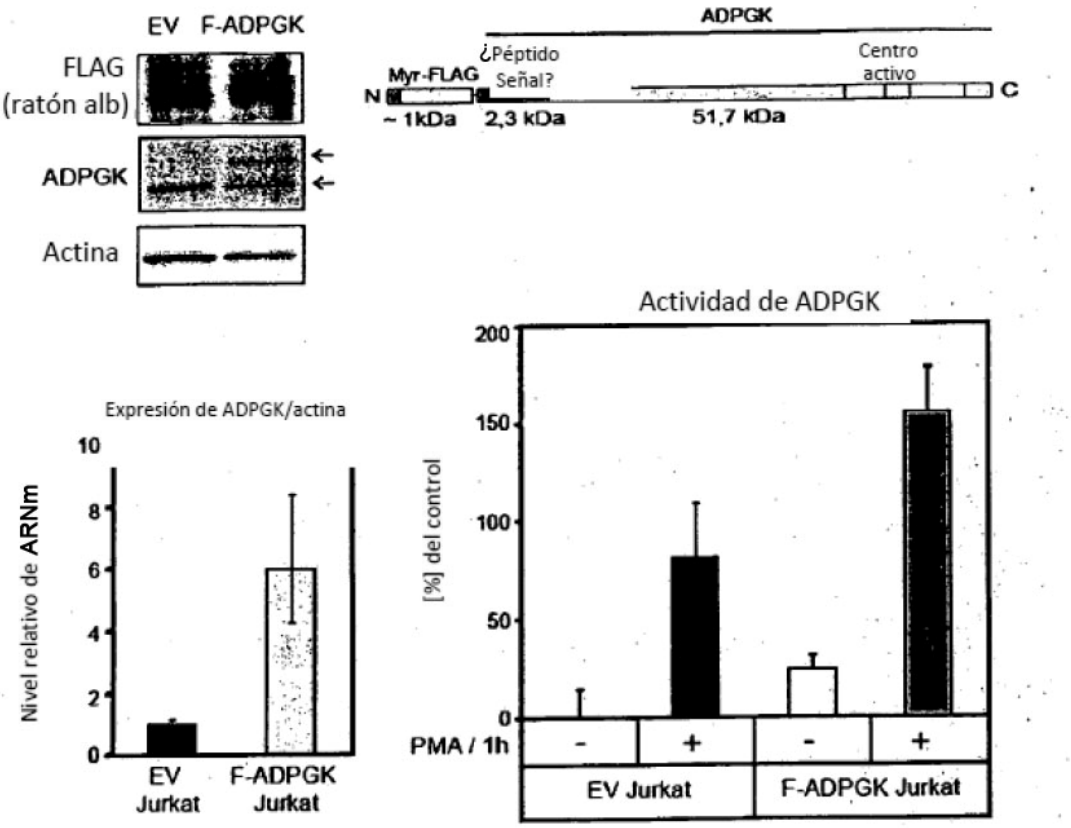

EV F-ADPGK
FLAG (ratón alb)
ADPGK
Actina
ADPGK
¿Péptido Señal?
Centro activo
Myr-FLAG
N
C
~ 1kDa
2,3 kDa
51,7 kDa
Expresión de ADPGK/actina
Nivel relativo de ARNm
EV Jurkat
F-ADPGK Jurkat
Actividad de ADPGK
[%] del control
PMA / 1h
EV Jurkat
F-ADPGK Jurkat

Figura 4 F:

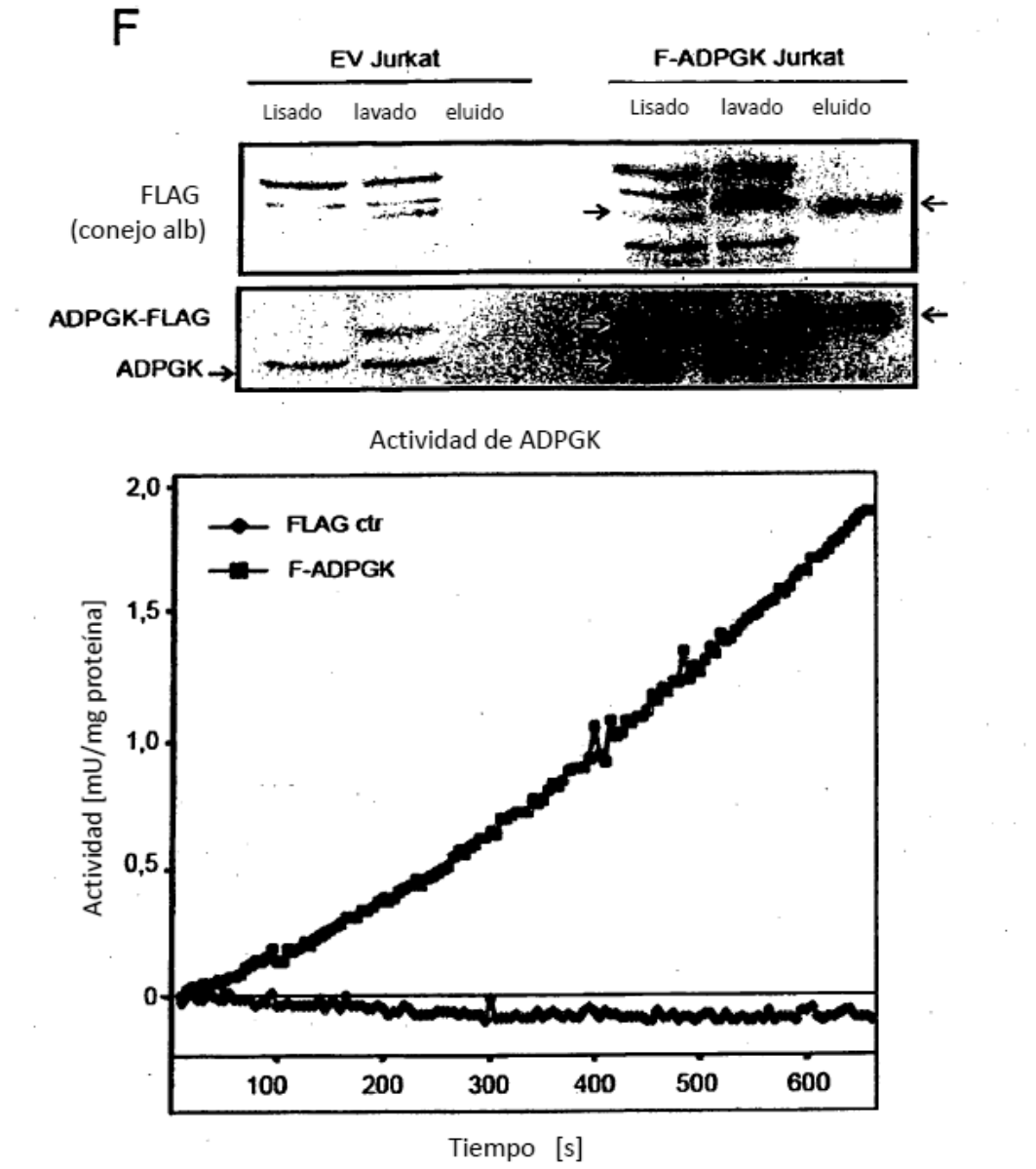

F
EV Jurkat
F-ADPGK Jurkat
Lisado lavado eluido
Lisado lavado eluido
FLAG
(conejo alb)
ADPGK-FLAG
ADPGK
Actividad de ADPGK
FLAG ctr
F-ADPGK
Actividad [mU/mg proteína]
2,0
1,5
1,0
0,5
0
100
200
300
400
500
600
Tiempo [s]

Figura 5A-B:

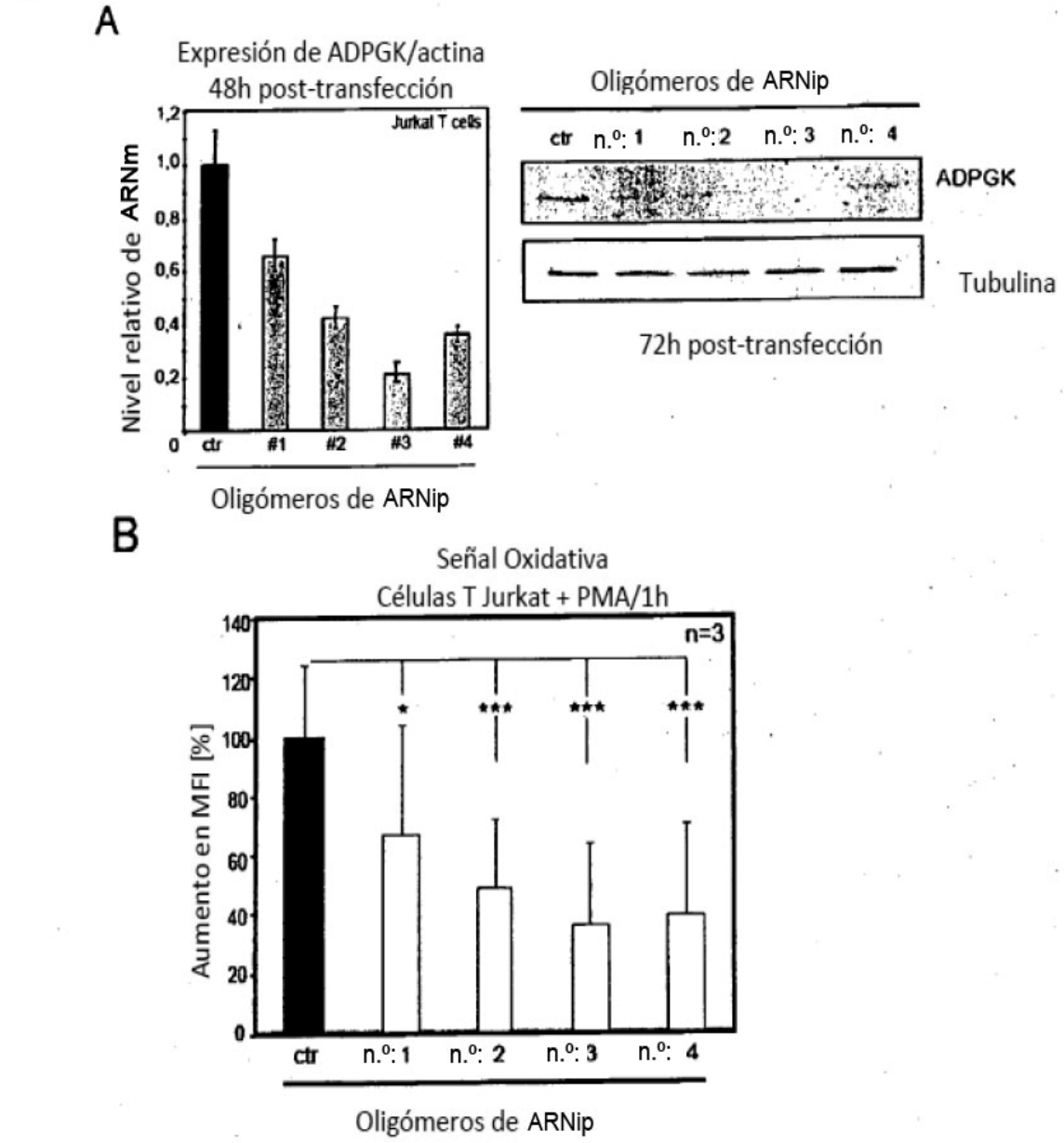

A
Expresión de ADPGK/actina
48h post-transfección
Jurkat T cells
Nivel relativo de ARNm
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
ctr
#1
#2
#3
#4
Oligómeros de ARNip
Oligómeros de ARNip
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4
ADPGK
Tubulina
72h post-transfección
B
Señal Oxidativa
Células T Jurkat + PMA/1h
n=3
Aumento en MFI [%]
140
120
100
80
60
40
20
0
*
***
***
***
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4
Oligómeros de ARNip

Figura 5C:

C

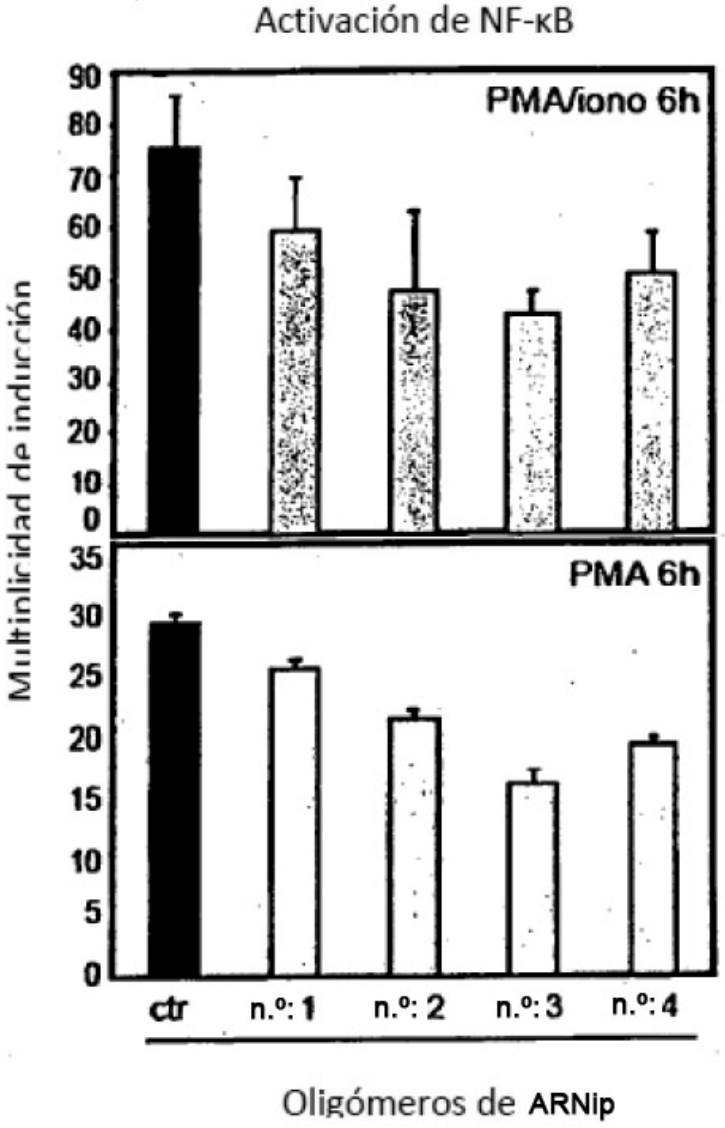

Activación de NF-κB
PMA/iono 6h
PMA 6h
Multiplicidad de inducción
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
35
30
25
20
15
10
5
0
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4
Oligómeros de ARNip

Figura 5D:

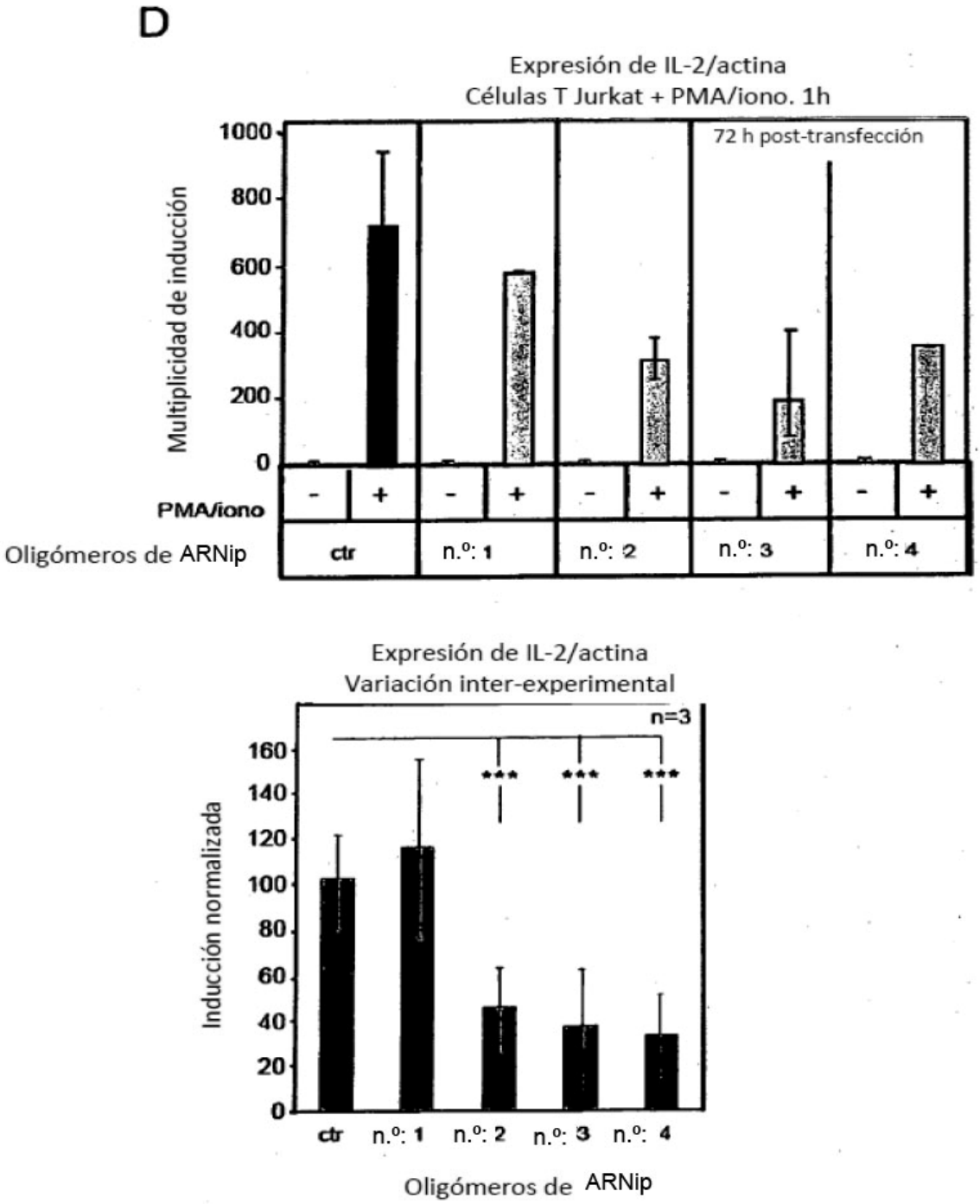

D
Expresión de IL-2/actina
Células T Jurkat + PMA/iono. 1h
72 h post-transfección
Multiplicidad de inducción
1000
800
600
400
200
0
PMA/iono
-
+
Oligómeros de ARNip
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4
Expresión de IL-2/actina
Variación inter-experimental
n=3
***
Inducción normalizada
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4
Oligómeros de ARNip

Figura 5E-G:

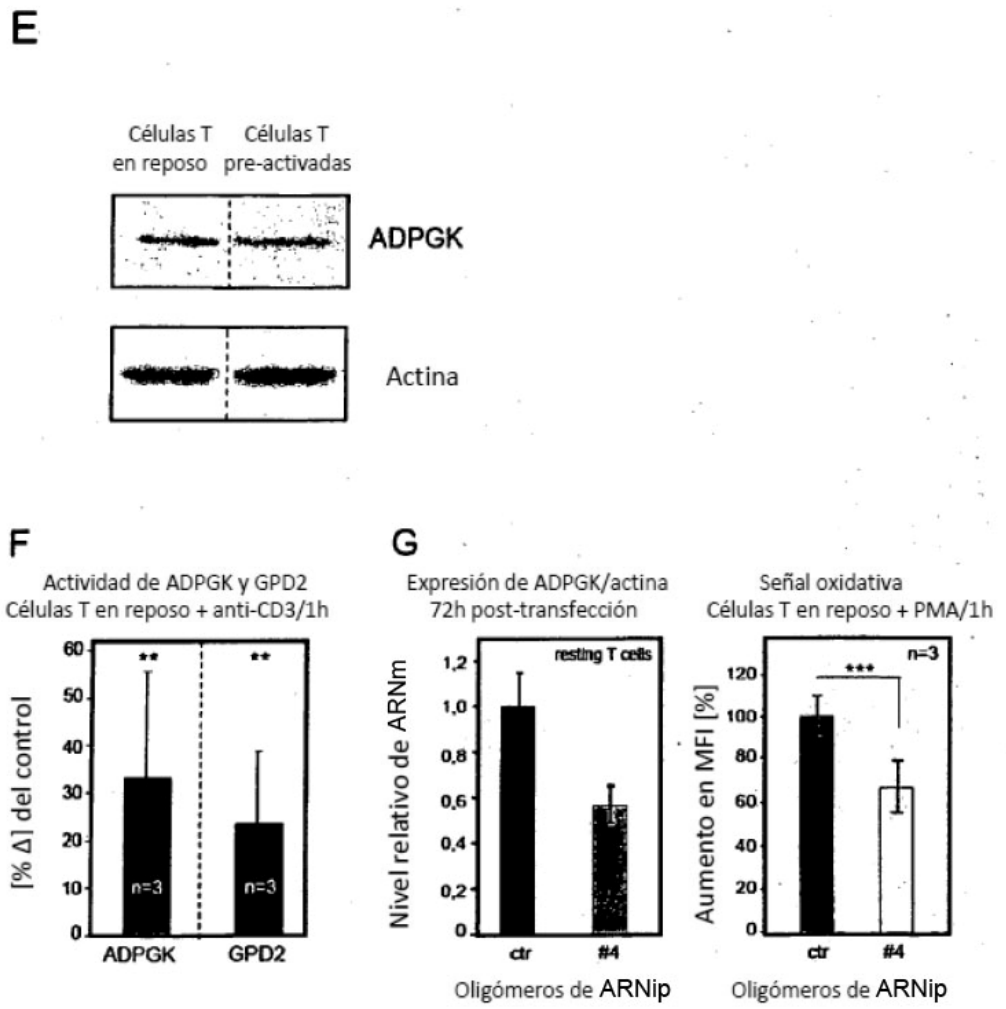

E
Células T en reposo
Células T pre-activadas
ADPGK
Actina
F
Actividad de ADPGK y GPD2
Células T en reposo + anti-CD3/1h
[% Δ] del control
**
**
n=3
n=3
ADPGK
GPD2
G
Expresión de ADPGK/actina
72h post-transfección
Nivel relativo de ARNm
resting T cells
ctr
#4
Oligómeros de ARNip
Señal oxidativa
Células T en reposo + PMA/1h
Aumento en MFI [%]
***
n=3
ctr
#4
Oligómeros de ARNip

Figura 6A-B:

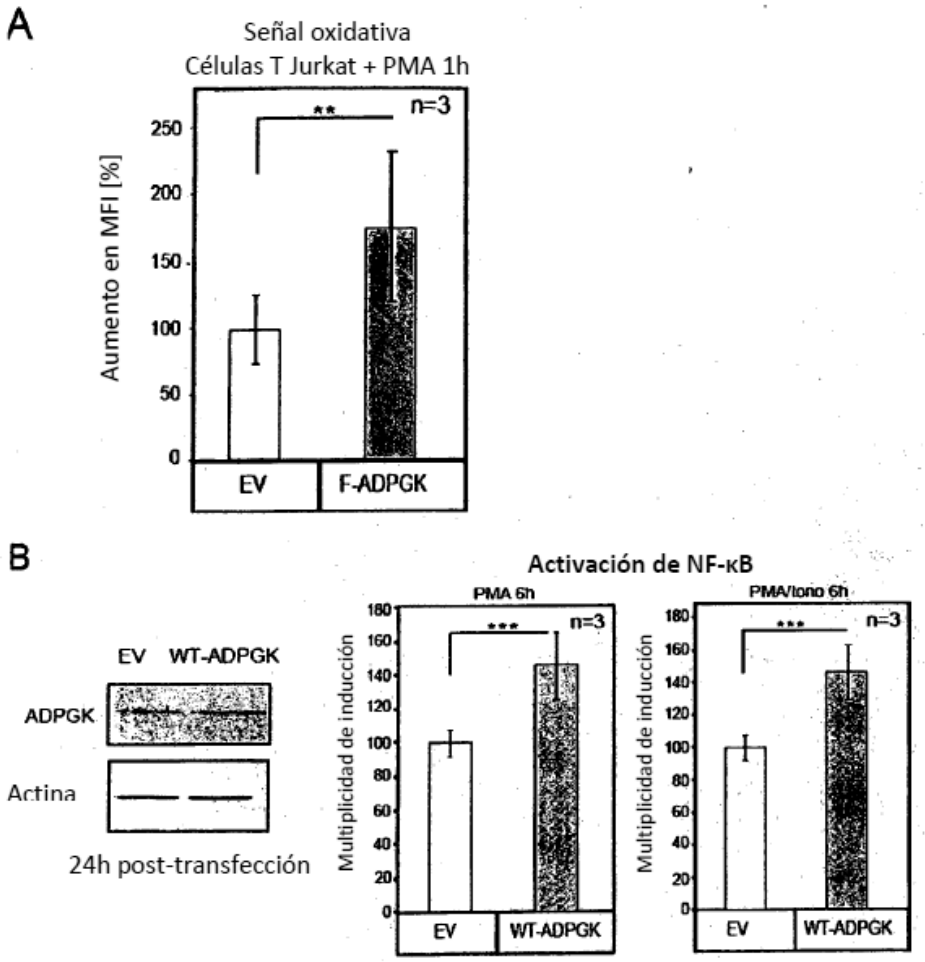

A
Señal oxidativa
Células T Jurkat + PMA 1h
Aumento en MFI [%]
250
200
150
100
50
0
**
n=3
EV
F-ADPGK
B
EV WT-ADPGK
ADPGK
Actina
24h post-transfección
Activación de NF-κB
PMA 6h
PMA/Iono 6h
Multiplicidad de inducción
***
n=3
EV
WT-ADPGK

Figura 6C:

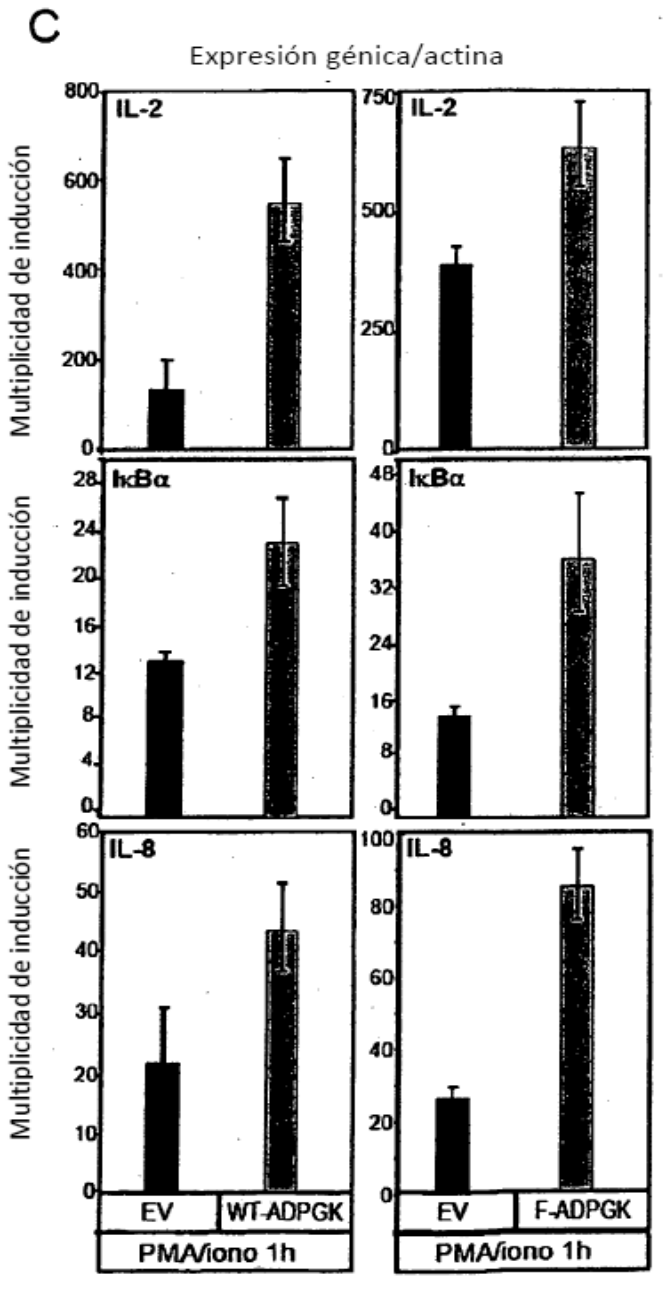
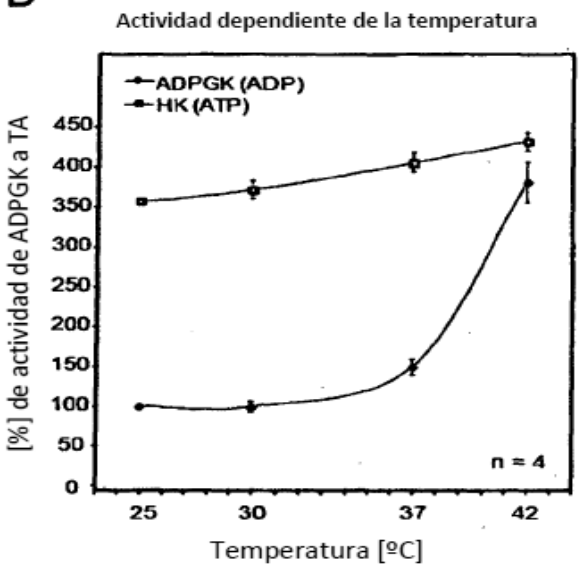

C
Expresión génica/actina
Multiplicidad de inducción
IL-2
IκBα
IL-8
EV
WT-ADPGK
F-ADPGK
PMA/iono 1h

Figura 6D-E:

D



E

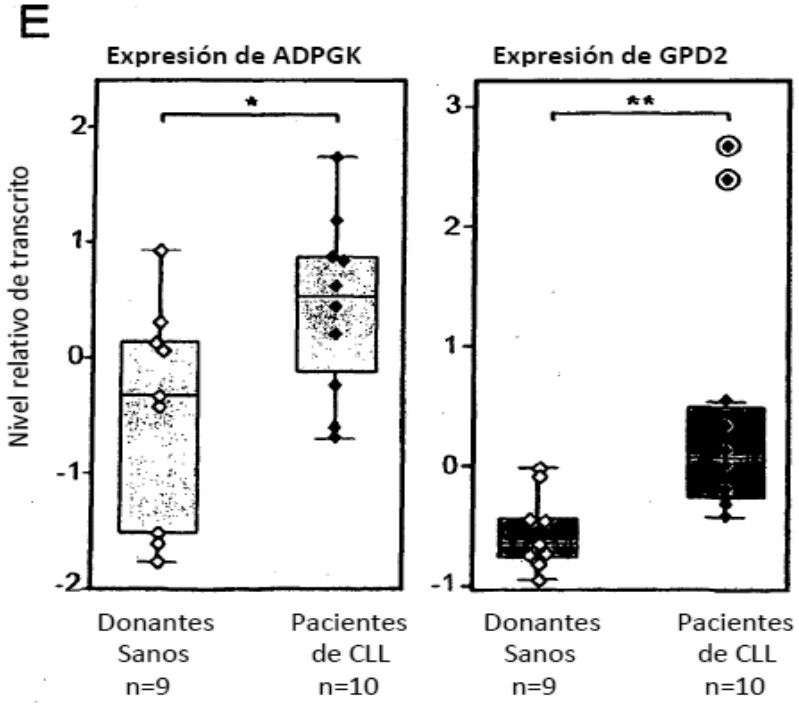


Figura 6F:

F

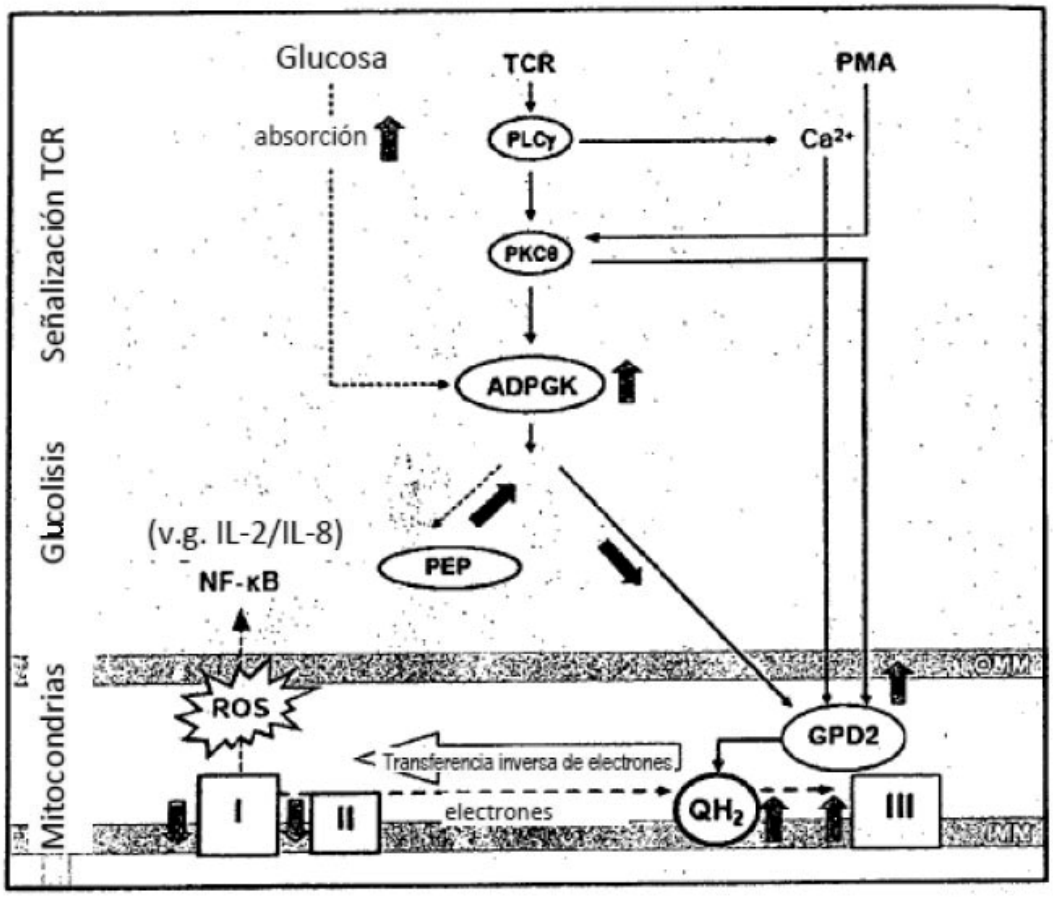

Glucosa
TCR
PMA
absorción
PLCγ
Ca2+
Señalización TCR
PKCθ
ADPGK
Glucolisis
(v.g. IL-2/IL-8)
PEP
NF-κB
Mitocondrias
ROS
GPD2
Transferencia inversa de electrones
electrones
I
II
QH2
III

Figura 7 A: A

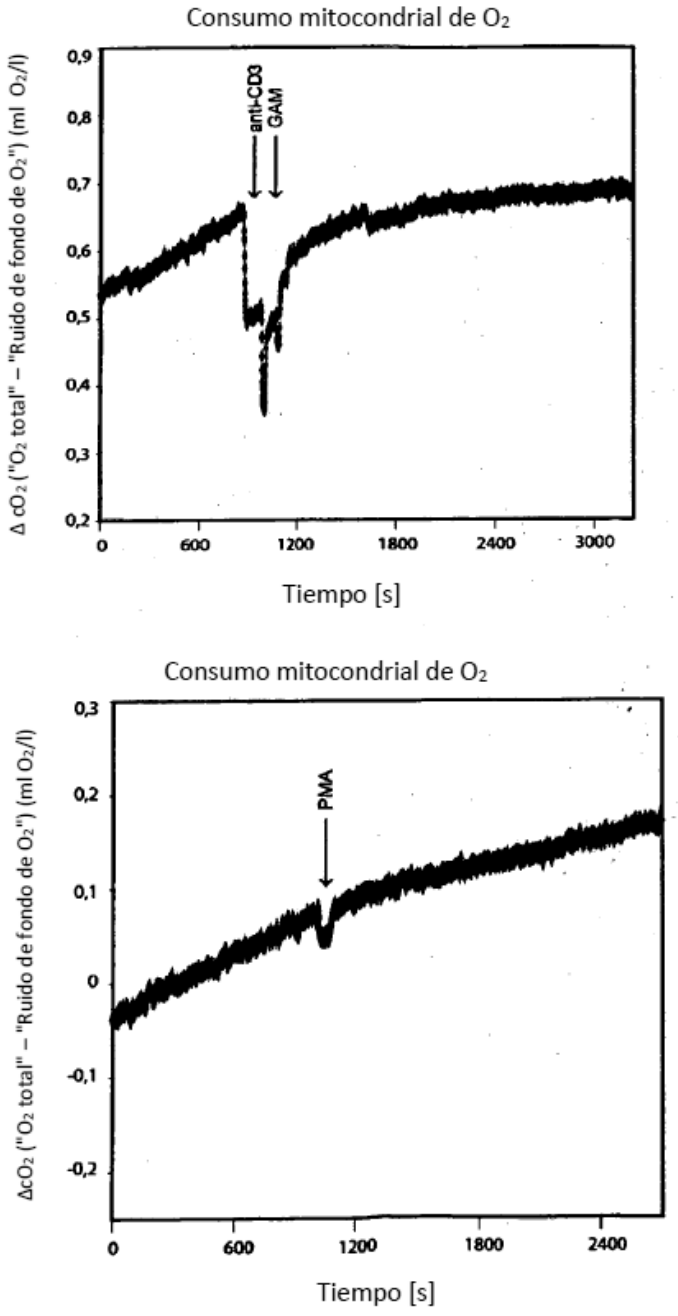

Consumo mitocondrial de O_2
Δ cO2 ("O2 total" – "Ruido de fondo de O2") (ml O2/l)
anti-CD3
GAM
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0
600
1200
1800
2400
3000
Tiempo [s]
Consumo mitocondrial de O_2
ΔcO2 ("O2 total" – "Ruido de fondo de O2") (ml O2/l)
PMA
0,3
0,2
0,1
0
-0,1
-0,2
0
600
1200
1800
2400
Tiempo [s]

Figura 7 B:

B

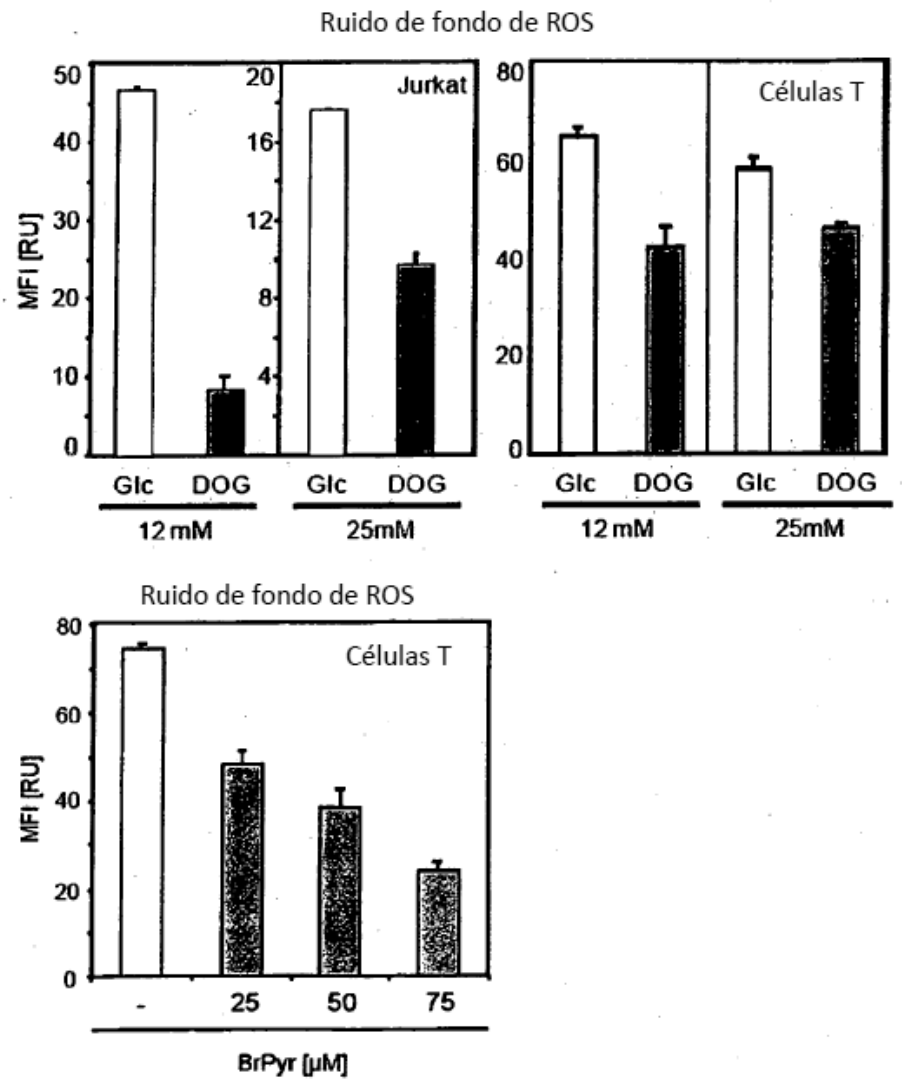

Ruido de fondo de ROS
MFI [RU]
Jurkat
Células T
Glc
DOG
12 mM
25mM
Ruido de fondo de ROS
Células T
MFI [RU]
-
25
50
75
BrPyr [µM]

Figura 7 C-D:

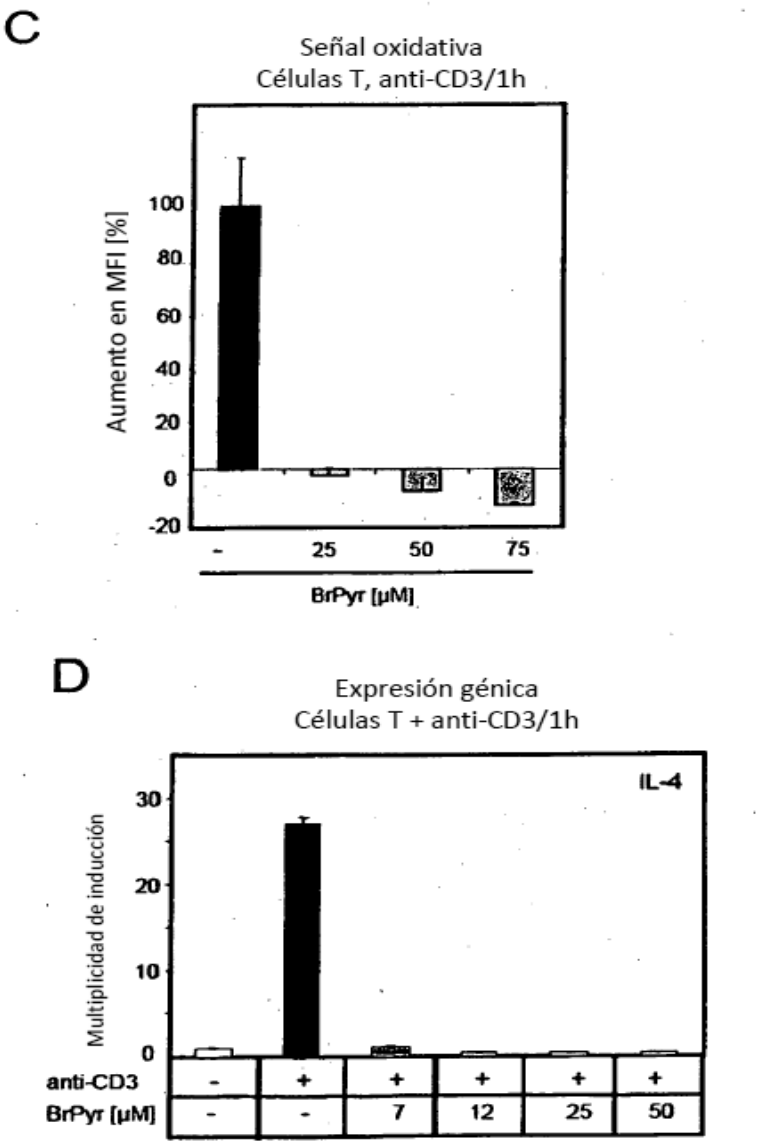

C
Señal oxidativa
Células T, anti-CD3/1h
Aumento en MFI [%]
100
80
60
40
20
0
-20
-
25
50
75
BrPyr [µM]
D
Expresión génica
Células T + anti-CD3/1h
IL-4
Multiplicidad de inducción
30
20
10
0
anti-CD3
BrPyr [µM]
- + + + + +
- - 7 12 25 50

Figura 8A:

A

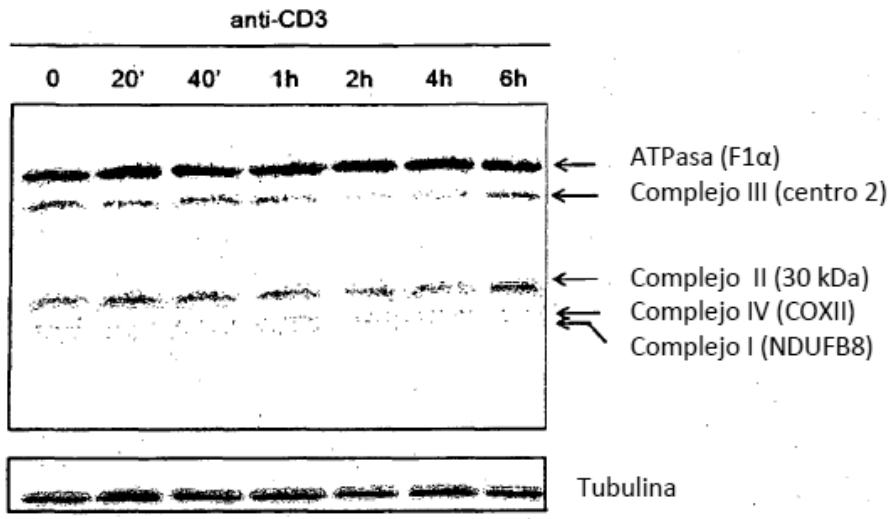

anti-CD3
0
20'
40'
1h
2h
4h
6h
ATPasa (F1α)
Complejo III (centro 2)
Complejo II (30 kDa)
Complejo IV (COXII)
Complejo I (NDUFB8)
Tubulina

Figura 8B:

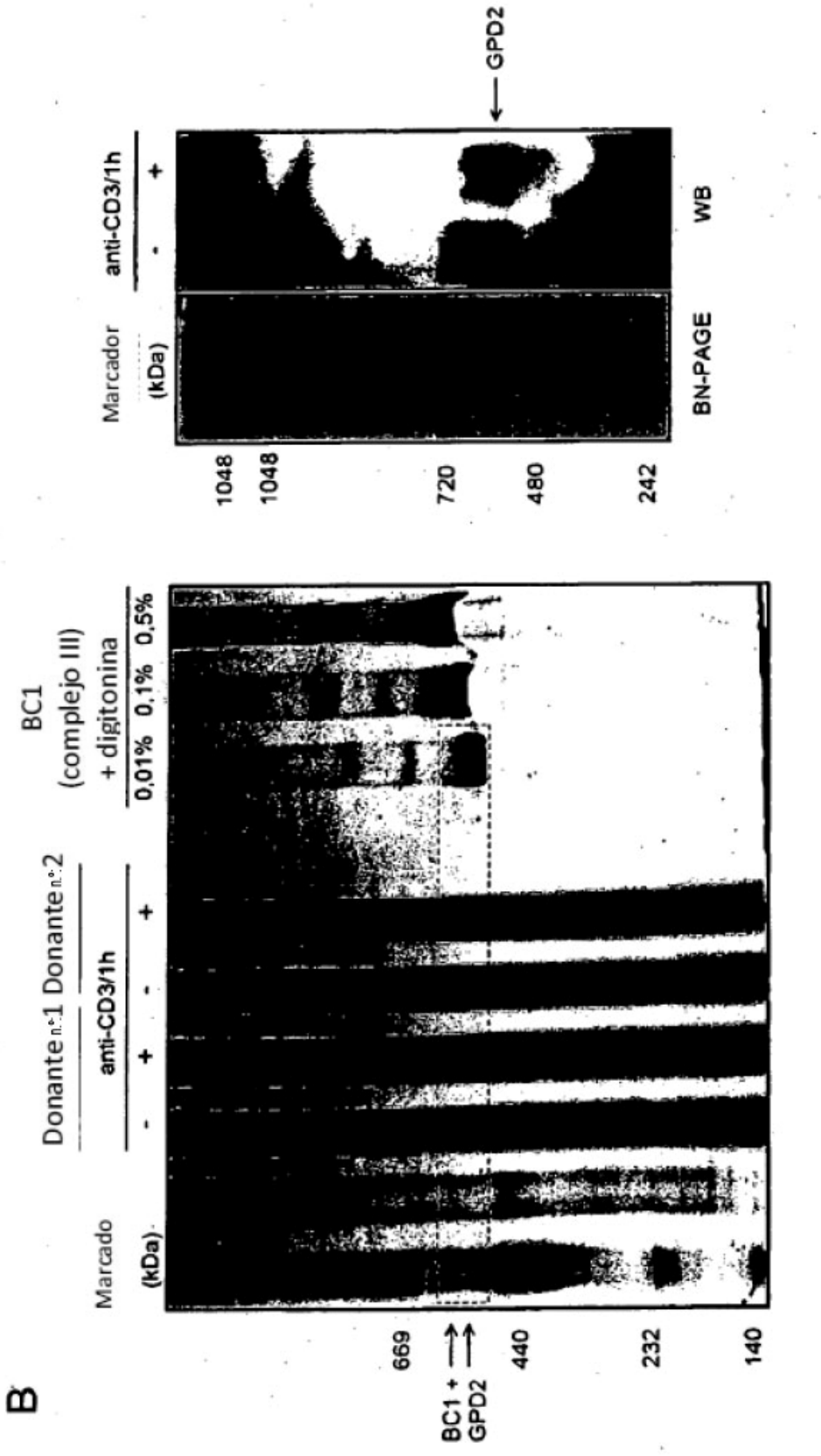

B
BC1
(complejo III)
+ digitonina
0,01% 0,1% 0,5%
Donante n.º 1 Donante n.º 2
anti-CD3/1h
- + - +
Marcado
(kDa)
669
440
232
140
BC1 +
GPD2
GPD2
anti-CD3/1h
- +
Marcador
(kDa)
1048
1048
720
480
242
BN-PAGE
WB

Figura 9A:

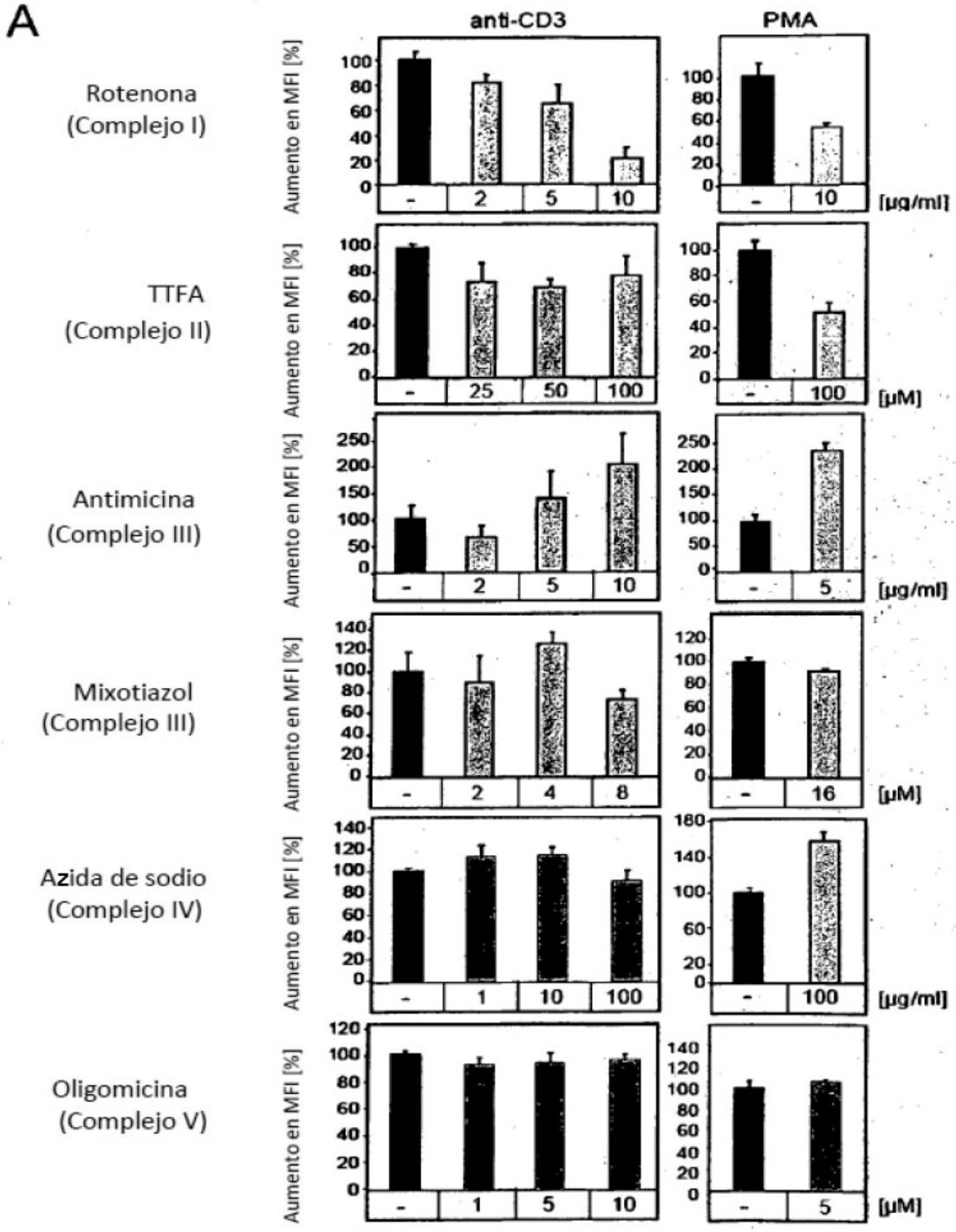

A
anti-CD3
PMA
Rotenona
(Complejo I)
TTFA
(Complejo II)
Antimicina
(Complejo III)
Mixotiazol
(Complejo III)
Azida de sodio
(Complejo IV)
Oligomicina
(Complejo V)
Aumento en MFI [%]
[µg/ml]
[µM]

Figura 9B:

B

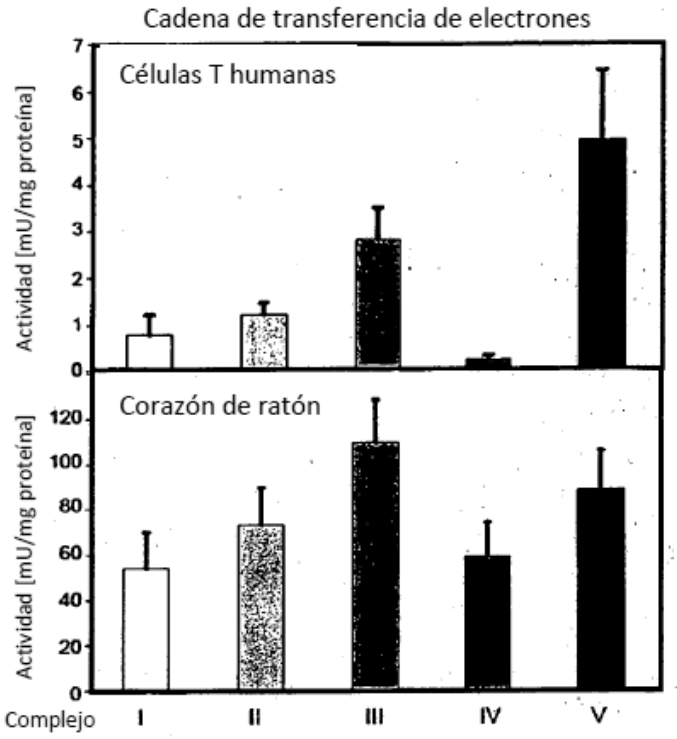
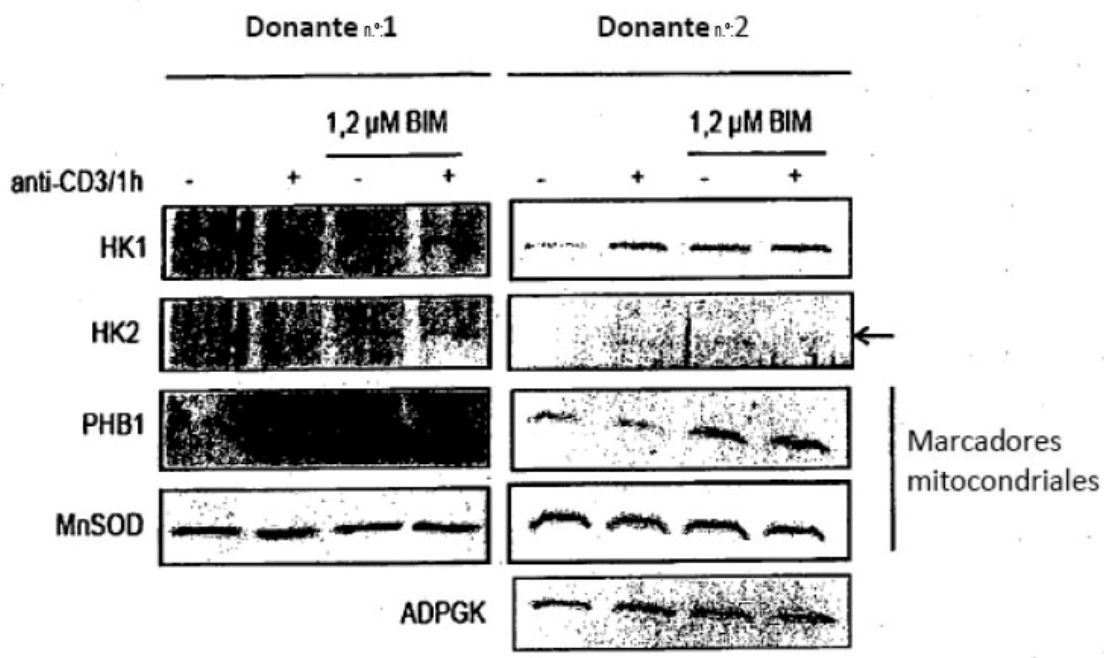

Cadena de transferencia de electrones
Células T humanas
Actividad [mU/mg proteína]
0
1
2
3
4
5
6
7
Corazón de ratón
Actividad [mU/mg proteína]
0
20
40
60
80
100
120
Complejo
I
II
III
IV
V

Figura 10A-B:

A



B

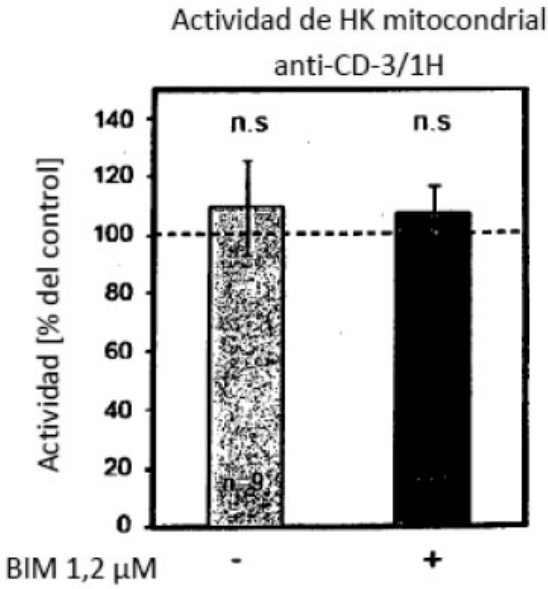
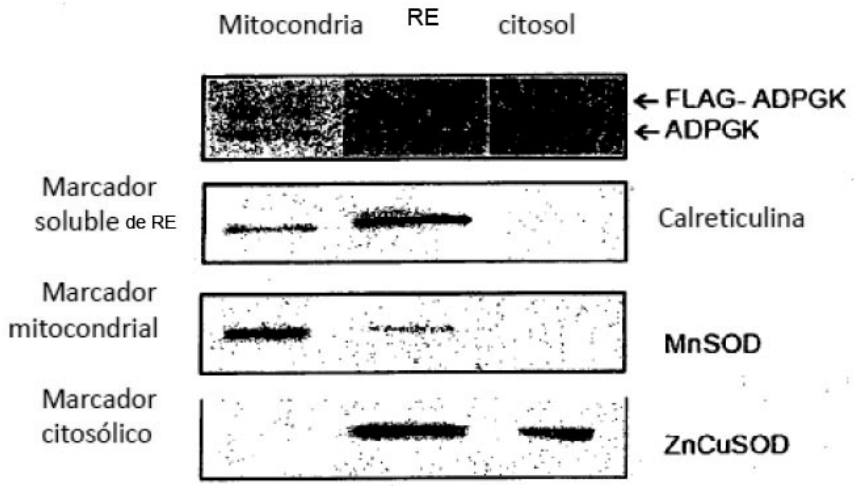


Figura 11A-B:

A



B

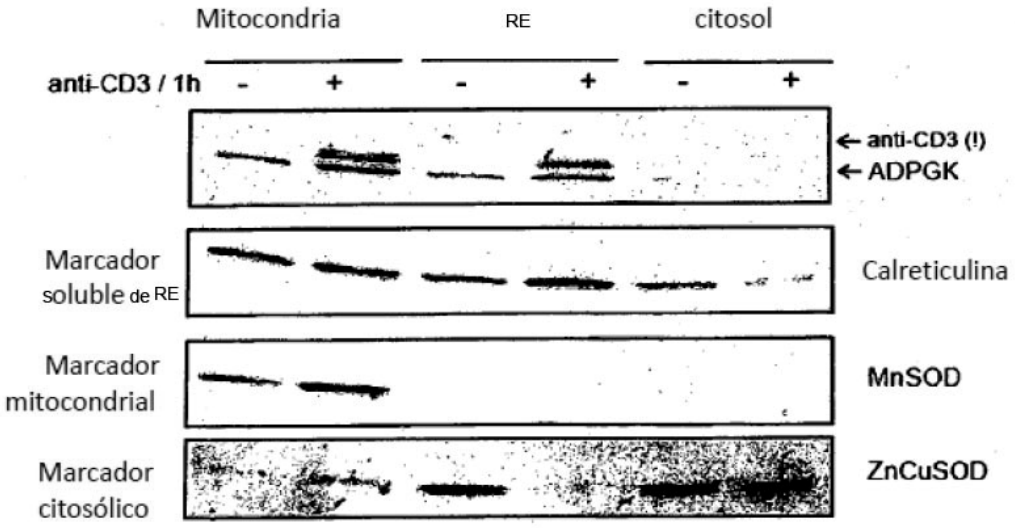


Figura 12:

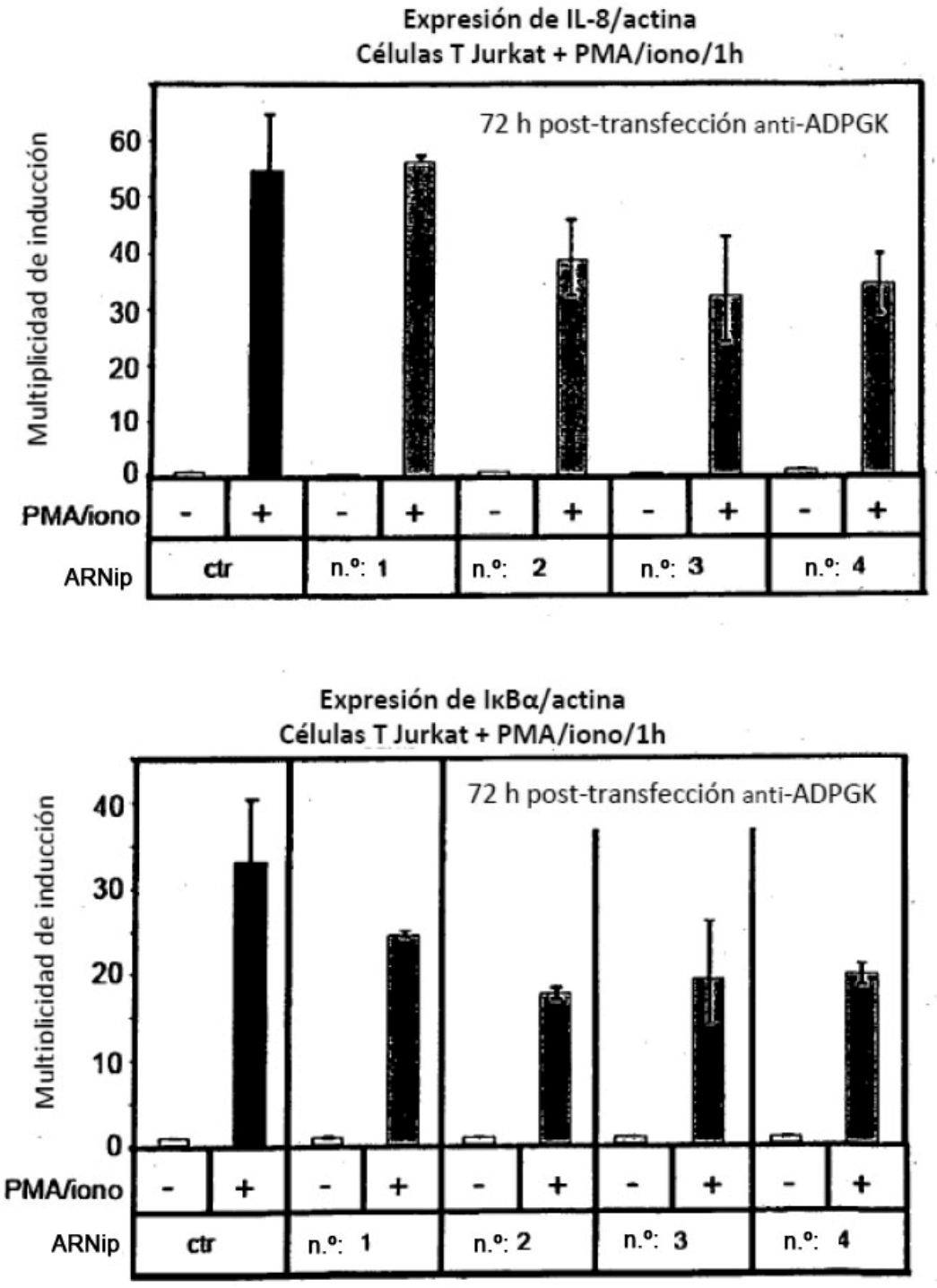

Expresión de IL-8/actina
Células T Jurkat + PMA/iono/1h
72 h post-transfección anti-ADPGK
Multiplicidad de inducción
60
50
40
30
20
10
0
PMA/iono
-
+
-
+
-
+
-
+
-
+
ARNip
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4
Expresión de IκBα/actina
Células T Jurkat + PMA/iono/1h
72 h post-transfección anti-ADPGK
Multiplicidad de inducción
40
30
20
10
0
PMA/iono
-
+
-
+
-
+
-
+
-
+
ARNip
ctr
n.º: 1
n.º: 2
n.º: 3
n.º: 4

Figura 13:

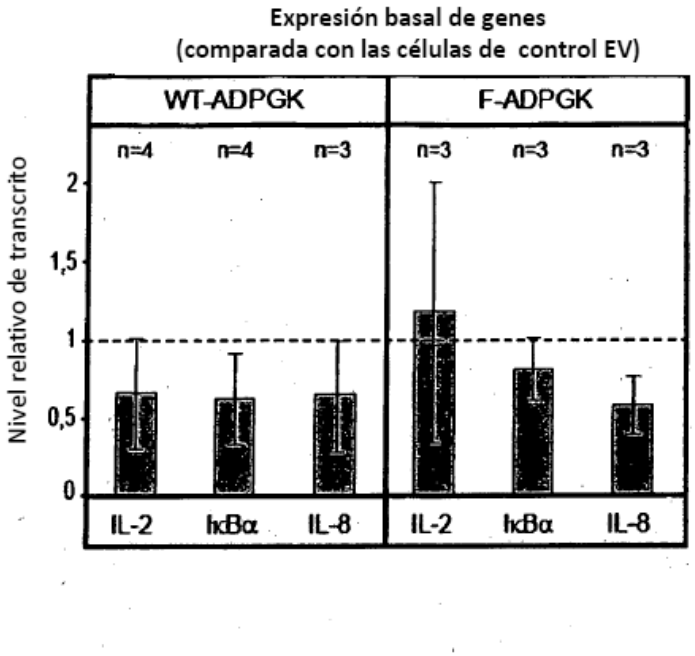
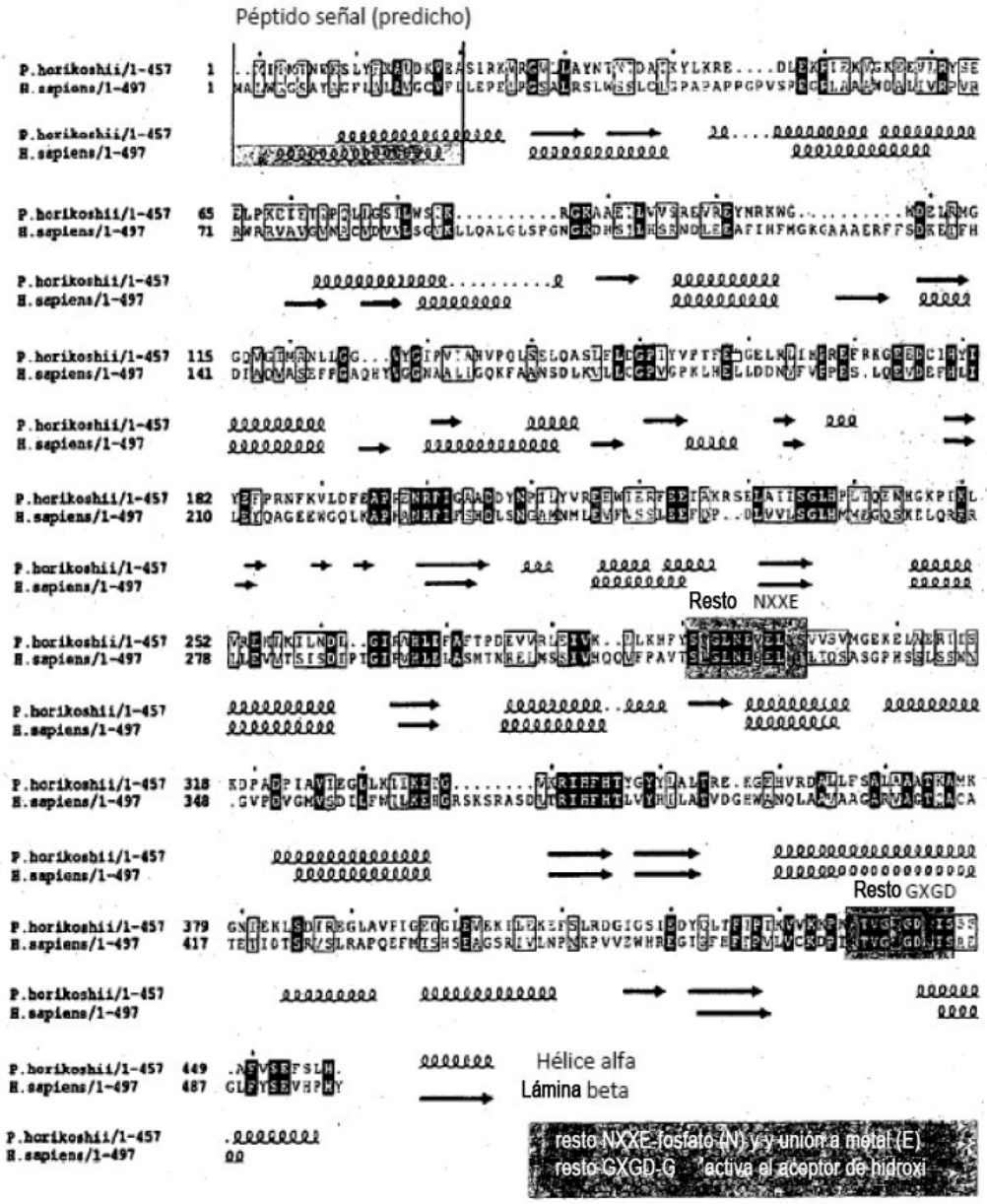

Expresión basal de genes
(comparada con las células de control EV)
WT-ADPGK
F-ADPGK
n=4
n=4
n=3
n=3
n=3
n=3
Nivel relativo de transcrito
2
1,5
1
0,5
0
IL-2
IκBα
IL-8
IL-2
IκBα
IL-8

Figura 14:


Péptido señal (predicho)
P.horikoshii/1-457
H.sapiens/1-497
Resto NXXE
Resto GXGD
Hélice alfa
Lámina beta
resto NXXE-fosfato-(N) y-y unión a metal (E)
resto GXGD-G activa el aceptor de hidroxi