



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA CINASA C ALFA POR ÁCIDO  
LISOFOSFATÍDICO REGULA LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR A  
PROGESTERONA EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
DOCTORA EN CIENCIAS

**PRESENTA**  
Q.B.C. SILVIA ANAHI VALDÉS RIVES

**DIRECTORA DE TESIS**  
DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**COMITÉ TUTOR**  
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DRA. MARTHA ROBLES FLORES  
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por otorgarme una beca para realizar mis estudios (582548).

Este trabajo fue apoyado por proyectos UNAM-PAPIIT IA200718 y IA201120.

Agradezco a la técnico académico del laboratorio la M. en C. Marisol de La Fuente Granada (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), al Dr. Miguel Tapia-Rodríguez (Unidad de Microscopia, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), al Biol. Salvador Ramírez Jiménez (Programa de Cáncer de mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), Dra. Valeria Hansberg-Pastor, M. en C. Gabriela Piña-Medina (Facultad de Química, UNAM) y Dr. Marcos García-Juárez (UATCINVESTAV) por su apoyo técnico.

A mi comité tutorial: Dr. Ignacio Camacho Arroyo y Dra. Martha Robles Flores por contribución a mi formación, así como su asesoramiento y contribución a este proyecto.

A mi jurado para el examen de grado: Dr. Jesús Adolfo García Sainz, Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez, Dra. Erika Patricia Rendón Huerta, Dra. Rocío Ángeles García Becerra por la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios.

## **DEDICATORIA**

A mi esposo, Sergio, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo y siempre. Por acompañarme en las buenas y por su paciencia, comprensión y consejos en las malas y su amor incondicional en las muy malas.

A mis padres, Silvia y Víctor, y a mis hermanos Víctor Manuel y María José, por apoyarme siempre aunque esto me mantuviera lejos de ellos por largos períodos de tiempo. A mi familia Rives por su apoyo y comprensión.

A mi mentora Aliesha por ser una increíble asesora y permitirme aprender y crecer como persona e investigadora. Espero algún día poder transmitir la pasión por la investigación como lo hizo conmigo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Isa, Rubí, Caro, Denisse, Marisol, Ireri, Sonia, Sandra, Gene, Eme y Juan por ser un gran equipo con el que trabajar y divertirse, no podría haber tenido mejores compañeros.



*“The morning will come again.  
No darkness, no season is eternal.”*

*Spring Day*

# Tabla de contenido

1	RESUMEN.....	12
2	ABSTRACT.....	13
3	ANTECEDENTES.....	14
3.1	Ácido lisofosfatídico.....	14
3.1.1	Síntesis y metabolismo del ácido lisofosfatídico.....	15
3.1.2	Receptores para LPA.....	18
3.1.2.1	<i>Familia de genes de diferenciación endotelial.....</i>	19
3.1.2.2	<i>Familia de genes de diferenciación no endotelial.....</i>	21
3.1.3	Efectos de los receptores EDG y no EDG en el cáncer.....	23
3.2	Tumores cerebrales.....	24
3.2.1	Astrocitomas.....	25
3.2.2	Glioblastoma multiforme.....	26
3.2.3	Subtipos de glioblastoma multiforme.....	28
3.3	Señalización del ácido lisofosfatídico en la progresión de glioblastomas ..	29
3.4	Proteína cinasa C.....	32
3.4.1	Proteína cinasa C $\alpha$ en glioblastoma.....	34
3.5	Receptor a progesterona.....	36
3.5.1	Mecanismo de acción.....	36
3.5.2	Receptor a progesterona en glioblastomas.....	37
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
5	JUSTIFICACIÓN.....	38
6	HIPÓTESIS.....	38
7	OBJETIVOS.....	38
7.1	Objetivo General.....	38
7.2	Objetivos Particulares.....	38
8	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
8.1	Cultivo celular y tratamientos.....	39
8.2	Fraccionamiento celular.....	39
8.3	Western Blot.....	40
8.4	Inmunofluorescencia.....	41
8.4.1	Cuantificación de PKC $\alpha$ en núcleo.....	42
8.5	Ensayo de viabilidad.....	43

8.6	Transfección celular con siRNA.....	43
8.7	Citometría de flujo.....	43
8.8	PLA (Proximity Ligation Assay) .....	44
8.9	Extracción de ARN y RT-qPCR.....	45
8.10	Análisis estadístico.....	46
9	RESULTADOS .....	46
9.1	Las líneas celulares derivadas de GBM expresan autotaxina y el receptor LPA <sub>1</sub> .....	46
9.2	Concentraciones bajas de LPA inducen la translocación nuclear de PKC $\alpha$ .....	47
9.3	El LPA no induce la translocación de PKC $\alpha$ a la membrana celular en las células de GBM.....	52
9.4	Ki16425 inhibe la translocación nuclear de PKC $\alpha$ en GBM .....	54
9.5	La vía de LPA/LPA <sub>1</sub> /PKC $\alpha$ induce la fosforilación del receptor de progesterona en el residuo serina 400 (S400).....	58
9.6	LPA induce la interacción de PKC $\alpha$ y el receptor a progesterona.....	60
9.7	LPA modula la expresión de VEGF pero no de EGFR en células de glioblastoma .....	62
9.8	La vía de LPA <sub>1</sub> /PKC $\alpha$ /RPPS400 se conserva en diversas líneas de glioblastoma .....	63
9.9	La inhibición de LPA <sub>1</sub> /PKC $\alpha$ impacta en el número de células en GBM .....	67
10	DISCUSIÓN.....	70
11	CONCLUSIONES.....	75
12	PERSPECTIVAS .....	76
13	REFERENCIAS .....	77
14	ANEXOS .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del LPA 18:1

Figura 2. Producción, metabolismo y señalización de LPA

Figura 3. Especies de LPA

Figura 4. Gliomas

Figura 5. Pseudopalisadas

Figura 6. Incremento en la expresión de ATX en tejido de GBM derivado de pacientes

Figura 7. Activación de la familia de PKC clásica

Figura 8. Las líneas celulares de glioblastoma expresan un alto contenido de Autotaxina y LPA<sub>1</sub>

Figura 9. TPA induce la translocación de PKC $\alpha$  al núcleo

Figura 10. LPA induce la translocación nuclear de PKC $\alpha$  en células de glioblastoma

Figura 11. Bajas concentraciones de LPA disminuye el contenido de PKC $\alpha$  en el citosol

Figura 12. Efecto en la localización de PKC $\alpha$  inducida por LPA a altas concentraciones

Figura 13. Translocación temporal de PKC $\alpha$  inducida por LPA y TPA en células de glioblastoma

Figura 14. Ki16425 antagoniza el efecto de LPA en la translocación nuclear de PKC $\alpha$

Figura 15. Efecto antagónico de Ki16425 en el contenido de PKC $\alpha$  citosólico inducido por LPA

Figura 16. Cuantificación de PKC $\alpha$  nuclear

Figura 17. Expresión de LPA<sub>3</sub> en líneas celulares de glioblastoma

Figura 18. LPA induce la fosforilación de RP (S400)

Figura 19. La inhibición con Ki16425 disminuyen la fosforilación del RP

Figura 20. LPA induce la interacción de PKC $\alpha$  y RP

Figura 21. LPA modula los niveles de ARNm de *VEGF* pero no *EGFR* en células de glioblastoma

Figura 22. LPA<sub>1</sub> media el efecto LPA en la translocación nuclear de PKC $\alpha$  en la línea LN229

Figura 23. Localización de RPPS400 en tres líneas celulares de glioblastoma

Figura 24. El bloqueo de LPA<sub>1</sub> impacta en el número de células en líneas celulares de glioblastoma

## ÍNDICE DE FIGURAS (continuación)

Figura 25. El bloqueo de LPA<sub>1</sub> y PKC $\alpha$  reduce el número de células en líneas celulares de glioblastoma

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las isoenzimas PKC

## ABREVIATURAS

AC	Adenilato Ciclasa
AKT	Proteína Cinasa B
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
AP1	Proteína Activadora 1
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ATX	Autoxina
BUS	Segmento Río Arriba de B
CD68	Cúmulo de Diferenciación 68
CDKN2A	Inhibidor de Cinasa Dependiente de Ciclina 2A
CHI3L1	Proteína 1 Tipo Quitanasa
CMC	Concentración Micelar Crítica
COX-2	Ciclooxigenasa-2
cPLA2	Fosfolipasa A2 Citosólica
CREB	Proteína de Unión A Elementos de Respuesta AMP Cíclica
DAG	Diacilglicerol
EDG	Genes De Diferenciación Endotelial
EGFR	Receptor Del Factor De Crecimiento Endotelial
EGFRvIII	Receptor Del Factor De Crecimiento Endotelial Variante III
ERP	Elementos De Respuesta A Progesterona
GABRA1	Subunidad Alfa-1 Del Receptor Del Ácido Gamma-Aminobutírico
GBM	Glioblastoma
GPCRs	Receptores Acoplados A Proteínas G
Hsp90	Proteína De Choque Térmico 90
IDH1	Isocitrato Deshidrogenasa 1
LPA	Ácido Lisofosfatídico
LPAAT	Lisofosfatidil Aciltransferasa
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
LPP1	Fosfohidrolasa de Lípidos de Tipo 1
LPS	Lisofosfatidilserina
MAG	Monoacilglicerol
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
MET	Receptor de Tirosina Cinasa MET
MMP2	Metaloproteasa 2
mTOR	Blanco de la Rapamicina en Células de Mamífero
NEFL	Polipéptido Ligero De Neurofilamento
NF1	Neurofibromatosis 1
NF $\kappa$ B	Factor Nuclear Kappa-Polipéptido en Células B
OLIG2	Factor de Transcripción de Oligodendrocitos
OMS	Organización Mundial de la Salud
P4	Progesterona
PA	Ácido Fosfatídico
PARP	Poli ADP Ribosa Polimerasa
PC	Fosfatidilcolina
PDGFRA	Factor Crecimiento Derivado de Plaquetas A
PE	Fosfatidiletanolamina
PGR	Gen del Receptor a Progesterona
PI3K	Fosfatidilinositol- 3-Cinasa
PIBF	Factor De Bloqueo Inducido Por Progesterona
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfato 3-Cinasa, Subunidad Catalítica Alfa
PIK3R1	Subunidad Reguladora Alfa De La Fosfatidilinositol 3-Cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-Bisfosfato
PKA	Proteína Cinasa A
PKB	Proteína Cinasa B; AKT

## ABREVIATURAS (continuación)

PKC	Proteínas Cinasas C
PKD-1	Enfermedad Renal Policistina-1
PLA	Fosfolipasa A
PLA	Proximity Ligation Assay; Ensayo de Ligación por Proximidad
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PS	Fosfatidilserina
PTEN	Homólogo de Fosfatasa y Tensina
PTPRC	Receptor de Proteína Tirosina Fosfatasa Tipo C
RP	Receptor a Progesterona
RP-A	Receptor a Progesterona Isoforma A
RP-B	Receptor a Progesterona Isoforma B
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa
SHH	Sonic Hedgehog
SHR	Familia de Receptores Esteroides
siRNA	Pequeño ARN Interferente
SLC12A5	Miembro Transportador de Potasio-Cloruro de 5
SNC	Sistema Nervioso Central
sPLA2	Fosfolipasa A2 Secretada
SRC-1	Coactivador de Receptor Esteroideo 1
SYT1	Sinaptotagmina 1
TNF	Factor De Necrosis Tumoral
TP53	Proteína Tumoral 53
TPA	Éster de Forbol 12-O-Tetradecanoilforbol-13-Acetato
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular



## 1 RESUMEN

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un lisofosfolípido ubicuo que induce una amplia variedad de procesos celulares, como la diferenciación, la proliferación, la migración y la supervivencia. La señalización de LPA aumenta en varios tipos de cáncer. En el glioblastoma (GBM), el tumor cerebral más agresivo, la autotaxina (ATX), la enzima que produce LPA y su receptor LPA<sub>1</sub>, están sobre expresadas. Estudios sugieren que LPA<sub>1</sub> se une preferentemente a las proteínas Gα<sub>q</sub> en estos tumores que a su vez activan a las Proteínas Cinasas C (PKC). Las PKC están involucradas en muchos procesos en cáncer, incluyendo la proliferación y la metástasis a través de diversas proteínas blanco como el receptor a progesterona (RP). En GBM, nuestro laboratorio ha demostrado que PKC es capaz de fosforilar al RP induciendo su actividad transcripcional y modulando procesos como proliferación y migración. En este estudio, nuestro objetivo fue determinar el papel de una PKC clásica (isozima α) activada a través de LPA<sub>1</sub> en líneas celulares derivadas de GBM y como dicha activación induce la fosforilación del RP y a su vez incrementa la expresión de genes blanco del RP como *VEGF* y *EGFR*. Encontramos que LPA<sub>1</sub> induce la translocación de PKCα al núcleo después del tratamiento con LPA y que la activación de PKCα induce la fosforilación de RP en el residuo S400. La activación del RP por LPA<sub>1</sub> incrementa la expresión de *VEGF* y el número de células disminuye cuando se bloqueó la señalización de LPA<sub>1</sub>/PKCα, lo que sugiere un papel relevante de LPA<sub>1</sub>/PKCα/RP en el crecimiento de GBM.

## 2 ABSTRACT

Lysophosphatidic acid (LPA) is a ubiquitous lysophospholipid that induces a wide variety of cellular processes, including differentiation, proliferation, migration, and survival. LPA signaling increases in several types of cancer. In glioblastoma (GBM), the most aggressive brain tumor, autotaxin (ATX), the enzyme that produces LPA, and its receptor LPA<sub>1</sub> are over-expressed. Studies suggest that LPA<sub>1</sub> preferentially binds to Gαq proteins in these tumors, which activates PKCs. PKCs are involved in many processes in cancer, including proliferation and metastasis through various target proteins such as the progesterone receptor (PR). In GBM, our laboratory has shown that PKC is capable of phosphorylating PR by inducing its transcriptional activity and modulating processes such as proliferation and migration. In this study, our objective was to determine the activation of a classical PKC (α-isozyme) through LPA<sub>1</sub> in GBM cell lines and the role of its activation in PR phosphorylation and the increase the expression of PR target genes such as *VEGF* and *EGFR*. We found that LPA<sub>1</sub> induces translocation of PKCα to the nucleus after LPA treatment and that PKCα activation induces phosphorylation of PR at residue S400. Activation of PR by LPA<sub>1</sub> increases *VEGF* expression and cell number decreases when LPA<sub>1</sub> / PKCα signaling is blocked, suggesting a relevant role for LPA<sub>1</sub> / PKCα / PR in GBM growth.

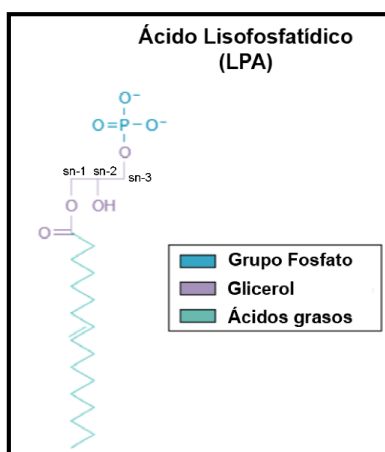
### 3 ANTECEDENTES

#### 3.1 Ácido lisofosfatídico

El ácido lisofosfatídico (LPA) consiste en una cadena de acilo en la posición sn-1 (o sn-2) de un esqueleto de glicerol y un grupo fosfato (Figura 1). Es el lisofosfolípido más pequeño con un peso molecular que varía entre los 430 y 480 Da; además es el lisofosfolípido bioactivo más simple derivado de los fosfolípidos de membrana (Bandoh et al., 2000; Moolenaar, 2000) y está involucrado en una amplia gama de actividades, desde la síntesis de fosfolípidos hasta respuestas fisiológicas como el cierre de herida y remodelación vascular (Moolenaar et al., 2004).

El LPA activa al menos seis receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), denominados LPA<sub>1-6</sub>, que estimulan diferentes vías de señalización a través de proteínas G heterotriméricas como G $\alpha_{i/0}$ , G $\alpha_{12/13}$ , G $\alpha_{q/11}$  y G $\alpha_s$ . El resultado de la señalización de LPA depende del contexto celular y contribuye en los procesos celulares como la migración, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia, por nombrar algunos (Gonzalez-Gil et al., 2015).

Debido a su estructura pequeña, el LPA es soluble en agua y se han reportado concentraciones > 5 $\mu$ M en suero; así como concentraciones < 1 $\mu$ M en otros fluidos biológicos como el plasma, la saliva, el líquido folicular y el líquido cefalorraquídeo (Choi & Chun, 2013; Mills & Moolenaar, 2003; Yung et al., 2014).



**Figura 1. Estructura del LPA 18:1.** En azul cielo se denota el grupo fosfato, en morado la columna de glicerol y en verde la cadena de ácidos grasos. Tomado y modificado (Mills & Moolenaar, 2003), [Licencia de Atribución Creative Commons / dominio público].

### 3.1.1 Síntesis y metabolismo del ácido lisofosfatídico

El LPA es un lisofosfolípido derivado de fosfolípidos de membrana como la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina (PE) (Yung et al., 2014). Por lo tanto, se pueden encontrar varias especies de LPA que difieren sólo en la longitud y saturación de la cadena de ácidos grasos (C. Pagès et al., 2001; Yung et al., 2014). Las especies más abundantes de LPA en suero son 18:2 > 18:1 ≥ 18:0 > 16:0 > 20:4 con un grupo acilo (Baker et al., 2001; Sano et al., 2002). Aunque acil-LPA18:2 es la especie más abundante, acil-LPA 18:1 es la más utilizada en la investigación (Choi et al., 2010).

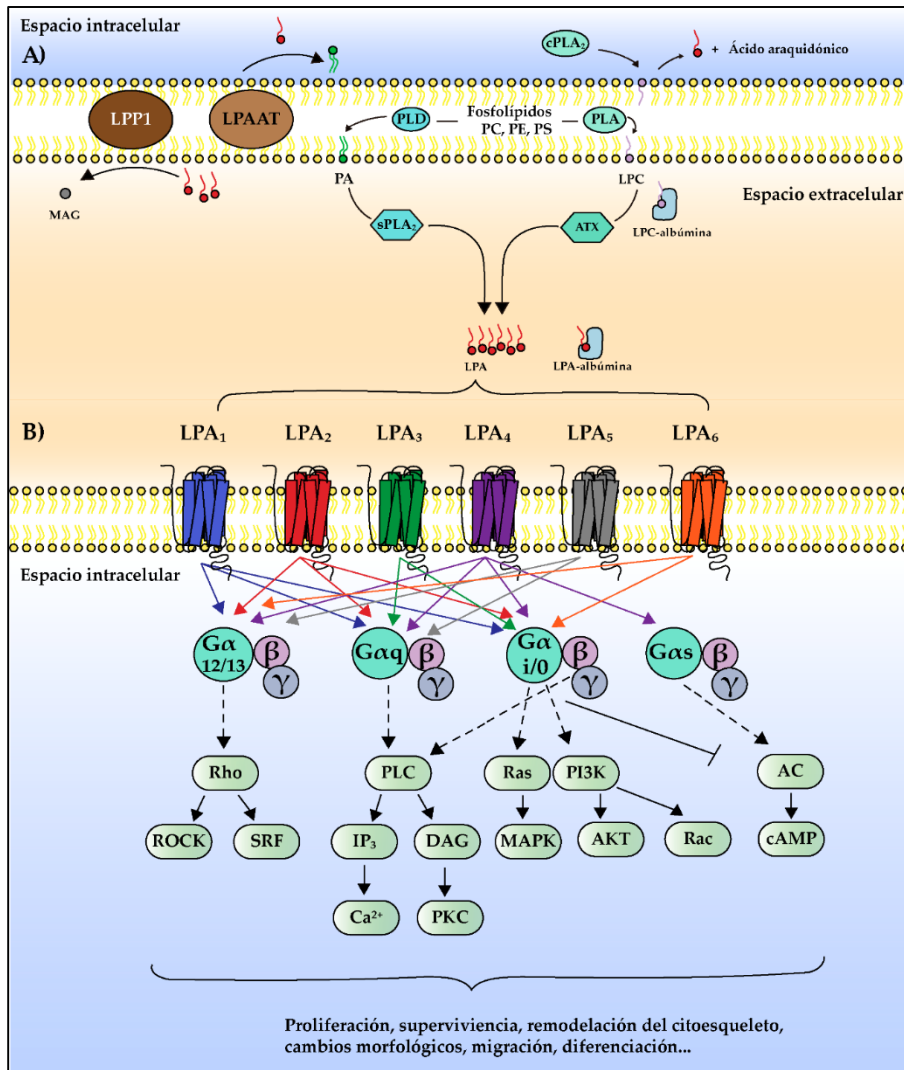
Hay dos vías principales para la producción de LPA (Figura 2A). La vía más importante es la escisión de fosfolípidos de membrana en lisofosfolípidos mediante la eliminación de una cadena de ácido graso por la fosfolipasa A (PLA<sub>1</sub> o PLA<sub>2</sub>). Posteriormente, la autotaxina (ATX) escinde el grupo de la cabeza (colina, etanolamina o serina) en los lisofosfolípidos y los convierte en LPA (Aoki et al., 2008). ATX (codificada por el gen *Enpp2*) es una enzima secretada de 125 kDa de la familia de las pirofosfatasas / fosfodiesterasas de ectonucleótidos (Revisión por (Perrakis & Moolenaar, 2014)) ubicada en el Chr8q24 (Kawagoe et al., 1995). Entre los siete miembros de esta familia, ATX es la única enzima que presenta actividad de lisofosfolipasa D (Tokumura et al., 2002; Umezu-Goto et al., 2002). La expresión más abundante de ARNm de ATX se encuentra en el cerebro, la médula espinal, los ovarios, los pulmones, los intestinos y los riñones (Perrakis & Moolenaar, 2014). La actividad de ATX es, por lo general, local más que sistémica, aunque la enzima circulante ayuda a mantener los niveles en sangre de LPA. Sin embargo, tiene una vida media corta ya que es rápidamente metabolizada por el hígado (Perrakis & Moolenaar, 2014).

Esta enzima produce la mayor proporción del LPA extracelular. Los ratones heterocigotos nulos para ATX *Enpp2*<sup>+/-</sup> y los inhibidores dirigidos a ATX disminuyen la concentración plasmática de LPA en más de 50% (Benesch et al., 2014; Dusaulcy et al., 2011; Tanaka et al., 2006; Van Meeteren et al., 2006). La ATX también genera LPA de lisofosfatidilcolina (LPC) circulante unida a la albúmina (Zhang et al., 2009). Además, esta enzima es esencial para el desarrollo embrionario ya que en ratones el genotipo *Enpp2*<sup>-/-</sup> es letal en el día embrionario 9.5-10.5, con prominentes defectos vasculares y del tubo neural (Tanaka et al., 2006; Van Meeteren et al., 2006). La ATX también es importante en la adipogénesis, ya que se regula a la alza durante la diferenciación de los pre-adipocitos a adipocitos y esta enzima es, a su vez, secretada a la circulación por el tejido adiposo (Ferry et al., 2003).

Una segunda ruta de producción de LPA es la escisión de fosfolípidos en ácido fosfatídico (PA) por la fosfolipasa D (PLD) en la superficie de la membrana celular. Posteriormente, el PA se hidroliza en la parte externa de la membrana plasmática mediante PLA<sub>2</sub> secretada (sPLA<sub>2</sub>) que libera LPA al microambiente (Perrakis & Moolenaar, 2014).

El LPA tiene una vida media de aproximadamente 3 minutos en la circulación (Albers et al., 2010). Por lo tanto, sus efectos principales son autocrinos y, cuando se une a la albúmina, paracrinos (C. Pagès et al., 2001). La concentración de LPA está regulada por la biodisponibilidad de ATX, lisofosfolípidos (por ejemplo, LPC), proteínas de unión a LPA (como albúmina) y su degradación por fosfatasas de lípidos. La fosfohidrolasa de lípidos de tipo 1 (LPP<sub>1</sub>) hidroliza el LPA en monoacilglicerol (MAG) en la parte externa de la membrana celular (Tang et al., 2015; Tomsig et al., 2009) y la lisofosfatidil aciltransferasa (LPAAT), transfiere una cadena de acilo a la molécula de LPA convirtiéndolo en PA en la cara interna de la membrana celular (C. Pagès et al., 2001).

Recientemente, se ha descrito un probable eje de retroalimentación negativa para la vía ATX-LPA (Benesch et al., 2015); en este mecanismo, la señalización de LPA a través de sus receptores LPA<sub>1/3</sub> induce la regulación negativa del ARNm de ATX. De manera similar, los niveles bajos de LPA circulante aumentan el ARNm de ATX, particularmente en el tejido adiposo de ratones Balb/c hembra (Benesch et al., 2015).



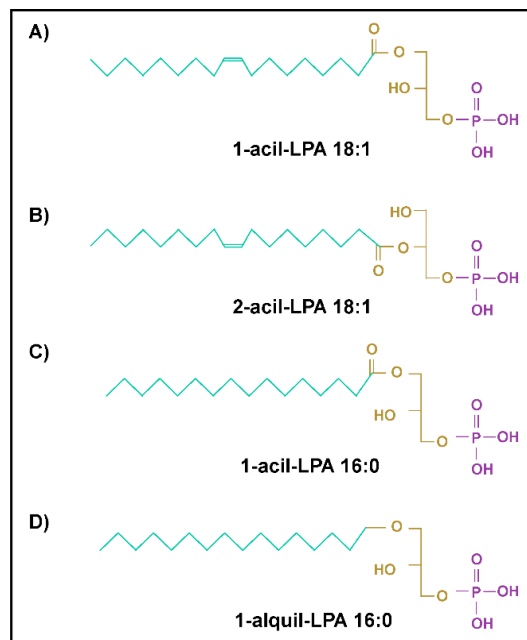
**Figura 2. Producción, metabolismo y señalización de LPA.** A) Las especies de LPA se derivan de fosfolípidos de membrana. PLA<sub>1</sub> elimina una cadena de ácido graso de PC, PE o PS convirtiéndolos en lisofosfolípidos. Luego, ATX elimina el grupo principal de LPC << LPE < LPS y produce LPA. La LPC puede derivar de la membrana celular o de LPC circulante unida a la albúmina. El LPA también puede producirse intracelularmente por cPLA<sub>2</sub> de LPC que produce LPA y ácido araquidónico. Por otro lado, la PLD puede eliminar el grupo de principal de los fosfolípidos de la membrana y producir PA. Después, sPLA<sub>2</sub> elimina una cadena de ácido graso de PA produciendo LPA. Dos enzimas metabolizan LPA, LPP1 en la parte externa de la membrana hidrolizando al LPA en MAG y LPAAT, la cual transfiere una cadena de acilo a LPA en la cara interna de la membrana produciendo PA. B) El LPA señala a través de al menos seis GPCRS (LPA<sub>1-6</sub>) que se acoplan a diferentes proteínas Gα para inducir la activación de Rho, PLC, Ras, PI3K y adenilato ciclasa (AC), lo cual media diversos procesos que dependen del tipo celular y del contexto. Esta figura se reprodujo y modificó de (Valdés-Rives & González-Arenas, 2017), [Licencia de Atribución Creative Commons / dominio público].

### 3.1.2 Receptores para LPA

Como se mencionó anteriormente, el LPA señala a través de al menos seis GPCRs: LPA<sub>1-6</sub> (Figura 2B), los genes se denominan *LPAR1-LPAR6* (humano) y *Lpar1-Lpar6* (ratón) (Chun et al., 2010; Kihara et al., 2014). Todos los receptores para LPA son similares a la rodopsina, con siete dominios transmembranales, que varían de 39 a 42 kDa y difieren en su distribución tisular y cascadas de señalización (Yung et al., 2014).

De acuerdo con su homología, hay dos familias de receptores a LPA. La primer familia está conformada por los genes de diferenciación endotelial (EDG), denominados así ya que el primer miembro de esta familia se clono de células endoteliales que se diferenciaron a estructuras tipo capilares con esteroides de forbol (Hla & Maciag, 1990). La segunda familia de receptores se denominan no EDG debido a su pobre homología con el primer grupo (Takuwa et al., 2002; Yanagida et al., 2013).

Además de la homología, los receptores difieren en su activación por diferentes especies de LPA (Figura 3). Aunque el 2-acil-LPA (18:2) es la especie más abundante, la familia EDG es estimulada con mayor potencia por el acil-LPA (18:1) (LPA<sub>1/2</sub>) (Figura 3A), mientras que el LPA<sub>3</sub> se une preferentemente al 2-acil-LPA (18:2). El miembro de la familia no EDG LPA<sub>5</sub> es potentemente estimulado por alquil-LPA (16:0). Por otro lado, el LPA<sub>6</sub> señala preferentemente con 2-acil-LPA (18:2) (Yanagida et al., 2013). Estas diferencias muestran que una amplia gama de efectos fisiológicos se modulan a través de estos receptores y de las especies de LPA de manera dependiente del contexto y del tipo celular.



**Figura 3. Especies de LPA.** El LPA se deriva de fosfolípidos con diferentes longitudes y saturaciones. A) Una especie de LPA de 18 carbonos con un grupo acilo en la posición sn-1 y una saturación, es el activador más potente de los receptores LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>2</sub> (Yung et al., 2014). B) El acil-LPA con 18 carbonos, una saturación y la cadena de ácido graso en la posición sn-2 es el activador más potente de LPA<sub>3</sub> y LPA<sub>6</sub> (Bandoh et al., 2000; Williams et al., 2009). C) Una especie alquil-LPA con 16 carbonos y sin saturaciones es el activador más potente del receptor LPA<sub>5</sub> (Yanagida et al., 2013). Esta figura se reprodujo y modificó de (Valdés-Rives & González-Arenas, 2017), [bajo el Licencia de Atribución Creative Commons / dominio público].

### 3.1.2.1 Familia de genes de diferenciación endotelial

En 1996, LPA<sub>1</sub> fue el primer receptor identificado y es el mejor estudiado hasta la fecha. Hecht y colaboradores (Hecht et al., 1996) describieron una línea celular de neuroblastos que sobre expresaba el receptor del gen 1 de la zona ventricular (*Vgz-1*), al cual el LPA se une específicamente para inducir el redondeo celular y la activación de Gα<sub>i</sub>. Este receptor también es conocido como EDG-2. *Vgz-1* fue posteriormente renombrado como LPA<sub>1</sub>. Después de su descubrimiento, se identificaron otros dos receptores huérfanos de la familia EDG y se renombraron LPA<sub>2</sub> y LPA<sub>3</sub> de acuerdo con su homología con LPA<sub>1</sub> (An et al., 1998; Bandoh et al., 1999; Im et al., 2000).

El LPA<sub>1</sub> es una proteína de 41 kDa y 364 aminoácidos cuya información está codificada en el cromosoma 9 (Chr9q31.3) con al menos 5 exones (Chun et al., 2010; Kihara et al., 2014).



Este receptor acopla y activa 3 tipos de proteína G:  $G\alpha_{i/0}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  y  $G\alpha_{12/13}$  que señalizan a través de PI3K/AKT, Rho, MAPK y PLC (Figura 2B). Estas vías están involucradas en varios procesos celulares, que incluyen la proliferación y supervivencia celular, la adhesión, la migración, la inhibición de la AC y la movilización de  $Ca^{2+}$  (Chun et al., 2010; Contos, Ishii, et al., 2000). Se expresa ampliamente en la mayoría de los tejidos como el cerebro, el útero, los testículos, los pulmones, el intestino delgado, el corazón, el estómago, los riñones, el bazo, el timo y el músculo esquelético en diferentes etapas de desarrollo con una expresión variable, particularmente en el sistema nervioso central (SNC) (An et al., 1998; Contos, Ishii, et al., 2000), donde, durante el desarrollo, el  $LPA_1$  se encuentra en la zona ventricular, la zona marginal superficial y las meninges. Después del nacimiento, la expresión de  $LPA_1$  se reduce en las áreas mencionadas y continúa en los oligodendrocitos, particularmente durante la mielinización, así como en los astrocitos donde contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno, remodelación del citoesqueleto, entre otros procesos (Yung et al., 2015). El genotipo  $Lpar1^{-/-}$  en ratones mostró un 50% de letalidad perinatal relacionada con problemas en la succión de leche materna, probablemente debido a un olfato defectuoso. Los ratones supervivientes mostraron malformaciones craneofaciales y tamaño corporal reducido (Contos, Fukushima, et al., 2000). Además,  $LPA_1$  se ha relacionado estrechamente con la inducción de dolor neuropático debido a una lesión nerviosa a través de la desmielinización mediada por  $LPA_1$ /RhoA/Rock con subsecuente pérdida de la integridad estructural y funcional de las neuronas (Ueda et al., 2013).

El receptor  $LPA_2$  (EDG-4) tiene homología del ~ 50-60% con  $LPA_1$ , con una masa estimada de 39 kDa y 348 aminoácidos (An et al., 1998). La información de dicho gen esta codificada en el cromosoma 19 (Chr19p12) consta de 3 exones tanto en humanos como en ratones (Contos, Ishii, et al., 2000; Kihara et al., 2014). El  $LPA_2$  se acopla a las mismas proteínas G que  $LPA_1$  (Figura 2B):  $G\alpha_{i/0}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  y  $G\alpha_{12/13}$  (An et al., 1998; Contos, Ishii, et al., 2000); por lo tanto, puede señalizar de manera similar, pero a diferencia de  $LPA_1$ , también puede promover la migración a través de la molécula de adhesión focal TRIP6 (Lai et al., 2005, 2007). La activación de  $LPA_2$  está asociada con la supervivencia y la migración. En comparación con  $LPA_1$ , su expresión es más difusa durante el desarrollo, más restringida en adultos y con alta expresión en leucocitos y testículos en humanos, y en riñón, útero y testículos en ratones (An et al., 1998; Contos, Ishii, et al., 2000; Ohuchi et al., 2008). Los ratones knockout para  $LPA_2$  son en su mayoría normales, lo que sugiere una posible redundancia funcional en relación con  $LPA_1$ . También se ha evaluado un modelo  $Lpar1^{-/-}$  y  $Lpar2^{-/-}$  (Contos et al., 2002). En este modelo, el fenotipo  $Lpar1^{-/-}$  predominó con un 50% de

letalidad perinatal, sin embargo este modelo también exhibió hematomas frontales (Contos et al., 2002).

El receptor LPA<sub>3</sub> (EDG-7) contiene 3 exones, tiene 353 aminoácidos y una masa estimada de 40 kDa (Bandoh et al., 1999; Im et al., 2000). Este receptor tiene homología del 52% y del 48% con LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>2</sub>, respectivamente. Su información está codificada en el cromosoma 1 (Chr1p22.3-p31.1) (Contos, Ishii, et al., 2000; Im et al., 2000; Kihara et al., 2014). LPA<sub>3</sub> se acopla a las proteínas G: G $\alpha_{i/0}$  y G $\alpha_{q/11}$  (Figura 2B), y por lo tanto media la activación de MAPK, PLC y la inactivación de la AC (Ishii et al., 2000). Se ha reportado que este receptor es activado más potentemente por 2-acil-LPA con ácidos grasos insaturados (Bandoh et al., 2000). En los seres humanos, el receptor LPA<sub>3</sub> se expresa en el corazón, pulmón, páncreas, próstata, testículos, ovarios y cerebro (Bandoh et al., 1999). En ratones, se expresa en testículos, riñón, pulmón e intestino, y moderadamente, en intestino delgado (Contos, Ishii, et al., 2000). La eliminación funcional de LPA<sub>3</sub> en ratones hembra mostró implantación embrionaria retrasada y defectuosa a través de la regulación negativa de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y niveles reducidos de prostaglandinas, que son esenciales para este proceso (Ye et al., 2005). En ratones machos deficientes en los receptores LPA<sub>1-3</sub>, se encontró actividad de apareamiento reducida y un bajo conteo de espermatozoides independiente de la señalización de testosterona (Ye et al., 2008). Esta evidencia sugiere un papel de LPA<sub>3</sub> en las funciones reproductivas.

### **3.1.2.2 Familia de genes de diferenciación no endotelial**

En 2003, se describieron los primeros receptores LPA estructuralmente distantes de la familia de receptores EDG (Noguchi et al., 2003). El GPCR huérfano P2Y9/GPR23 tiene sólo del 20-24% de homología con LPA<sub>1-3</sub>, pero se une específicamente a LPA. Su señalización promueve un aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular y en la actividad de la AC en las células “sin receptores para LPA” que expresaban P2Y9 de manera exógena (Noguchi et al., 2003). Después de este descubrimiento, siguió la descripción de LPA<sub>5</sub> y LPA<sub>6</sub> (Kotarsky et al., 2006; C.-W. Lee et al., 2006; M. Lee et al., 2009; Pasternack et al., 2008; Yanagida et al., 2009).

El receptor LPA<sub>4</sub> (P2Y9 / GPR23) está codificado por 1 exón que contiene 370 aminoácidos con una masa de 42 kDa (Janssens et al., 1997; Kihara et al., 2014; Noguchi et al., 2003). Su información está codificada en el cromosoma X (ChrXq21.1), es el único receptor de

LPA descrito que se acopla a cuatro proteínas G:  $G\alpha_{i/0}$ ,  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{12/13}$  y  $G\alpha_s$  (Figura 2B) (C.-W. Lee et al., 2007). La señalización de LPA<sub>4</sub> promueve la retracción de neuritas mediada por Rho y la formación de fibras de estrés, la movilización de  $Ca^{2+}$  y la regulación de la concentración de AMPc (C.-W. Lee et al., 2007). En humanos, la expresión de LPA<sub>4</sub> es alta en ovarios, moderada en timo y páncreas, y baja en cerebro, corazón, intestino delgado, testículo, próstata, colon y bazo (Choi et al., 2010; Noguchi et al., 2003). En ratones, se expresa en el corazón, los ovarios, el timo, la piel y el cerebro durante el desarrollo (C.-W. Lee et al., 2007; Z. Lee et al., 2008). Los ratones *Lpar4*<sup>-/-</sup> no mostraron ninguna anomalía aparente, pero hubo una letalidad del 30%, probablemente debido a defectos en los vasos sanguíneos durante la embriogénesis (Z. Lee et al., 2008; Sumida et al., 2010).

El LPA<sub>5</sub> (GPR92) es una proteína de 41 kDa que consta de 372 aminoácidos codificados en un marco de lectura abierto sin intrón (Kotarsky et al., 2006; C.-W. Lee et al., 2006). Este receptor se encuentra codificado en el cromosoma 12 (Chr12p13.31) y tiene una homología del 35% con LPA<sub>4</sub> (Kotarsky et al., 2006; C.-W. Lee et al., 2006). LPA<sub>5</sub> se acopla a 2 proteínas G:  $G\alpha_{q/11}$ , y  $G\alpha_{12/13}$  (Figura 2B), por medio de la cual se induce la movilización de  $Ca^{2+}$ , la producción de fosfato de inositol, la retracción de neuritas y la formación de fibras de estrés (Kotarsky et al., 2006; C.-W. Lee et al., 2006). Se ha reportado de que el LPA<sub>5</sub> se une preferentemente a alquil-LPA (16: 0), en lugar de acil-LPA (18:1) (Yanagida et al., 2013). LPA<sub>5</sub> se encuentra en el corazón, la placenta, el bazo, el cerebro, los pulmones y el intestino en los seres humanos (Kotarsky et al., 2006). También está altamente expresado en linfocitos del tracto gastrointestinal y las plaquetas (Amisten et al., 2008; Kotarsky et al., 2006). En ratones, se encuentra en el cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo, piel, bazo, estómago, intestino delgado, testículo y timo (C.-W. Lee et al., 2006). Los ratones *Lpar5*<sup>-/-</sup> no tienen defectos fenotípicos aparentes, pero muestran sensibilidad reducida al dolor, recuperación más rápida de la inflamación y reducción en la exploración social (Callaerts-Vegh et al., 2012; Lin et al., 2012). También exhiben hiperactividad y ansiedad nocturna en comparación con los ratones *Lpar5*<sup>+/+</sup> (Callaerts-Vegh et al., 2012). Además, se demostró que ratones knockout tienen protección contra el desarrollo de dolor neuropático por un mecanismo diferente al inducido por LPA<sub>1</sub> (Lin et al., 2012).

El LPA<sub>6</sub> (P2Y5) es el receptor de LPA identificado más recientemente y el último aceptado por el Comité de Nomenclatura IUPHAR en 2010 (Chun et al., 2010; Liu et al., 2009; Yanagida et al., 2009). Es una proteína de 344 aminoácidos con masa estimada de 39 kDa (Kihara et al., 2014). En cuanto a la homología con LPA<sub>4</sub> (Noguchi et al., 2003), es el

receptor más cercano y su información esta codificada en el cromosoma 13 (Chr13q14) (Kihara et al., 2014; Pasternack et al., 2008). LPA<sub>6</sub> se acopla a Gα<sub>i/0</sub> y Gα<sub>12/13</sub> (Figura 2B), por lo que se media una disminución en el AMPc, cambios morfológicos dependientes de Rho, movilización de Ca<sup>2+</sup> y la activación de MAPK (M. Lee et al., 2009; Yanagida et al., 2009). También se ha reportado que el LPA<sub>6</sub> se activa preferentemente por 2-acil-LPA, en lugar de 1-acil-LPA (Yanagida et al., 2009). Este receptor se ha encontrado en el cerebro, corazón, pulmón, riñón, páncreas, hígado, estómago, intestino delgado y grueso de ratas (M. Lee et al., 2009). En humanos, se ha relacionado con el crecimiento del cabello desde que se encontró una mutación de *LPAR6* en pacientes con hipotricosis simple, un trastorno que causa alopecia (Pasternack et al., 2008).

### 3.1.3 Efectos de los receptores EDG y no EDG en el cáncer

Debido a los primeros hallazgos con respecto a los receptores EDG y no EDG en el contexto de cáncer se especulaba que mientras los primeros promovían la progresión tumoral los receptores no EDG tenían un efecto opuesto; sin embargo al acumularse la evidencia se observa que los efectos de la familia de receptores a LPA dependen del contexto celular (Yung et al., 2014).

La reconstitución de *Lpar4* en fibroblastos embrionarios derivados de ratones *Lpar4*<sup>-/-</sup> reduce la motilidad celular debido a la disminución de la activación de Rac inducida por LPA (Z. Lee et al., 2008). Además, la expresión de LPA<sub>4</sub> en células de cáncer de colon (DLD1 y HTC116) suprime la migración celular y la invasión en comparación con las células que no expresan LPA<sub>4</sub> (Z. Lee et al., 2008; Takahashi et al., 2017). De manera similar, en células de sarcoma de rata, la sobreexpresión de *Lpar5* redujo significativamente la motilidad y suprimió la activación de la metaloproteasa 2 (MMP2). Por otro lado, la baja expresión de *Lpar5* indujo el efecto opuesto (Araki et al., 2014). En células de melanoma de ratones B16F10, LPA<sub>5</sub> redujo la migración a través de una vía dependiente de AMPc/PKA e indujo quimio repulsión en lugar de quimio atracción a través de LPA, es decir las células son repelidas del microambiente mediante este lisofosfolípido en lugar de ser atraídas (Jongsma et al., 2011). Además, en las células de cáncer de colon, DLD1 y HCT116, la expresión de LPA<sub>6</sub> redujo significativamente la motilidad y el crecimiento celular (Takahashi et al., 2017).

En el adenocarcinoma de pulmón de rata, la pérdida de LPA<sub>3</sub> debido a la metilación del promotor aumenta la progresión del tumor al incrementar la invasión, lo que sugiere un papel protector de LPA<sub>3</sub> en esta neoplasia (Hayashi et al., 2011). Por el contrario, en el

fibrosarcoma humano, se demostró que el LPA<sub>4</sub> aumenta los niveles de AMPc y posteriormente activa Rac1 para inducir invadópodos, un proceso directamente relacionado con la invasión y la metástasis (Harper et al., 2010). Además, en el carcinoma de pulmón de rata, el LPA<sub>5</sub> se expresa en gran medida debido a la desmetilación del promotor, y las células que expresan únicamente LPA<sub>5</sub> mostraron una proliferación, migración e invasión aumentadas (Okabe et al., 2011). Asimismo, las células de carcinoma hepatocelular que sobre expresan LPA<sub>6</sub> mantienen un aumento en el crecimiento, la migración y la invasión de tumores. Conjuntamente, la expresión de LPA<sub>6</sub> se asoció con peor pronóstico clínico en estos pacientes (Mazzocca et al., 2015).

En resumen, los receptores de LPA pueden tener efectos homólogos y antagónicos dependiendo del tumor. Por lo tanto, deben estudiarse en un contexto específico de cáncer para evaluar mejor su papel en el desarrollo y progresión de tumores, así como su valor terapéutico potencial.

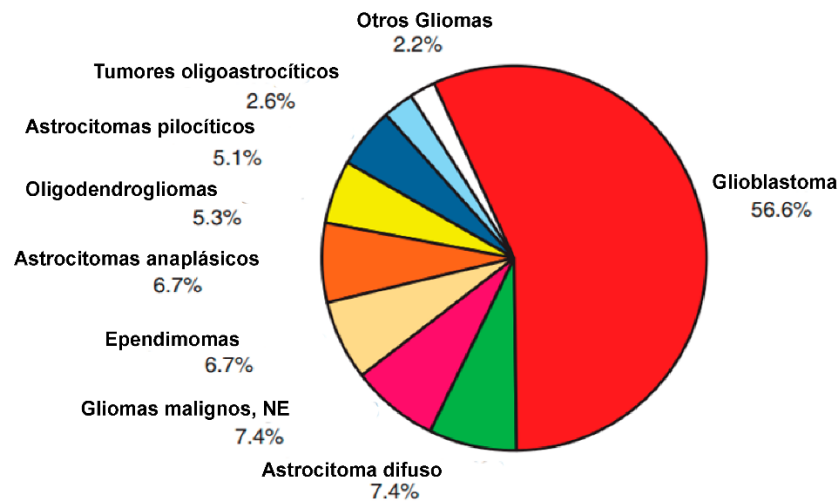
### **3.2 Tumores cerebrales**

La incidencia de tumores cerebrales, primarios o metastásicos, depende del género, edad y factores genéticos (López-González & Sotelo, 2000). A diferencia de otros tipos de cáncer, los tumores cerebrales y del SNC no son estratificados por estadios. Estos tumores se clasifican por grados (del I al IV) de acuerdo a los establecido por la OMS en la *Clasificación de tumores del sistema nervioso central* publicada en el 2007 y su posterior revisión en 2016, la cual asigna un grado de acuerdo con el comportamiento clínico predictivo (Louis et al., 2007, 2016; Ostrom et al., 2018).

La incidencia, con base en el último reporte de *Registro de tumores cerebrales centrales de los Estados Unidos* en niños de 0 a 14 años fue de 5.95 por cada 100,000 habitantes haciendo a los tumores primarios de cerebro, los más comunes en esta población. En adolescentes y adultos jóvenes de 15 a 39 años la incidencia de los tumores cerebrales fue de 11.20 por cada 100,000 habitantes y el tercer tipo de tumor más común en esta población, mientras que en adultos de más de 40 años la incidencia fue de 41.47 por cada 100,000 habitantes y el octavo en frecuencia (Ostrom et al., 2018).

Los gliomas son tumores cerebrales que se desarrollan a partir de la glía o células precursoras. Estos incluyen astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, tumores mixtos, entre otros. Los gliomas representan aproximadamente el 26% de los tumores

primarios de cerebro y del SNC y el 81% de los tumores malignos de este órgano (Ostrom et al., 2018). Sólo el 5% de los pacientes con gliomas tienen un historial familiar en relación con este tumor (Agnihotri et al., 2013). Asimismo, los astrocitomas conforman el 75.8% de los gliomas, siendo el astrocitoma de grado IV, también denominado glioblastoma el más común de estos, representando al 56.6% de los gliomas (Figura 4) (Ostrom et al., 2018). Por lo anterior, el glioblastoma se considera como el tumor primario de cerebro más común.



**Figura 4. Gliomas.** Distribución de gliomas por subtipo histológico de acuerdo al informe de CBTRUS de 2018. NE = No especificado. Imagen reproducida y modificada de (Ostrom et al., 2018) [Licencia de Atribución Creative Commons / dominio público].

### 3.2.1 Astrocitomas

Los astrocitomas se clasifican histológicamente de acuerdo a la OMS por grado del I-IV dependiendo de la atipia nuclear, anaplasia, actividad mitótica, proliferación de microvasculatura y/o necrosis que presenta la histología del tumor. Los astrocitomas se clasifican de acuerdo a su histología y malignidad en pilocíticos (grado I), difusos (grado II), anaplásicos (grado III), y glioblastoma (grado IV) (Louis et al., 2007).

Los astrocitomas pilocíticos están por lo general bien delimitados y son de lento crecimiento. Se presentan en niños y adultos jóvenes principalmente con una incidencia de 0.34 por cada 100,000 habitantes (Perkins & Liu, 2016). Las fibras de Rosenthal, masas de hialina eosinófila, y microquistes son característicos en la histología de estos tumores así como

la ausencia de mitosis, proliferación vascular y necrosis (Louis et al., 2007). Este tumor no presenta signos de malignidad. La sobrevida a 5 años es del 94.1% de acuerdo a un estudio estadounidense (Ostrom et al., 2018), sin embargo en una cohorte asiática se mostró que estos pacientes tienen una sobrevida superior a 10 años (92.6%) (Park et al., 2019).

Los astrocitomas difusos crecen e infiltran, como su nombre lo indica, de manera difusa, con poca destrucción del tejido y con un crecimiento lento. Se presentan generalmente en adultos jóvenes con una incidencia de 0.55 por cada 100,000 habitantes. Histopatológicamente se caracterizan por ser tumores con microquistes o calcificaciones, presentan hiper celularidad y atipia nuclear en ausencia de mitosis, necrosis y microvasculatura (Louis et al., 2007; Perkins & Liu, 2016). La sobrevida a 5 años se estima que es del 58% para esta neoplasia, aunque puede variar si el tumor progresa hacia un grado III o IV, lo que suele ocurrir en un intervalo de 4 a 5 años posteriores al diagnóstico (Louis et al., 2007).

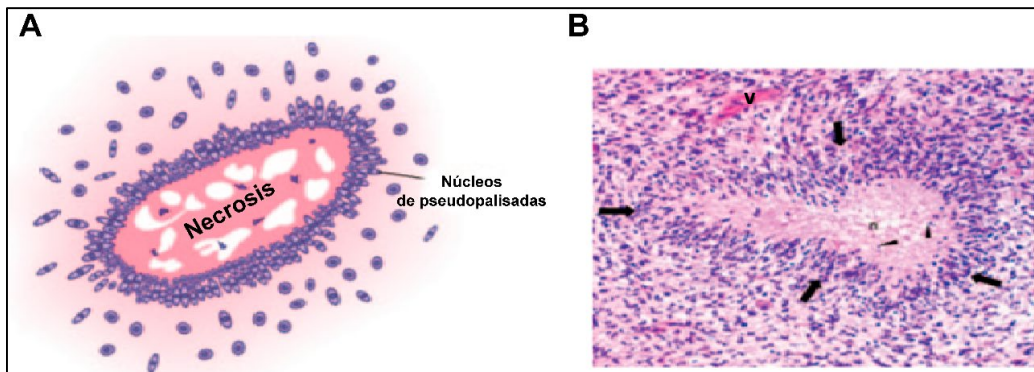
Los astrocitomas anaplásicos son tumores malignos infiltrantes. Se presentan generalmente en adultos mayores de 40 años con una incidencia de 0.37 por cada 100,000 habitantes (Perkins & Liu, 2016). Las principales características histológicas del tumor son hiper celularidad, anaplasia, atipia nuclear y células mitóticas (5-10% de células Ki-67 positivas). Incluso sin una evidente hiper celularidad la presencia de células mitóticas cataloga al tumor como astrocitoma anaplásico (Louis et al., 2007). La proliferación vascular y la necrosis están ausentes en estos. Estos tumores tienen una fuerte tendencia a progresar a glioblastoma, el tiempo de vida media es de 2 años con una supervivencia del 11% a 5 años (Louis et al., 2007; Perkins & Liu, 2016).

### **3.2.2 Glioblastoma multiforme**

Los astrocitomas de grado IV o glioblastoma multiforme (GBM) son el tumor primario de cerebro más común. Se presenta en adultos mayores de 40 años, principalmente, si bien también se observa en la población infantil y jóvenes adultos, menos del 10% de los GBM se diagnostican en las dos primeras décadas de vida (Fuller, 2016; Louis et al., 2007). La incidencia de GBM en adultos es de 3.21 por cada 100,000 habitantes con una edad media de diagnóstico de  $60 \pm 15$  años para la población de Estados Unidos, mientras que para México se reporta una edad de 49 años (Ostrom et al., 2018; Wegman-Ostrosky et al., 2016). El 95% de los GBM se presentan como tumores primarios *de novo*, es decir sin una

lesión previa a la aparición de esta neoplasia (Agnihotri et al., 2013), mientras que un bajo porcentaje progresa de un tumor de grado menor (II o III) lo que se considera como un tumor secundario en neoplasias cerebrales (Louis et al., 2007).

Los GBM están pobremente delimitados y tienen un crecimiento muy rápido; histopatológicamente presentan hiper celularidad, atipia nuclear, mitosis, proliferación de microvasculatura y/o necrosis del tipo pseudopalisada (Louis et al., 2007; Perkins & Liu, 2016). Los glioblastomas están dentro de los tumores más vascularizados siendo la hipoxia el principal promotor de la angiogénesis. El factor de crecimiento VEGF es uno de los inductores más importantes de este proceso y es producido en gran medida por células en zonas cercanas a la necrosis (Louis et al., 2007). Las pseudopalisadas se definen como focos necróticos irregulares delimitados por núcleos en hilera en forma de guirnalda que se establecen mediante muerte celular por apoptosis (inducida por FasL y Fas) y necrosis coagulativa (Figura 5).



**Figura 5. Pseudopalisadas.** A) Dibujo representativo de las pseudopalisadas ilustrando un centro necrótico rodeado de núcleos celulares en forma de guirnalda. B) Una pseudopalisada en glioblastoma con sus características de hiper celularidad de núcleos (flechas) alrededor de una zona necrótica con núcleos pinocíticos (cabezas de flecha) dentro y microvasculatura (v) (Tinción de hematoxilina y eosina, aumento x200). Imágenes reproducidas y modificadas de (Wippold et al., 2006) [Licencia de Atribución Creative Commons / dominio público].

Estos tumores son incurables, incluso la terapia convencional resulta más paliativa que una cura para el paciente. El tratamiento consta de resección quirúrgica de la mayor parte del tumor sin comprometer áreas vitales del cerebro. La cirugía se complementa con



quimioterapia utilizando temozolomida y radioterapia (Perry et al., 2017; Stupp et al., 2005, 2009). El tiempo medio de supervivencia para el 80% de los pacientes es de 12 a 16 meses. El 5.6 % de los pacientes sobrevive a 5 años después del diagnóstico (Louis et al., 2007; Ostrom et al., 2018).

### 3.2.3 Subtipos de glioblastoma multiforme

Un catálogo de anomalías genómicas de GBM se ha publicado a través del Atlas del Genoma del Cáncer (“Comprehensive Genomic Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways,” 2008), que permitió al grupo de Verhaak clasificar a los glioblastomas en cuatro subtipos moleculares: clásico, mesenquimal, proneural y neural (Verhaak et al., 2010).

El **subtipo clásico** tiene una amplificación en el gen *EGFR* y expresa esta proteína en altas concentraciones. También alberga una mutación de *EGFRvIII* constitutivamente activa debido a la eliminación de los exones 2–7 del gen *EGFR*. Se caracteriza por expresar *TP53*, *NF1*, *PDGFRA* y *IDH1* sin mutaciones y la pérdida de *CDKN2A*. La ausencia de mutaciones en *TP53* es un sello de este subtipo. También sobre expresa nestina y mantiene activas las vías Notch y SHH (Verhaak et al., 2010).

El **subtipo mesenquimal** se asocia con una supervivencia global baja y contiene la más alta frecuencia de mutaciones de *NF1*, sin embargo, estos tumores presentan baja expresión de este gen; además de la sobreexpresión de *S100A1*, *MET* y *CHI3L1* y marcadores de microglía *CD68*, *PTPRC* y *TNF* que se relacionan con el incremento en la invasividad y la inflamación además de la vía de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  activa (Verhaak et al., 2010).

El **subgrupo proneural** tiene una alta frecuencia de mutaciones en *IDH1* y *TP53*, amplificaciones de *PIK3CA / PIK3R1* y *PDGFRA* y expresión de *OLIG2*. Este grupo tiene el mayor porcentaje de pacientes jóvenes, una fuerte asociación con glioblastomas secundarios (astrocitomas que progresaron de un grado II o III) y el mayor tiempo de supervivencia en comparación de los otros subgrupos (Verhaak et al., 2010).

El **subtipo neural** tiene niveles elevados de marcadores neurales como *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1*, y *SLC12A5* pero no presenta alteraciones distintivas únicas de otras clases, no obstante se observan tasas elevadas de mutaciones de *EGFR*, *TP53* y *PTEN* (Verhaak et al., 2010). Aunque la histología identifica a este subgrupo inequívocamente como GBM sus

firmas genéticas son asociadas con el tejido normal de cerebro y tipos celulares como el neural, astrocitos y oligodendrocitos.

La subclasificación molecular de los glioblastomas se esperaba que aportará una terapia personalizada para aumentar la sobrevida de estos pacientes, sin embargo estudios recientes muestran que los subtipos probablemente son estados del tumor que coexisten en el mismo (Nefitel et al., 2019; Patel et al., 2014). Si bien los subtipos nos ayudan a comprender mejor la patología del GBM se requieren más estudios para evaluar si la terapia personalizada puede ser posible.

### **3.3 Señalización del ácido lisofosfatídico en la progresión de glioblastomas**

Anteriormente, se enumeraron las características que influyen en la agresividad de los glioblastomas. Si bien se han identificado numerosos factores que promueven su proliferación, invasividad y angiogénesis, estos tumores son muy heterogéneos.

El análisis de la expresión de genes ha sido muy útil para elucidar aquellos que se encuentran regulados a la alta o a la baja en estos tumores en la búsqueda de componentes claves para el desarrollo de GBM. Hoelzinger y colaboradores, encontraron una alta expresión de ATX en los bordes invasivos (51%) del tumor en comparación con el centro proliferativo (30%). La enzima estaba altamente expresada tanto a nivel de ARN mensajero como de la proteína (Hoelzinger et al., 2005).

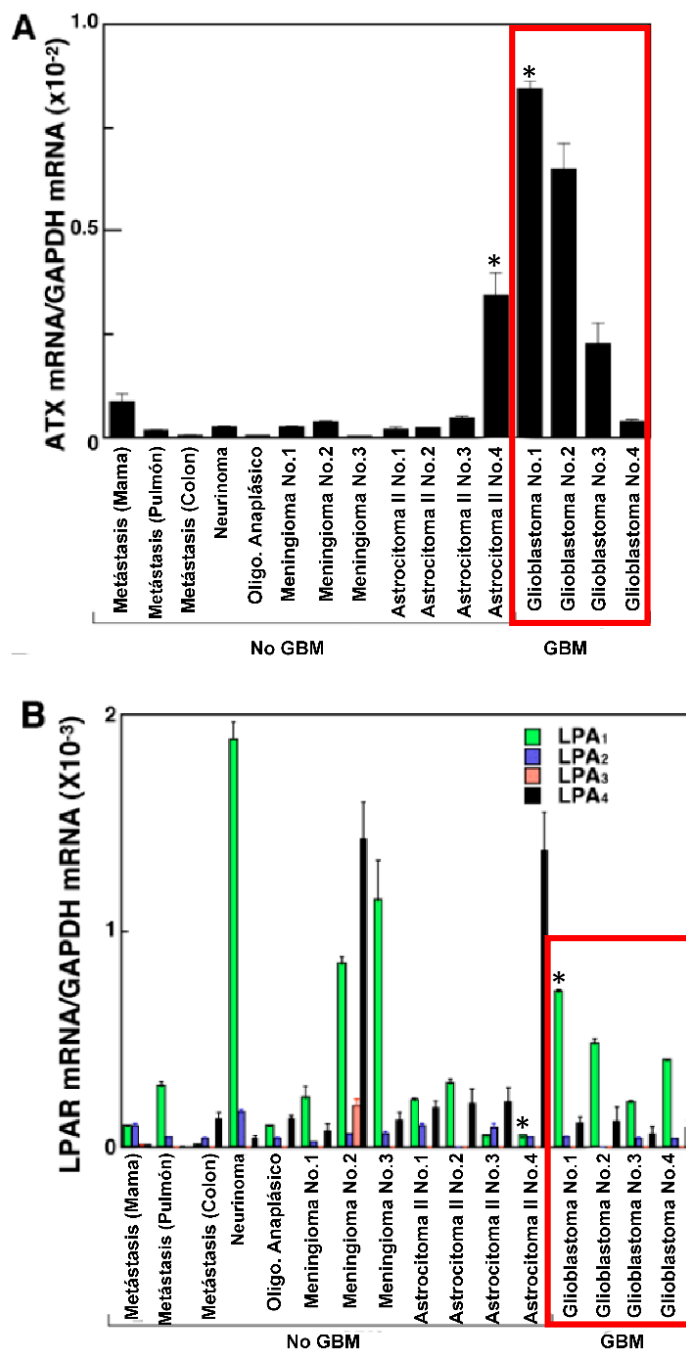
En un análisis posterior, se observó que el incremento de ATX en los bordes invasivos está en un intervalo de 1.5 a 100 veces (Hoelzinger et al., 2008). Además, esta enzima también se expresa altamente en la microglía, moderadamente en vasos sanguíneos y en menor medida en astrocitos reactivos, pero no en glía ni en neuronas.

Por otra parte, al analizar la expresión de los receptores a LPA se observó que las células derivadas de glioblastoma expresan dichos receptores de manera diferencial siendo el receptor LPA<sub>1</sub> el más abundante, mientras que los astrocitos expresan bajos niveles de LPA<sub>1/2</sub> y la microglía expresa moderadamente los mismo receptores. En ninguna de las células se detectó la presencia de LPA<sub>3</sub>, el resto de los receptores (LPA<sub>4-6</sub>) no fueron evaluados en este estudio (Hoelzinger et al., 2008). La expresión de estas proteínas tanto en células tumorales como del parénquima demostró incrementar la invasividad de GBM.

Estos resultados respaldan los hallazgos de Kishi y colaboradores quienes en 2006 demostraron que el LPC convertido a LPA por ATX incrementaba la migración celular en líneas derivadas de glioblastoma humano. Este efecto es dependiente de la concentración siendo 100nm y 1µM las que inducían la mayor migración (Kishi et al., 2006).

La expresión de ATX, tanto en las líneas celulares como en muestras de pacientes, tenían una alta expresión en GBM comprado con otros tumores cerebrales como astrocitomas, meningiomas o metástasis de pulmón o mama a este órgano.

De manera interesante, se observó en un paciente que primero curso con astrocitoma de grado II (Figura 64 astrocitoma II No.4, marcado con \*) y posteriormente GBM (Figura 64 glioblastoma No.1, marcado con \*) tuvo un incremento considerable tanto de ATX como LPA<sub>1</sub> a nivel del mensajero, sugiriendo que estas dos moléculas tienen un papel relevante en la progresión de esta neoplasia.



**Figura 6. Incremento en la expresión de ATX en tejido de GBM derivado de pacientes.** Expresión de (A) autotaxina y (B) receptores a LPA (LPA<sub>1-4</sub>) en diversos tumores cerebrales medido por RT-PCR. De los tres receptores a LPA, LPA<sub>1</sub> tiene una mayor expresión en diversos tumores. La muestra Astrocitoma II No. 4 y GBM No.1 derivan del mismo paciente, siendo GBM No.1 la progresión del tumor previo. Los recuadros rojos denotan las muestras de GBM en ATX y LPAR. Imágenes reproducidas y modificadas de (Kishi et al., 2006) [Licencia de Atribución Creative Commons / dominio público].

Adicionalmente, la expresión de los receptores LPA<sub>1-4</sub> se analizó en diferentes líneas celulares siendo el LPA<sub>1</sub> el receptor más expresado a nivel de mensajero en comparación con los otros 3 receptores evaluados así como en comparación con líneas tumorales de mama, pulmón, colón, entre otras (Kishi et al., 2006).

Aunado a lo anterior, en 2018 Loskutov y colaboradores describieron que cuando hay pérdida del cilio primario en astrocitos se descontrola su proliferación, este fenómeno es dependiente de LPA a través del receptor LPA<sub>1</sub> (Loskutov et al., 2018). En este estudio se observó que LPA<sub>1</sub> se encuentra regulado dentro del cilio y al perderse, el receptor se redistribuye en la membrana citoplasmática y señala sin una regulación apropiada. Lo cual es similar a lo que se observa en GBM, donde hay pérdida del cilio primario y además incremento en la expresión de LPA<sub>1</sub>. En este trabajo se reportó que el uso de un antagonista, Ki16425, para LPA<sub>1/3</sub> inhibe el crecimiento de células derivadas del tumor de un paciente con glioblastoma, tanto *in vitro* como *in vivo* (Loskutov et al., 2018).

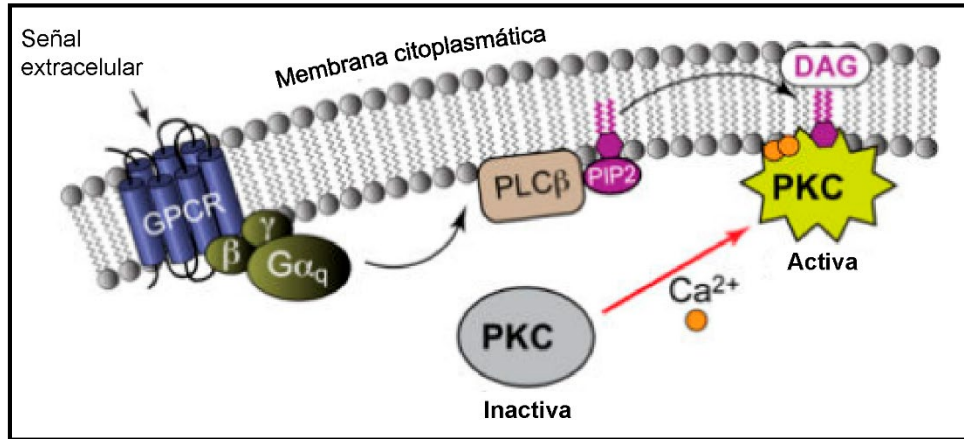
Adicionalmente, en este trabajo se observó que al desaparecer el cilio primario en astrocitos, LPA<sub>1</sub> parece asociarse preferentemente con las proteínas G $\alpha_{12}$  que promueven remodelación del citoesqueleto y G $\alpha_q$  que modulan el calcio intracelular y la activación de proteínas cinasas C (Loskutov et al., 2018).

### **3.4 Proteína cinasa C**

Existe una amplia familia de isoenzimas de proteínas cinasas C (PKC, por sus siglas en inglés) que son parte de la gran familia de cinasas AGC incluyendo a PKA, PKB/Akt, PDK-1, entre otras. Las PKC son cinasas de serina/treonina y transducen una gran variedad de señales al fosforilar blancos río abajo (Newton, 2010). Estos blancos pueden ser receptores de membrana como EGFR, cinasas como PI3K o GPCRs (Newton, 2018).

Estas cinasas se dividen en 3 familias dependiendo de su activación. La familia de PKCs clásicas conformada por PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II y PKC $\gamma$ , se activa por lípidos y calcio. Esta familia contiene con un dominio C1 el cual a su vez se divide en C1A y C1B. El dominio C1A tiene alta afinidad por DAG mientras que C1B por ésteres de forbol. Esta familia de cinasas además contiene un dominio C2 que une iones de Ca<sup>2+</sup>. Una vez unida a membrana también se une a PS para estabilizar a la enzima en este organelo, la activación de PKC clásicas está completa tras la unión de DAG y calcio ya que promueven la liberación de una

secuencia de aminoácidos del dominio de cinasa conocido como pseudosustrato (Figura 7) (Igumenova, 2015; Newton, 2010).



**Figura 7. Activación de la familia de PKC clásica.** Una señal extracelular transducida por un receptor, como un GPCR, induce la activación de PLCβ, la cual hidroliza a PIP2 en DAG e IP3, este último se une a sus receptores en el retículo endoplásmico produciendo una liberación de Ca<sup>2+</sup> de este organelo. El Ca<sup>2+</sup> se une a PKC clásicas induciendo un cambio en su conformación que expone residuos que favorecen la unión a DAG en la membrana celular. Una vez que PKC clásicas se unen a Ca<sup>2+</sup> y DAG liberan un pseudosustrato que se encuentra en el dominio de cinasa y queda activa para fosforilar diversos blancos. Imagen reproducida y modificada de (Igumenova, 2015) [Licencia de Atribución Creative Commons / dominio público].

Por otro lado, la familia de PKCs nuevas conformada por PKCδ, PKCε, PKCη, y PKCθ solo se activa por DAG ya que cuenta con el dominio C1 (C1A/C1B) y un dominio similar al C2 que es incapaz de unir calcio.

Por último la familia de PKCs atípicas PKCζ y PKCι (o PKCλ en murinos) se activa por interacciones proteína-proteína a través de dominios PB1 ya que no contienen los dominios modulados tanto por DAG como por calcio (Newton, 2010) (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de las isoenzimas PKC**

Familia	Isoenzima	Activación
Clásica	$\alpha, \beta I, \beta II, \gamma$	DAG, Fosfatidilserina, $Ca^{2+}$
Nueva	$\delta, \epsilon, \eta, \theta$	DAG, Fosfatidilserina
Atípica	$\zeta, \iota$	Interacción Proteína-Proteína

Las diversas isoenzimas de PKC se han propuesto como moléculas críticas en la carcinogénesis, tras su identificación como los receptores intracelulares de los ésteres de forbol que se une de manera competitiva al mismo dominio que el DAG. La observación de que dichos ésteres eran promotores tumorales enfocó los estudios al papel de las PKC en la transformación celular y el uso potencial de las enzimas como blancos terapéuticos (Isakov, 2018).

Si bien la inducción de transformación celular con ésteres de forbol denota la participación de las familias clásicas y nuevas, diversos reportes demostraron que un gran número de cánceres presentaban alteraciones en la expresión y / o mutaciones de genes en toda la familia de PKC, incluyendo las atípicas. La activación de estas isoenzimas llevan a la modulación de la proliferación celular, diferenciación, motilidad y supervivencia dependiente del cáncer y contexto celular (Isakov, 2018).

#### **3.4.1 Proteína cinasa C $\alpha$ en glioblastoma**

En el contexto de tumores cerebrales, específicamente gliomas y GBM se conoce que la familia de PKC tiene una importante contribución en su patogénesis (Carmo et al., 2013). Las diversas enzimas contribuyen a la angiogénesis (PKC $\beta$ ), resistencia a la apoptosis (PKC $\beta, \delta, \epsilon$ ), invasión (PKC $\delta, \epsilon, \iota, \zeta$ ) y proliferación (PKC $\eta$ ). Sin embargo, PKC $\alpha$  está implicada en la mayoría de los procesos mencionados y se ha reportado que es la que más se expresa en GBM en comparación con astrocitomas de menor grado (Carmo et al., 2013; Mandil et al., 2001).

Fan y colaboradores demostraron que en las células de glioma un mecanismo dependiente de PKC $\alpha$ , pero independiente de AKT, promueve la asociación de PI3K con mTORC1 que induce la proliferación celular en estos tumores (Fan et al., 2009). Además, Mut y colaboradores reportaron que PKC $\alpha$  induce la fosforilación de NF $\kappa$ B/p65 impactando en la

proliferación y supervivencia (Mut et al., 2010), así como también en la migración de GBM (Chandrika et al., 2016).

De manera interesante, Hu y colaboradores reportaron que la fosforilación de PKC $\alpha$  es un requisito previo para regular la migración de células C6 derivadas de glioma murino, lo que indica que PKC $\alpha$  no solo contribuye a la supervivencia y proliferación, sino también a la motilidad de estas células tumorales (Hu et al., 2010). Aunado a estas observaciones, los resultados de Kohutek y colaboradores demostraron que PKC $\alpha$  regula la escisión de N-cadherina que está involucrada en la migración celular de GBM (Kohutek et al., 2009). En conjunto, estos resultados muestran que PKC $\alpha$  está involucrada en la supervivencia, proliferación y migración en gliomas y GBM.

Nuestro grupo de investigación en 2015 identificó que el receptor a progesterona (RP) era un blanco de fosforilación de PKC $\alpha$  en células derivadas de GBM (González-Arenas et al., 2015). Mediante un análisis *in silico* se identificó que un residuo putativo (Ser400) en el RP podría ser fosforilado por PKC. El tratamiento con el activador de PKC, el éster de forbol TPA, aumentó la fosforilación del RP en la Ser400 después de 5 minutos de estimulación, lo que a su vez indujo la actividad transcripcional de RP y su posterior degradación por el proteasoma 26S (González-Arenas et al., 2015).

El silenciamiento y la inhibición de PKC $\alpha$  bloquearon la fosforilación y degradación de RP inducida por TPA mientras que la mutante de RP, S400A, reveló que este residuo es esencial para la fosforilación y degradación del RP mediada por PKC. Estos resultados sugieren una participación clave de PKC $\alpha$  en la regulación y función del RP en GBM (González-Arenas et al., 2015).

Posteriormente, demostramos que la activación de RP por PKC $\alpha$  indujo la migración e invasión de líneas celulares derivadas de GBM (Marquina-Sánchez et al., 2016). Se observó que la activación de PKC con TPA aumenta la capacidad de migración e invasión de dos líneas celulares humanas derivadas de glioblastoma humano (U251 y U87) y que el tratamiento con el modulador selectivo del RP, RU486, reprime estos procesos.

Resulta interesante que la inhibición farmacológica de PKC $\alpha$  también resultó en un bloqueó de la actividad transcripcional de RP. Además, la activación del RP dependiente de TPA aumentó la expresión del factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF), un gen blanco de éste receptor que participa en la proliferación (Marquina-Sánchez et al., 2016).



### **3.5 Receptor a progesterona**

El RP es miembro de la familia de receptores esteroides de factores de transcripción dependientes de ligandos que se expresa principalmente en los tejidos reproductivos femeninos y en el SNC (Camacho-Arroyo et al., 2017; Grimm et al., 2016). El RP tienen un papel importante en el desarrollo, reproducción y metabolismo, este receptor lleva a cabo sus efectos a través de dos isoformas (RP-A y RP-B). La isoforma RP-B tiene una región N-terminal más larga (128-164 aminoácidos dependiendo de la especie) llamada segmento rí o arriba de B (BUS) (Camacho-Arroyo et al., 2017; Grimm et al., 2016).

RP-A y RP-B muestran diferentes patrones de expresión, función y regulación que dependen del contexto celular. En diferentes especies, la expresión de RP depende de la estructura particular y la regulación específica de su gen (*PGR*). En humanos, la transcripción de RP-A y RP-B se produce a partir de un solo gen (11q22-23) y bajo el control de dos promotores distintos (Camacho-Arroyo et al., 2017).

#### **3.5.1 Mecanismo de acción**

El RP es un factor de transcripción, que en ausencia de Progesterona (P4), se encuentra en una conformación inactiva asociado con chaperonas como la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) y otras co-chaperonas; una vez que se une a P4 ingresa a la célula e induce un cambio conformacional que promueve la fosforilación del RP, la disociación del complejo chaperona, la dimerización y la translocación nuclear (Camacho-Arroyo et al., 2017; Grimm et al., 2016).

El receptor activo se une a elementos de respuesta a progesterona (ERP) específicos dentro de las regiones reguladoras de sus genes blanco; la transcripción se inicia mediante el reclutamiento de coactivadores y complejos de remodelación de cromatina que mejoran la unión de la maquinaria de transcripción basal (Camacho-Arroyo et al., 2017; Grimm et al., 2016).

Genes que carecen de ERP pueden ser inducidos a través de la interacción del RP con factores de transcripción como Sp1, proteína de unión al potenciador CCAAT (C/EBP), proteína de unión a proteína CREB (proteína de unión a elementos de respuesta AMPc) (CBP), p300, potenciador del NFκB y AP-1 (proteína activadora 1) a través de modificaciones post traduccionales en presencia o ausencia de P4 (Camacho-Arroyo et al., 2017; Hagan et al., 2012; Pierson-Mullany & Lange, 2004).

En consecuencia, el RP puede modular una gran diversidad de genes que impactan en la proliferación y supervivencia. Es por esto que la expresión del RP se ha relacionado con diferentes enfermedades, y en particular el cáncer (Grimm et al., 2016). En el cáncer de mama, los estudios epidemiológicos muestran que la P4 aumenta el riesgo de desarrollar tumores de mama (Diep et al., 2015). Además, la relación de las isoformas del RP se altera frecuentemente en el cáncer de mama (Kariagina et al., 2008), así como en cáncer de endometrio (Kim et al., 2013) y astrocitomas (Camacho-Arroyo et al., 2012).

### **3.5.2 Receptor a progesterona en glioblastomas**

En los astrocitomas, la expresión de RP aumenta de acuerdo con su grado de progresión, donde astrocitomas de grado I expresan aproximadamente 20% de células positivas al receptor mientras que el glioblastoma expresa aproximadamente el 60%, de este el RP-B es la isoforma más abundante (González-Agüero et al., 2001; Khalid et al., 1997).

Adicionalmente, la P4 aumenta la proliferación de células derivadas de astrocitomas humanos (González-Agüero et al., 2007) y promueve el crecimiento tumoral y la infiltración en experimentos *in vivo* e *in vitro* (Germán-castelán et al., 2014; Piña-Medina et al., 2016); ambos procesos están mediados por la activación del RP, ya que el RU486 y los oligonucleótidos anti sentido contra el RP bloquearon estos efectos (Germán-castelán et al., 2014; Piña-Medina et al., 2016).

La proliferación celular inducida por P4 en líneas celulares de astrocitomas humanos está mediada a través de la regulación del RP y de SRC-1 (coactivador de receptor esteroideo 1) que modula la expresión de genes relacionados con la proliferación tales como *ciclina D1*, *EGFR* y *VEGF* (Hernández-Hernández et al., 2012). Por lo anterior, es relevante continuar con los estudios de la señalización del RP en glioblastomas y como este receptor contribuye a la progresión de estos tumores.

## **4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A la fecha, se ha determinado que la activación de PKC $\alpha$  influye sobre la función del RP. Sin embargo, se desconocen los mensajeros biológicos que podrían inducir esta vía de señalización. El LPA, es un lisofosfolípido capaz de inducir diferentes vías de señalización que implican los procesos fundamentales para la progresión tumoral. En glioblastomas se ha reportado que el receptor a LPA<sub>1</sub> es el más abundante y que la autotaxina, enzima que

lo sintetiza, se encuentra sobre expresada (Kishi et al., 2006; Willier et al., 2013). Por lo anterior, este proyecto se enfoca en estudiar un mecanismo de acción en el cual el LPA, a través de su receptor tipo 1 (LPA<sub>1</sub>), activa a PKC $\alpha$  la cual fosforilara al RP induciendo así su activación. Los resultados obtenidos tendrán la finalidad de aportar información relevante que mejore las terapias existentes para el tratamiento de este tipo de tumores.

## **5 JUSTIFICACIÓN**

Las terapias hasta ahora utilizadas para tratar a los glioblastomas son invasivas y poco efectivas, lo cual impacta en la corta sobrevida de los pacientes. El estudio de los mecanismos a través de los cuales estos tumores se desarrollan resulta de gran relevancia para implementar el uso de nuevas estrategias sobre los reguladores clave de las vías que influyen en el desarrollo y progresión de esta neoplasia.

## **6 HIPÓTESIS**

Si el LPA a través de su receptor LPA<sub>1</sub> activa a PKC $\alpha$  entonces ésta fosforilará al RP en la Ser400 e inducirá su activación en células derivadas de glioblastoma humano.

## **7 OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo General**

Estudiar la activación de PKC $\alpha$  mediante el receptor LPA<sub>1</sub> y si en consecuencia la activación de esta cinasa induce la fosforilación del receptor a progesterona en células derivadas de glioblastoma humano.

### **7.2 Objetivos Particulares**

1. Evaluar la activación de PKC $\alpha$  por LPA en las líneas celulares U251-MG y U87 derivadas de glioblastomas humanos.
2. Determinar si la activación de PKC $\alpha$  por LPA es un efecto mediado por el receptor a LPA<sub>1</sub>.
3. Estudiar el efecto de la activación de PKC $\alpha$  por LPA sobre la fosforilación del RP en la Ser400.
4. Determinar si la co-localización del RP con PKC $\alpha$ , así como su translocación al núcleo aumentan después del tratamiento con LPA.

5. Estudiar la activación del RP por la fosforilación inducida por LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$ .

## **8 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Cultivo celular y tratamientos**

Las líneas celulares derivadas de glioblastoma humano U251, U87 y LN229 (American Type Culture Collection, EE. UU.) se cultivaron en placas Petri de 10 cm y se mantuvieron en medio DMEM (In Vitro, Mex) suplementado con 10% de suero fetal bovino. La línea celular SKOV3 (American Type Culture Collection, EE. UU.) derivada de cáncer de ovario humano se cultivaron en placas Petri de 10 cm y se mantuvieron en medio DMEM (In Vitro, Mex) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de glutamina. Líneas celulares derivadas de cáncer de colon humano CaCo2 y HCT-116 (American Type Culture Collection, EE. UU.) se cultivaron en placas Petri de 10 cm y se mantuvieron en medio DMEM (In Vitro, Mex) suplementado con 20% y 10% de suero fetal bovino, respectivamente. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. El 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA; Sigma-Aldrich, EE. UU.) se utilizó como control positivo para activar a PKC $\alpha$ . El ácido lisofosfatídico (LPA 18:1, Cayman Chemical, EE. UU.) se usó para activar a los receptores de LPA y posteriormente PKC $\alpha$ . El antagonista de LPA<sub>1</sub> Ki16425 (Sigma-Aldrich, EE. UU.) se añadió 30 minutos antes del tratamiento con LPA cuando éste fue utilizado. La progesterona (P4) (SML0971; Sigma-Aldrich, EE. UU.) se usó para activar el RP; se añadió RU486 (M8046; Sigma-Aldrich, EE. UU.), 30 minutos antes del tratamiento con P4 cuando se usó.

### **8.2 Fraccionamiento celular**

Se mantuvieron 10x10<sup>6</sup> células como se describe en la sección 8.1 Cultivo celular y tratamientos. Dieciocho horas antes de los tratamientos, el medio DMEM se cambió por DMEM sin rojo de fenol y sin suero fetal bovino. Las células se incubaron a 37°C con una atmósfera de 95% de aire y 5% CO<sub>2</sub>. Se realizaron tres experimentos de forma independiente. Después de los tratamientos, las células se homogeneizaron en Buffer A frío con inhibidores de proteasa (Tris-HCl 20 mM, sacarosa 0.25 M, EDTA 2 mM y EGTA 2 mM en agua destilada, pH = 7.5). La suspensión celular se sometió a un ciclo de congelación-descongelación en hielo seco. Las muestras se centrifugaron a 2,800 x g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se colocó en un tubo de policarbonato con tapa y el pellet

(fracción nuclear) se suspendió en 200  $\mu$ L de Buffer A. El sobrenadante se centrifugó a 200,000 x g a 4°C durante 105 min mediante ultra centrifugación. El sobrenadante (fracción citosólica) se separó en un tubo Eppendorf. El pellet en el tubo de policarbonato se suspendió en Buffer B frío con inhibidores de proteasa (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 150 mM y Triton X-100 al 1% en agua destilada, pH = 7.5), se incubó 20 min en hielo y a continuación el pellet se homogenizó. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 16,000 x g a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante (fracción membranal) se guardó en un tubo Eppendorf. Las proteínas se cuantificaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EE. UU.).

### **8.3 Western Blot**

Las proteínas nucleares (100  $\mu$ g), citosólicas (50  $\mu$ g) y membranales (50  $\mu$ g) se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 10% y al 7.5%, respectivamente, a 20 mA. Para la determinación del peso de las proteínas se incluyeron marcadores de colores (Bio-Rad, EE. UU.). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, EE. UU.) durante 2 horas (60 mA, a temperatura ambiente en condiciones semisecas). Las membranas se bloquearon con 5% de leche en polvo baja en grasa y 2% de albúmina de suero bovino a temperatura ambiente durante 2 horas. Las membranas se incubaron con un anticuerpo contra PKC $\alpha$  (0.66  $\mu$ g/ml; sc-8393; Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) a 4°C durante la noche, y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario contra ratón (1:5,000) conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) durante 45 minutos. Para corregir las diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada carril, el contenido de PKC $\alpha$  en la fracción nuclear se normalizó al de la histona 3 (H3), el contenido de la cinasa en la fracción citosólica se normalizó al de  $\alpha$ -tubulina y el contenido de PKC $\alpha$  en la fracción de membrana se normalizó a la del transportador de glucosa, Glut3. Las membranas se incubaron con glicina (0.1 M, pH 2.5; Dodecilsulfato de sodio al 0.5%) a 4° C durante la noche y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se incubaron con 0.1  $\mu$ g/ml de anticuerpo policlonal de conejo contra histona 3 (06-599-MN, Merck Millipore, EE. UU.), 0.4  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal contra  $\alpha$ -tubulina de ratón (sc-398103; Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.), 0.66  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal contra Glut3 de ratón (sc-74399; Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.), respectivamente, a 4° C durante la noche. Posteriormente, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con un anticuerpo secundario contra ratón (1:15,000; abcam, EE.

UU.) o un anticuerpo secundario contra conejo (1:12,000; Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) conjugados con peroxidasa de rábano. Se detectó la señal de quimioluminiscencia exponiendo las membranas a Kodak Biomax Light Film (Sigma-Aldrich, EE. UU.) utilizando Supersignal West Femto como sustrato de la peroxidasa (Thermo Scientific, EE. UU.) con un tiempo de exposición constante de 1 minuto para PKC $\alpha$ , 1 minuto para H3 y 3 minutos para  $\alpha$ -tubulina y Glut3. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó de forma semicuantitativa utilizando un scanner HP Scanjet G3110 (Hewlett) -Packard Co., EE. UU.) y el software ImageJ 1.45S (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU.) como el área debajo de un pico de señal que corresponde a la densidad de banda (el área está dada en pulgadas con una escala predeterminada de 72 píxeles/pulgada). Para minimizar las variaciones entre los ensayos, todos los Western Blots se llevaron a cabo en paralelo. Para verificar que el fraccionamiento celular se realizó correctamente, se separaron 50  $\mu$ g de proteína de cada fracción celular en condiciones de control mediante Western Blot como se describió anteriormente. Las proteínas específicas de cada compartimento (H3,  $\alpha$ -tubulina y Glut3) se analizaron simultáneamente en las tres fracciones. La detección del receptor LPA $_1$ , receptor LPA $_3$  y ATX se realizó en células completas en condiciones control. Éstas se homogenizaron en Buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasa (EDTA 1 mM, leupeptina 2  $\mu$ g/ml, aprotinina 2  $\mu$ g/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM). Las proteínas se obtuvieron por centrifugación a 12,500 rpm, a 4° C durante 15 minutos y se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.). Las proteínas (100  $\mu$ g) se determinaron mediante Western Blot como se describió anteriormente. Las membranas se incubaron con 3  $\mu$ g/ml de anticuerpo policlonal de conejo contra LPA $_1$  (ab23698; Abcam, EE. UU.), 1  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal de ratón LPA $_3$  (sc-390270; Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) y 0.2  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal de ratón contra ATX (sc-374222; Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos). Para corregir las diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada carril, el contenido se normalizó al de la  $\alpha$ -tubulina como se describió anteriormente.

#### **8.4 Inmunofluorescencia**

En portaobjetos de vidrio Millicell EZ de 4 pozos (Millipore, EE. UU.) se sembraron 8,000 células por pozo. Dieciocho horas antes de los tratamientos, se cambió el medio por DMEM sin de rojo de fenol y sin suero fetal bovino. Las células se incubaron a 37°C con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO $_2$ . Se realizaron tres experimentos de forma

independiente. Después de los tratamientos, las células se fijaron durante 20 minutos en solución de para formaldehído al 4% a temperatura ambiente y se permeabilizaron con metanol al 100% durante 6 minutos a  $-4^{\circ}\text{C}$ . A continuación, las células fijadas se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas con  $1\ \mu\text{g/ml}$  de anticuerpo monoclonal de ratón contra PKC $\alpha$  (sc-8393; Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) o  $1\ \mu\text{g/ml}$  de anticuerpo policlonal de conejo contra RPs400 (ab60954, Abcam, EE. UU.) en albúmina sérica bovina al 0.5% en PBS. Las muestras se lavaron tres veces en PBS durante 5 minutos cada lavado y se incubaron durante 45 minutos en la oscuridad con anticuerpo secundario contra ratón marcado con Alexa Flúor 594 (Invitrogen, EE. UU.) o con  $1\ \mu\text{g/ml}$  de anticuerpo secundario contra ratón marcado con Alexa Flúor 488 (A11034, Invitrogen EE. UU.). Los núcleos se tiñeron con  $1\ \mu\text{g/ml}$  de solución Hoechst 33342 (Thermo Scientific, EE. UU.). Posteriormente, los pozos se cubrieron con medio de montaje de fluorescencia (Biacore Medical, EE. UU.) y un cubreobjetos. Para detectar la fluorescencia Alexa Flúor 594, 488 y Hoechst, las muestras se visualizaron en un microscopio Olympus Bx43F utilizando diferentes longitudes de onda para excitar los fluorocromos. Las fotografías fueron tomadas a 60x. Para establecer la colocalización de las señales detectadas, se generaron imágenes fusionadas utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU.). Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal Nikon A1R+ STORM (Unidad de microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Las imágenes fueron capturadas a 20x con un aumento de 3.62 y un enfoque hacia el núcleo utilizando la tinción de Hoechst 33342 como guía. Los controles negativos consistieron en células en las que se omitió el anticuerpo primario, y no tenían señal detectable (datos no mostrados).

#### **8.4.1 Cuantificación de PKC $\alpha$ en núcleo**

Las líneas U251 y U87 se utilizaron para cuantificar la translocación de PKC $\alpha$  al núcleo. Las células se trataron por 15min con LPA 100nM y/o Ki16425 2.5 $\mu\text{M}$ . La tinción se realizó de acuerdo con el punto 8.4. Posteriormente las muestras se visualizaron en un microscopio confocal de acuerdo al punto 8.4.2. Las imágenes fueron analizadas en ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU.). Las imágenes de los núcleos en el canal azul se transformaron en imágenes binarias: ImageJ > Process > Binary > Make Binary. Posteriormente se cuantificaron como partículas: ImageJ > Analyze > Analyze Particles. Con la herramienta ROI Manager, el área de los núcleos fue sobrepuesta en el canal rojo

(señal de PKC $\alpha$ ) y cuantificada con la misma herramienta. Para el análisis de datos la intensidad media de fluorescencia (IMF) fue dividida entre el área de su núcleo correspondiente para obtener la IMF por núcleo.

### **8.5 Ensayo de viabilidad**

Se sembraron 15,000 células por pozo en una placa de 24 pozos. Se usó DMEM con 10% de SFB durante este ensayo. Las células se trataron durante 24 h con Ki16425 2.5 o 5  $\mu$ M. Las células se desprendieron con PBS-EDTA y la suspensión celular se tiñó con azul de tripano (T-6146, Sigma, EE. UU.). Primero, el número de células se determinó en una cámara de Neubauer. Posteriormente, las células teñidas se contaron a los 3-5 minutos de añadir azul de tripano. El porcentaje de células viables se calculó dividiendo el número de células viables por el número de células totales y multiplicando por 100.

### **8.6 Transfección celular con siRNA**

Para disminuir la expresión de PKC $\alpha$  (sc-36423) se utilizó un pequeño ARN interferente específico (siRNA) (Santa Cruz Biotechnology). El siRNA control contiene una secuencia aleatoria que no conduce a la degradación específica de ningún ARNm celular conocido. Las células U251, U87 y LN229 se crecieron en placas de seis pozos hasta una confluencia del 60% y luego se transfectaron con 0.35 nM de siRNA usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life Technologies) como lo describe el fabricante. Para confirmar el silenciamiento de PKC $\alpha$ , se evaluó la cantidad de proteína por Western Blot (sección 8.3) después de 72 h de transfección con el siRNA.

### **8.7 Citometría de flujo**

Para evaluar la fosforilación de RP en la serina 400 (RPpS400), se realizó una tinción intracelular. Inmediatamente después de los tratamientos, las células se recogieron con gendarme, se fijaron con PBS / para formaldehído al 2% a 37° C durante 10 min, y se permeabilizaron con metanol frío a 4° C durante 30 minutos. Después, las células se lavaron con Buffer FACS (PBS / suero fetal bovino al 4%) centrifugando a 3,000 rpm durante 5 minutos y se incubaron con solución de bloqueo (Buffer FACS / suero de cabra al 10%) durante 20 minutos a 4° C. Después del bloqueo, las células se tiñeron utilizando 0.5  $\mu$ g/50  $\mu$ l del anticuerpo contra RPpS400 de conejo (ab60954, abcam, EE. UU.) a 4° C durante 20



minutos y se lavaron con Buffer FACS. Después, las células se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (0.5 µg/50 µl; A11034, Invitrogen, EE. UU.) a 4° C durante 30 min, protegidas de la luz. Las células se lavaron y suspendieron en Buffer FACS. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo de enfoque acústico Attune (Life Technologies, EE. UU.) y se analizaron utilizando el software FlowJo 10.0 (Tree Star Inc., EE. UU.).

### **8.8 PLA (Proximity Ligation Assay)**

Los experimentos de PLA se realizaron con el kit Duolink® (DUO92101, Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sembraron 4,000 células en cámaras de 16 pozos (178599, Nunc Lab-Teck, Thermo Scientific) en medio DMEM con suero fetal bovino al 10% durante 24 horas. Dieciocho horas antes de los tratamientos, el medio se cambió por DMEM sin rojo fenol sin suero fetal bovino, y las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células se estimularon durante 0, 5 y 15 minutos con LPA 100 nM, se lavaron dos veces con PBS frío, se fijaron durante 15 minutos con PBS / Paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% durante 30 minutos. Luego, las células se bloquearon con 40 µl de solución de bloqueo durante 1 hora a 37 °C en cámara de humedad y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal de ratón contra PKCα (2 µg / mL; sc-8393; Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo policlonal de conejo contra el RP total (2 µg / ml; sc-7208; Santa Cruz Biotechnology). Para detectar los anticuerpos primarios, las sondas de proximidad contra conejo y ratón (sonda PLA de conejo PLUS y sonda PLA de ratón MINUS, Olink Bioscience) se diluyeron 1:15 y 1: 5 en solución de bloqueo, respectivamente. Las células se incubaron con la solución de sondas de proximidad durante 1 hora a 37 °C, se lavaron tres veces con buffer Tris 50 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05% (TBS-T) y se incubaron en solución de hibridación con oligonucleótidos de conexión (Olink Bioscience) durante 45 minutos a 37°C. Las muestras se lavaron con TBS-T y posteriormente se incubaron en la solución de ligación durante 45 minutos a 37°C. Esta solución contenía ADN ligasa T4 (Fermentas), lo que permitió la unión de las sondas de proximidad secundarias y oligonucleótidos de conexión para formar una cadena de ADN circular si existe una proximidad de los anticuerpos menor a 40 nm. Posteriormente, las muestras se lavaron en TBS-T y se incubaron con la solución de amplificación, que contenía ADN polimerasa phi29 (Fermentas) para la amplificación del

ciclo de rodillos durante 90 minutos a 37°C y se lavaron tres veces con TBS-T. Finalmente, las muestras se incubaron con la solución de mezcla de detección (que contiene sondas de detección marcadas con rojo Texas que reconocen el producto amplificado, Olink Bioscience) durante 1 hora a 37°C, se lavaron dos veces en buffer SSC-T (NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM, 0.05% Tween-20, pH 7). Posteriormente, los pozos se cubrieron con medio de montaje de fluorescencia (Biocare Medical, EE. UU.) y un cubreobjetos. Se tomaron imágenes por microscopia confocal. Las señales positivas para PLA se cuantificaron usando el software MetaMorph. Para cada condición experimental se midieron al menos 30 núcleos.

### **8.9 Extracción de ARN y RT-qPCR**

Para evaluar el efecto de LPA en la expresión génica inducida por RP, evaluamos la expresión de *VEGF* y *EGFR* 24 h después de la estimulación con LPA o P4. Se sembraron 200,000 células/ pozo de las células U251 en placas de seis pozos. 24 h antes del tratamiento, el medio se cambió por DMEM libre de rojo fenol suplementado con 10% de SFB filtrado con carbón vegetal y dextrano. Posteriormente, las células se trataron durante 24 h con LPA (100 nM), P4 (10 nM), RU486 (1 µM), P4/RU486 y LPA/RU486. Las células se lavaron con PBS y se añadió el reactivo TRIzol® LS (Invitrogen, CA, EE. UU.) para remover las células de la placa. La extracción de ARN se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante por el método de fenol-guanidina isotiocianato-cloroformo. Después de la extracción, la cantidad y pureza de ARN se midió con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.). Además, la integridad óptima del ARN se evaluó mediante la electroforesis de 1 µg de ARN total en un gel de agarosa al 1% en buffer de 0.5 X TB. El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total con la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, CA, EE. UU.) y el oligonucleótido (dT) 12-18 Primer (Invitrogen, MA, EE. UU.) según el protocolo del fabricante. Se utilizaron 2 µL de dicha reacción para determinar la expresión de *VEGF*, *EGFR* o el gen ribosómico *18S* como control de expresión mediante qPCR con LightCycler® FastStar DNA Master SYBR Green I y LightCycler 1.5 (Roche Molecular Systems, IN, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las secuencias de oligonucleótidos fueron: 5'-CCACACCATCACCATCGACA-3' cebador *VEGF* directo, 5'-CCAATTCCAAGAGGGACCGT-3' cebador *VEGF* inverso (fragmento amplificado de 153 pb); 5'-GCCTTGACTGAGGACAGGCAT-3' cebador *EGFR* directo, 5'-TGGTAGTGTGGGTCTCTGCT-3' cebador *EGFR* inverso (fragmento amplificado

de 152 pb); 5'-AGTGAAACTGCAATGGCTC-3' cebador 18S directo, 5'-CTGACCGGGTTGGTTTTGAT-3' cebador 18S inverso (fragmento amplificado de 167 pb). Se realizó una reacción sin transcriptasa reversa como control negativo. La expresión relativa de los genes estudiados se calculó con el  $2^{-\Delta CT}$  (Pfaffl, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). Se realizó un ANOVA unidireccional junto con una prueba de Tukey para determinar las diferencias estadísticas entre tratamientos en el software GaphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, CA, EE. UU.).

### **8.10 Análisis estadístico**

Todos los datos se analizaron y graficaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0 para Windows XP (GraphPad Software, EE. UU.). El análisis estadístico de grupos comparables se realizó utilizando un ANOVA de una vía con un post-test de Bonferroni. Un valor de  $P = 0.05$  o menor se consideró estadísticamente significativo como se indica en las leyendas de las figuras.

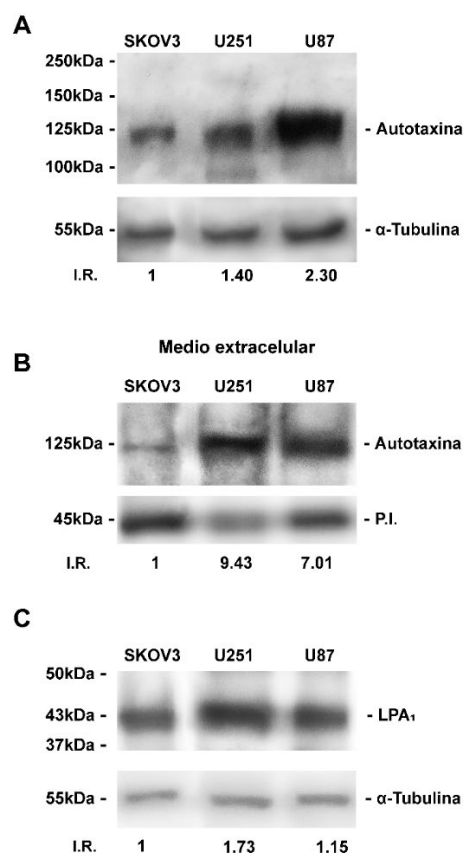
## **9 RESULTADOS**

### **9.1 Las líneas celulares derivadas de GBM expresan autotaxina y el receptor LPA<sub>1</sub>**

La enzima ATX es la vía principal por la cual el LPA se produce en condiciones fisiológicas y en algunas patológicas. Nuestros resultados muestran un aumento de 2.30 y 1.40 veces en el contenido de ATX en la líneas celulares U87 y U251, respectivamente, en comparación con SKOV3 (Figura 8A), una línea celular de ovario que expresa alto contenido de esta enzima y el receptor LPA<sub>1</sub> (Kishi et al., 2006; Seo et al., 2016). También evaluamos el contenido de ATX en el medio de cultivo de las líneas celulares, éstas presentaron un aumento de 9.43 y 7 veces, respectivamente, en comparación con la ATX detectada en la línea celular SKOV3 (Figura 8B).

El contenido de LPA<sub>1</sub> también se encontró aumentado en las células U251 y U87 (1.73 y 1.15 veces más, respectivamente) en comparación con el contenido de la proteína en la células SKOV3 (Figura 8C).

La expresión de ATX y de los receptores para LPA se había reportado anteriormente para las líneas celulares U251 y U87 a nivel de ARNm (S. Y. Lee et al., 2008; Seo et al., 2016) pero no se había demostrado a nivel de proteína.

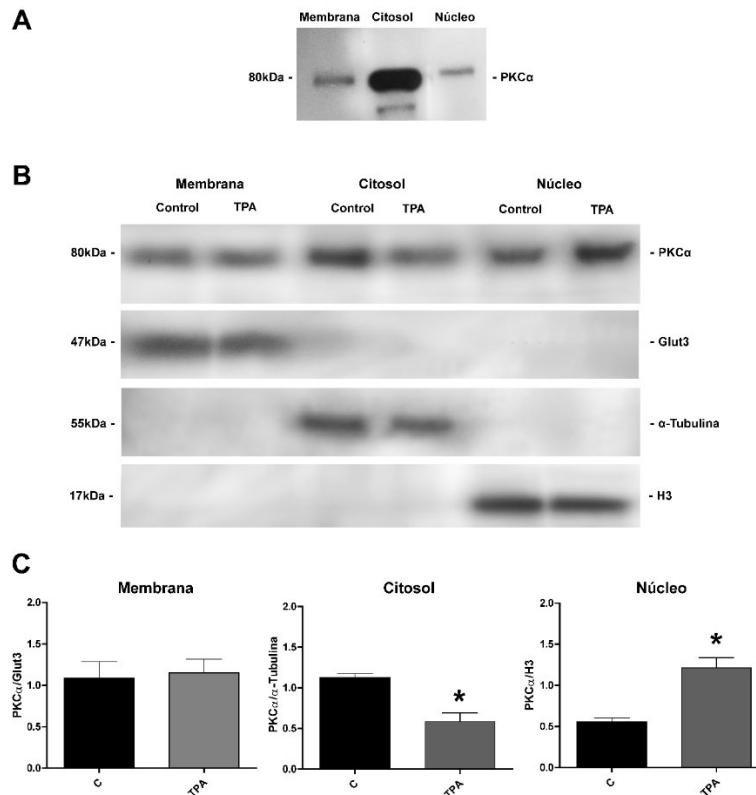


**Figura 8. Las líneas celulares de glioblastoma expresan un alto contenido de autotaxina y LPA<sub>1</sub>.** A) Western Blot representativo del contenido de autotaxina en líneas celulares de glioblastoma (U251 y U87) y SKOV3. B) Western Blot representativo para el contenido de autotaxina secretada al medio extracelular en líneas celulares de glioblastoma (U251 y U87) y SKOV3. P.I.: proteína inespecífica tomada con fines de cuantificación. C) Western Blot representativo para el contenido de LPA<sub>1</sub> en líneas celulares de glioblastoma (U251 y U87) y SKOV3. I.R. (Incremento relativo). Todos los blots son representativos de dos experimentos independientes.

## 9.2 Concentraciones bajas de LPA inducen la translocación nuclear de PKC $\alpha$

Para evaluar el efecto del LPA en la activación de PKC $\alpha$  determinamos la translocación de la cinasa; el tratamiento con el éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) se utilizó como control positivo de la activación de PKC $\alpha$ . Las células de GBM se trataron con 1  $\mu$ M de TPA y, después de 5 minutos de estimulación, se midió la translocación de PKC $\alpha$  a la membrana celular, el citosol y el núcleo. Nuestros resultados muestran que PKC $\alpha$  se localiza principalmente en el citosol en condiciones basales (Figura 9A), pero se traslada al

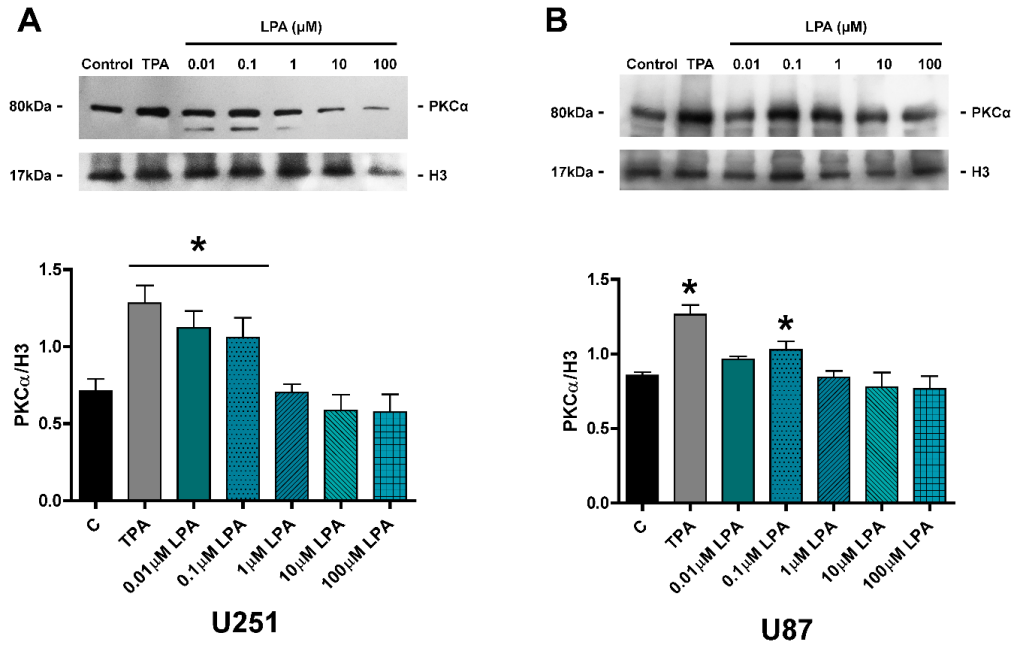
núcleo a los 5 min después de la estimulación con TPA, y no así a la membrana celular en la línea U251 (Figura 9B-C).



**Figura 9. TPA induce la translocación de PKCα al núcleo.** A) Western Blot representativo de la distribución celular de PKCα en condiciones control en las diferentes fracciones celulares de la línea U251. B) Western Blots representativos del contenido de PKCα en la membrana celular, citosol y núcleo después de 5min de estimulación con TPA (1μM) (Control (C): DMSO 1%); el transportador Glut3, α-tubulina e histona 3 (H3) se utilizaron como proteínas específicas para cada compartimento. C) Representación gráfica de 3 experimentos independientes. Para la cuantificación se comparó PKCα de cada compartimento con su proteína específica. Los resultados se expresan como la media ± E.E.M., la diferencia estadística se determinó con ANOVA y un post-test de Bonferroni, \* $P < 0.05$  con respecto al control.

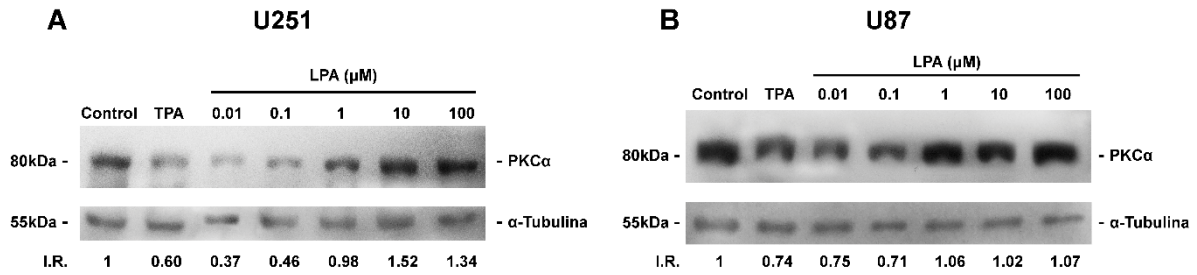
Para estudiar si LPA induce la translocación de PKCα probamos el efecto de diferentes concentraciones de LPA durante 5 minutos en ambas líneas en la fracción nuclear (Figura 10).

## Fracción Nuclear



**Figura 10. LPA induce la translocación nuclear de PKC $\alpha$  en células de glioblastoma.** Las células se trataron con TPA (1  $\mu$ M) o con diferentes concentraciones de LPA (0.01  $\mu$ M - 100  $\mu$ M) durante 5 minutos en la línea U251 (A) o U87 (B). Paneles superiores: Western Blots representativos de fracciones nucleares. Paneles inferiores: representación gráfica de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M., la diferencia estadística se determinó con ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \* $P < 0.05$  con respecto al control.

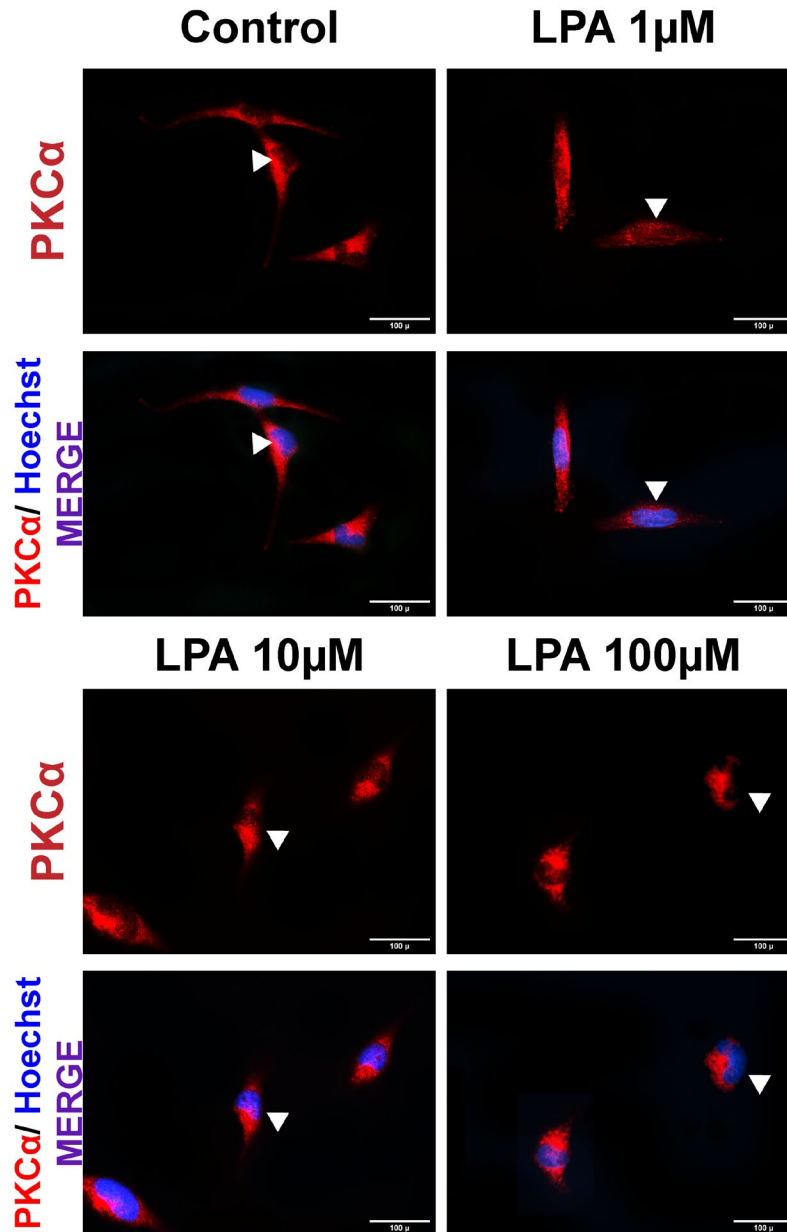
Resulta interesante que en la línea U251 las concentraciones de 0.01 y 0.1  $\mu$ M de LPA (10 y 100 nM) indujeron una translocación significativa de PKC $\alpha$  al núcleo en comparación con el control, mientras que en U87 se observó la translocación de PKC $\alpha$  al núcleo con 0.1  $\mu$ M de LPA. También evaluamos el contenido de PKC $\alpha$  en el citosol, que mostró el resultado opuesto (Figura 11).



**Figura 11. Bajas concentraciones de LPA disminuye el contenido de PKC $\alpha$  en el citosol.** Western Blots representativos del contenido citosólico de PKC $\alpha$  después de 5min de estimulación con TPA (1 $\mu\text{M}$ ) o LPA (0.01 $\mu\text{M}$  - 100 $\mu\text{M}$ ) en las líneas celulares A) U251 y B) U87. I.R. (Incremento relativo). Los Blots son representativos de 2 experimentos independientes.

Las bajas concentraciones de LPA disminuyeron el contenido de PKC $\alpha$  en el citosol, mientras que una concentración más elevada mantuvo el contenido de la cinasa similar al control en esta fracción celular. Es importante señalar que las concentraciones 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de LPA no indujeron la translocación de PKC $\alpha$  a la membrana celular a los 5min de estimulación (Figura 12).

# U251



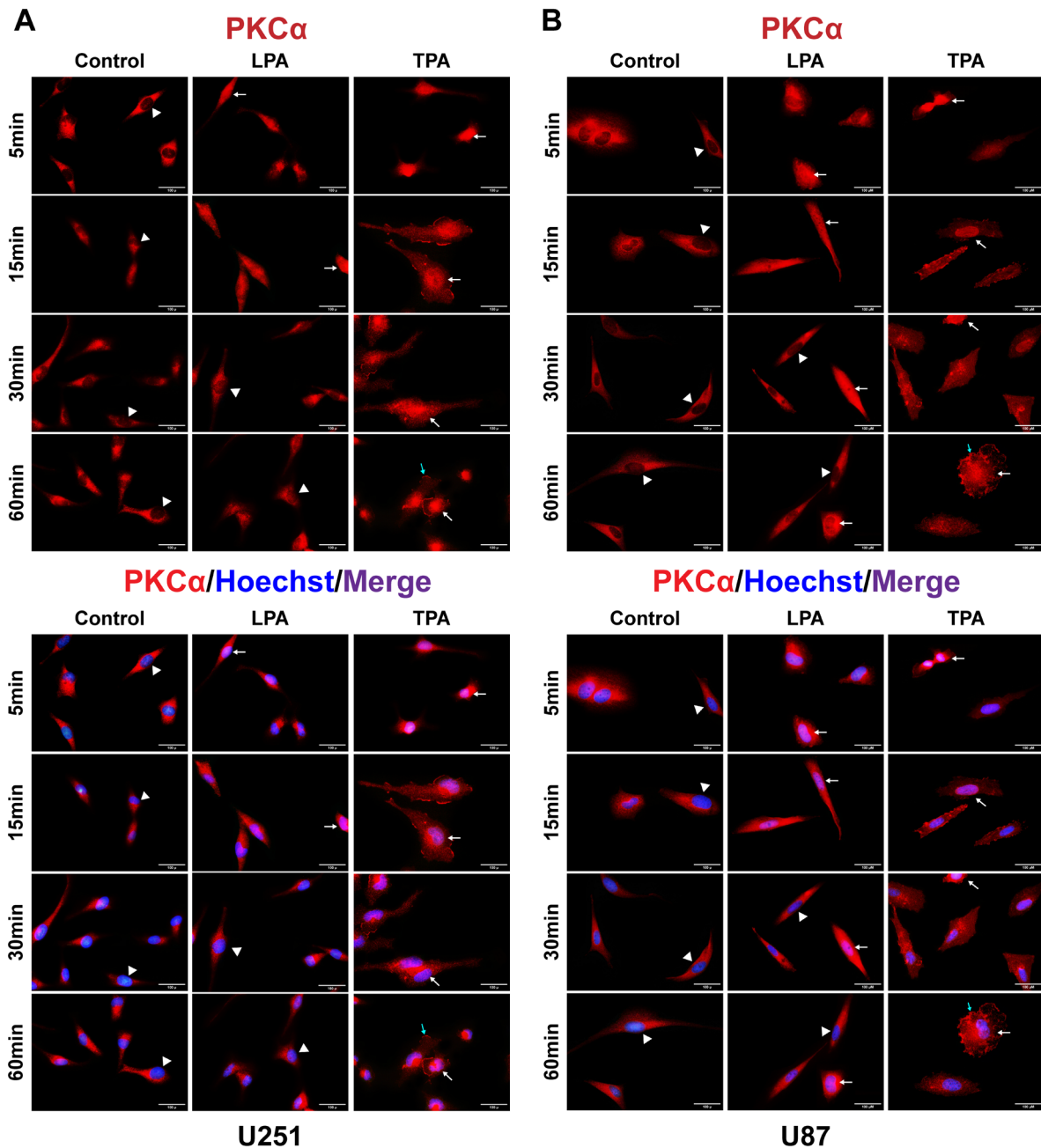
**Figura 12. Efecto en la localización de PKCα inducida por LPA a altas concentraciones.** Paneles superiores: localización de PKCα (Rojo) a 5min de estimulación con 1, 10 y 100 μM de LPA en la línea celular U251. Paneles inferiores: núcleos (Azul), merge (Púrpura). Imágenes representativas de 2 experimentos independientes. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 60x. Barra de escala = 100μ. Las cabezas de las flechas indican el núcleo vacío. Se muestra una punta de flecha por imagen para evitar la saturación de ésta.



### **9.3 El LPA no induce la translocación de PKC $\alpha$ a la membrana celular en las células de GBM**

Se sabe que PKC $\alpha$  se transloca a membranas después de su activación ya que se une a lípidos como DAG y PS. Por lo anterior, nos interesaba estudiar si esta translocación dependía del tiempo de activación de la cinasa por LPA. Evaluamos el efecto de 100 nM de LPA en la translocación de PKC $\alpha$  a los 5, 15, 30 y 60 min. Elegimos 100 nM de LPA ya que esta concentración indujo una translocación nuclear de PKC $\alpha$  similar en ambas líneas. Asimismo, decidimos comparar el efecto de LPA contra TPA debido a que en diversos estudios es el activador de PKC $\alpha$  más comúnmente utilizado para comprender sus efectos en la biología celular.

Notablemente, el efecto en la translocación de PKC $\alpha$  a través del tiempo difiere dependiendo de su activador (Figura 13). El LPA indujo la translocación nuclear de la cinasa a 5 y 15 min en ambas líneas celulares; posteriormente, PKC $\alpha$  se redistribuyó al citosol a 30 y 60 min pero sin acumulación en la membrana celular. Por otro lado, el TPA indujo una translocación de la proteína al núcleo a los 5 minutos después del tratamiento. Sin embargo, a los 15, 30 y 60 min de estimulación, aunque se pudo detectar a PKC $\alpha$  en el núcleo, también se detectó en la membrana celular. Nuestros resultados muestran que LPA promueve una translocación nuclear de PKC $\alpha$ , no una translocación a la membrana, en líneas celulares de glioblastoma.

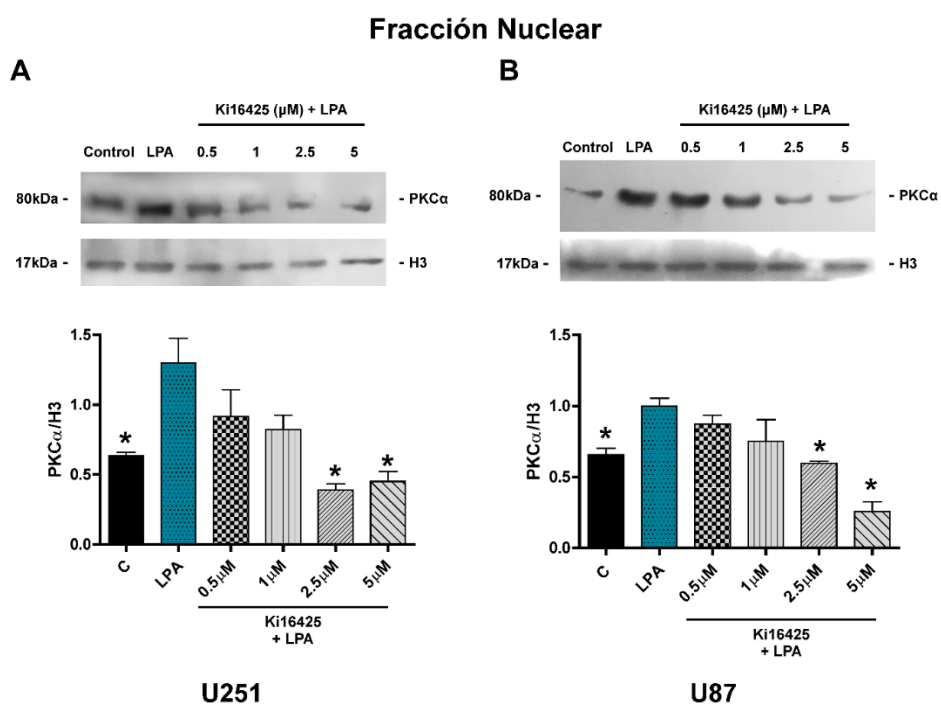


**Figura 13. Translocación temporal de PKC $\alpha$  inducida por LPA y TPA en células de glioblastoma.** Translocación de PKC $\alpha$  con respecto al tiempo en las líneas A) U251 y B) U87 tratadas con LPA (100 nM) y TPA (1  $\mu$ M). Parte superior: PKC $\alpha$  (Rojo), Parte inferior: Hoechst (Azul), Merge (Púrpura). Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 60x. Barra de escala = 100  $\mu$ m. Las cabezas de flecha blanca indican un núcleo vacío, las flechas indican un núcleo ocupado con PKC $\alpha$ , la flecha azul indica la acumulación de PKC $\alpha$  en la membrana. Se muestra sólo una punta de flecha o flecha por imagen para evitar la saturación de ésta.

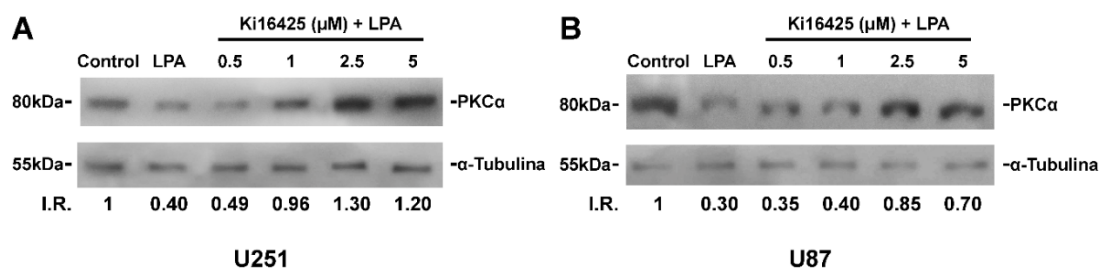
#### 9.4 Ki16425 inhibe la translocación nuclear de PKC $\alpha$ en GBM

Como se mencionó anteriormente, el LPA puede llevar a cabo sus efectos a través de varios GPCR. Para determinar si la translocación nuclear de la cinasa inducida por LPA fue a través de LPA<sub>1</sub>, utilizamos un antagonista de LPA<sub>1</sub> / LPA<sub>3</sub> denominado Ki16425.

Determinamos la concentración óptima de Ki16425 para inhibir la translocación nuclear de PKC $\alpha$ , evaluando el efecto del antagonista a diferentes concentraciones después de 5 min de estimulación con 100 nM de LPA (Figura 14). También evaluamos el contenido de la cinasa en el citosol después del uso de Ki16425 (Figura 15). Con los resultados determinamos que las concentraciones de 2.5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M de Ki16425 inhibieron la translocación nuclear PKC $\alpha$  en las líneas celulares de glioblastoma.

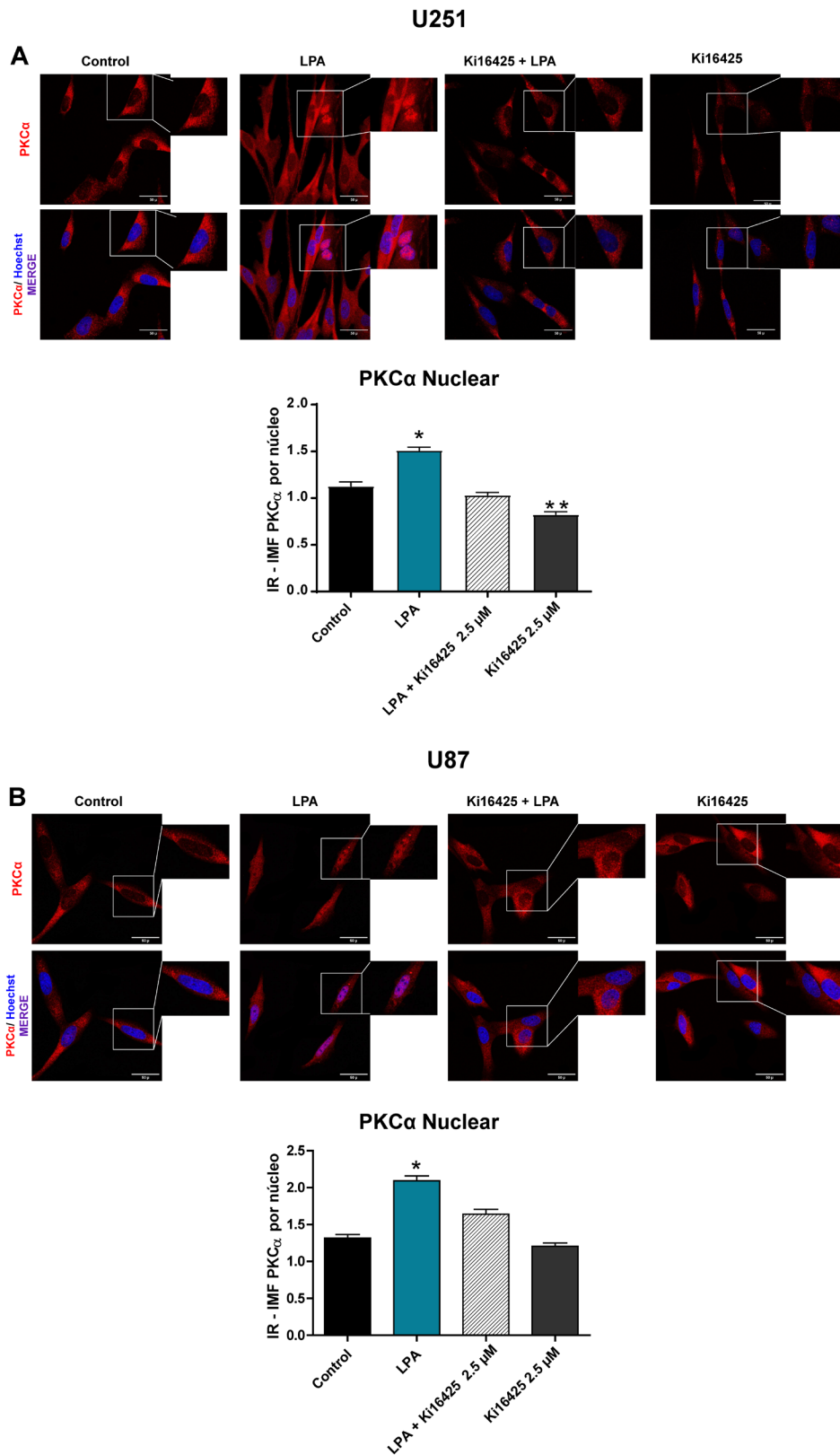


**Figura 14. Ki16425 antagoniza el efecto de LPA en la translocación nuclear de PKC $\alpha$ .** Las células tratadas con concentraciones crecientes de Ki16425 inhiben la translocación de PKC $\alpha$  al núcleo en las líneas A) U251 y B) U87 después de 5min de estimulación con LPA (100 nM). Paneles superiores: Western Blot representativo. Panel inferior: representación gráfica, los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de 3 experimentos independientes. La prueba estadística ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni determinó la diferencia estadística. \* $P < 0.05$  con respecto a LPA.



**Figura 15. Efecto antagónico de Ki16425 en el contenido de PKCα citosólico inducido por LPA.** Concentraciones crecientes de Ki16425 modulan el efecto de LPA sobre el contenido de PKCα en el citosol de las líneas A) U251 y B) U87. I.R. (Incremento relativo). Los Blots son representativos de 2 experimentos independientes.

Adicionalmente, la translocación de PKCα al núcleo se cuantificó en las células U251 y U87 después de la estimulación con 100 nM de LPA (15min) y/o 2.5 μM de Ki16425 utilizando microscopía confocal (Figura 16).

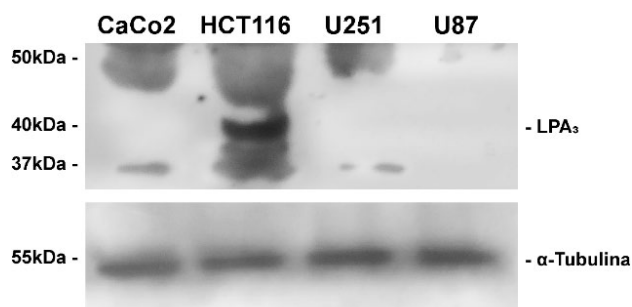


**Figura 16. Cuantificación de PKC $\alpha$  nuclear.** Panel superior: imágenes representativas de microscopía confocal de células A) U251 o B) U87 estimuladas con 100 nM de LPA por 15min y/o

2.5 $\mu$ M de Ki16425. Panel inferior: representación gráfica, los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de 3 experimentos independientes, se cuantificaron 150 núcleos por tratamiento. La prueba estadística de ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni determinó la diferencia estadística \* $P < 0.05$  con respecto al control, LPA + Ki16425 y Ki16425. \*\* $P < 0.05$  con respecto al control y LPA. Las fotografías se tomaron con un aumento de 20x y un zoom de 3.63 en un microscopio confocal Nikon A1R + STORM. Barra de escala = 100 $\mu$ .

Los resultados mostraron que tanto en U251 como en U87 el tratamiento con 100 nM de LPA después de 15 min induce una translocación significativa de PKC $\alpha$  al núcleo en comparación con el control y el antagonista del receptor LPA<sub>1</sub>, Ki16425, bloquea este efecto. De manera interesante, mientras que en U251 solo el uso de Ki16425 disminuye el contenido de PKC $\alpha$  con respecto al control, en U87 se mantiene al mismo nivel que el basal.

Posteriormente, el contenido de LPA<sub>3</sub> se evaluó en estas líneas celulares, ya que el antagonista no es específico de LPA<sub>1</sub> (Figura 17) y no existían reportes previos de este receptor en U251 y U87 a nivel de proteína.



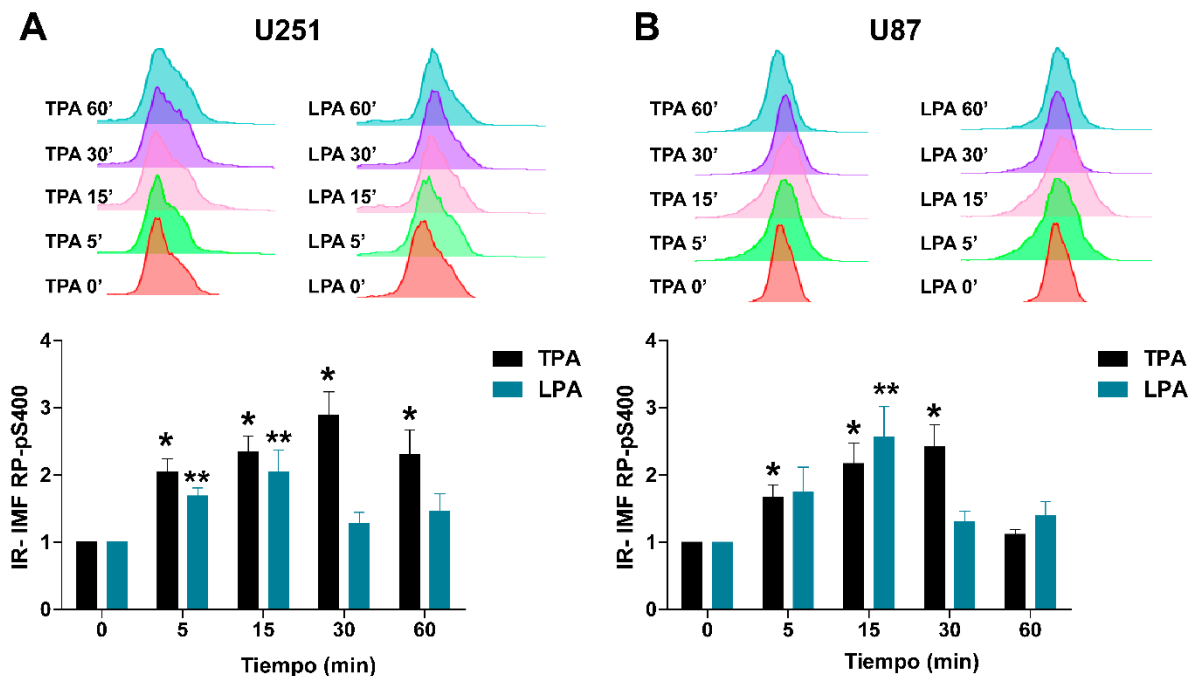
**Figura 17. Expresión de LPA<sub>3</sub> en líneas celulares de glioblastoma.** Western Blot representativo del contenido de LPA<sub>3</sub> en líneas celulares de glioblastoma (U251 y U87) en comparación con HCT116, como control positivo para el receptor y CaCo2 como control negativo.

Estos resultados demuestran la ausencia del receptor de LPA<sub>3</sub> en ambas líneas celulares, por lo que el efecto de LPA observado con respecto a la translocación de PKC $\alpha$  es inducido a través del receptor LPA<sub>1</sub>.

## 9.5 La vía de LPA/LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$ induce la fosforilación del receptor de progesterona en el residuo serina 400 (S400)

Anteriormente, nuestro grupo demostró que PKC $\alpha$  fosforila el RP en el residuo Ser 400 (González-Arenas et al., 2015). La fosforilación de RP en este residuo indujo un aumento en la proliferación, migración e invasión en células de glioblastoma (González-Arenas et al., 2015; Marquina-Sánchez et al., 2016), lo que sugiere un papel significativo de la señalización de PKC $\alpha$  en el núcleo a través de la activación de un receptor nuclear como el RP que contribuye al desarrollo tumoral (Germán-castelán et al., 2014; González-Arenas et al., 2015).

Por lo anterior, se evaluó mediante citometría de flujo si 100nM de LPA podía inducir la fosforilación del RP en el residuo de S400 durante 5, 15, 30 y 60 min utilizando TPA como activador positivo de PKC en las líneas U251 y U87 (Figura 18).

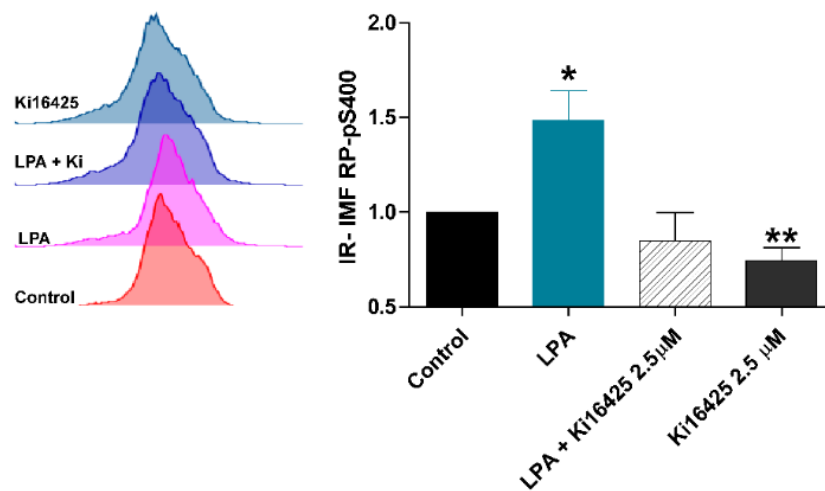


**Figura 18. LPA induce la fosforilación de RP (S400).** Paneles superiores: histogramas representativos de IMF (Intensidad media de fluorescencia) de las líneas celulares A) U251 y B) U87 estimuladas (5 a 60 min) con 100 nM de LPA o 1  $\mu$ M de TPA. Paneles inferiores: los valores se expresan como IMF relativa, calculada restando IMF del control de anticuerpo secundario y luego dividiéndolos por el IMF de T0 de cada experimento. Representación gráfica, los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de 3 experimentos independientes. La prueba estadística ANOVA

de una vía seguido de un post-test de Bonferroni determinó la diferencia. \*  $P < 0.05$ , con respecto al control, en las células estimuladas con TPA; \*\* $P < 0.05$ , con respecto al control, en células estimuladas con LPA.

Los resultados muestran que en U251 LPA induce un incremento en la fosforilación del RPs400 a los 5 y 15 minutos mientras que en U87 el pico de fosforilación se da a los 15 minutos. La estimulación con TPA se sostiene durante un mayor tiempo en ambas líneas celulares con respecto a LPA.

Posteriormente, utilizamos Ki16425 para antagonizar la actividad de LPA<sub>1</sub> a los 15min de estimulación con LPA en la línea U251 (Figura 19).



**Figura 19. La inhibición con Ki16425 disminuyen la fosforilación del RP.** Panel izquierdo: histograma representativo de IMF de la línea celular U251 con 100 nM de LPA (15 min) y/o 2.5µM de Ki16425. Panel derecho: los valores se expresan como IMF relativa. Representación gráfica, los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de 3 experimentos independientes. La prueba estadística ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni determinó la diferencia. \* $P < 0.05$ , con respecto al control y LPA + Ki16425; \*\* $P < 0.05$ , con respecto al control.

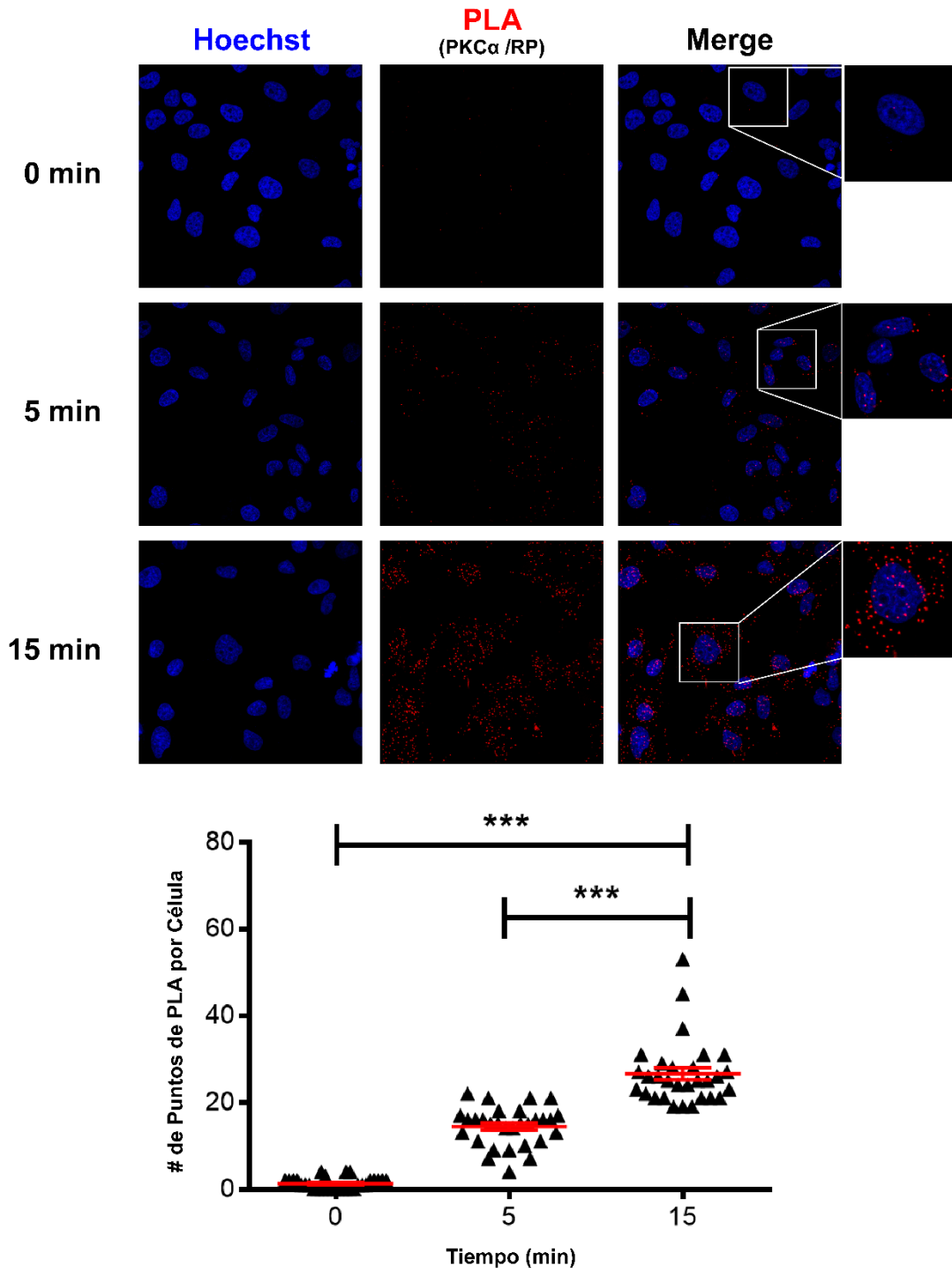
Los resultados muestran que la fosforilación de RPs400 se da a través del receptor LPA<sub>1</sub> ya que el antagonista bloquea el efecto de la fosforilación por LPA. Es interesante que Ki16425 por si solo induce una reducción en la fosforilación basal de RPs400, un efecto



similar al que se observa en esta misma línea celular cuando se cuantificó PKC $\alpha$  en el núcleo.

### **9.6 LPA induce la interacción de PKC $\alpha$ y el receptor a progesterona**

En un trabajo anterior de nuestro grupo se demostró que PKC $\alpha$  inmunoprecipita con el RP tanto total como fosforilado en el residuo S400 (González-Arenas et al., 2015). Por lo anterior, nos interesaba saber si PKC $\alpha$  y el RP podrían estar interaccionando directamente, por lo que evaluamos mediante un ensayo de ligación por proximidad (Proximity Ligation Assay; PLA) si estas proteínas podrían estar a menos de 40nm de distancia (Figura 20) (Fredriksson et al., 2002).



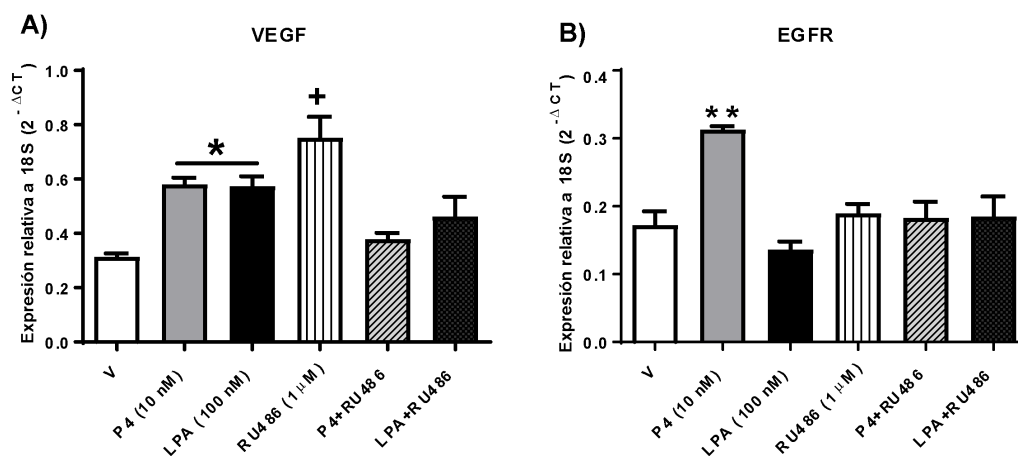
**Figura 20. LPA induce la interacción de PKC $\alpha$  y RP.** Panel superior: Imágenes representativas del ensayo de PLA. Los puntos rojos denotan la proximidad (distancia menor a 40nm) de PKC $\alpha$  y RP a los 0, 5 y 15 min de estimulación con 100 nM de LPA en la línea U251. Panel inferior: Representación gráfica, los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de 30 núcleos por condición. La prueba estadística ANOVA de una vía seguida por un post-test de Barlett determinó la diferencia. \*\*\* $P < 0.001$ , con respecto al control y 5 min.

Los resultados muestran que en la línea U251 la estimulación con LPA a 5 y 15 minutos induce la interacción proteína-proteína de PKC $\alpha$  y RP, con una mayor acumulación de interacciones a los 15 minutos. Asimismo, aunque el fenómeno es escaso existe una interacción basal de ambas proteínas.

### 9.7 LPA modula la expresión de *VEGF* pero no de *EGFR* en células de glioblastoma

Hasta este punto hemos demostrado que al activar LPA $_1$  con su ligando se induce una translocación de PKC $\alpha$  al núcleo a los 5 y 15 minutos, a estos tiempos la cinasa interacciona con el RP e induce su fosforilación en el residuo S400. Por lo anterior, quisimos probar si la vía LPA $_1$ /PKC $\alpha$ /RPPS400 era capaz de modular blancos del RP. Elegimos dos blancos conocidos de este receptor (*VEGF* y *EGFR*) que se modulan de diferente manera. Mientras que el promotor de *VEGF* contiene ERP en su promotor, así como sitios SP1 y AP1, el promotor de *EGFR* contiene solo sitios SP1.

Para evaluar si la vía modula la expresión de genes blanco de RP, medimos los ARNm por RT-PCR después de la estimulación por 24h con 10 nM de P4, 100 nM de LPA, 1  $\mu$ M de RU486 (modulador selectivo del RP) y la combinación de RU486 con P4 o LPA en la línea U251 (Figura 21).



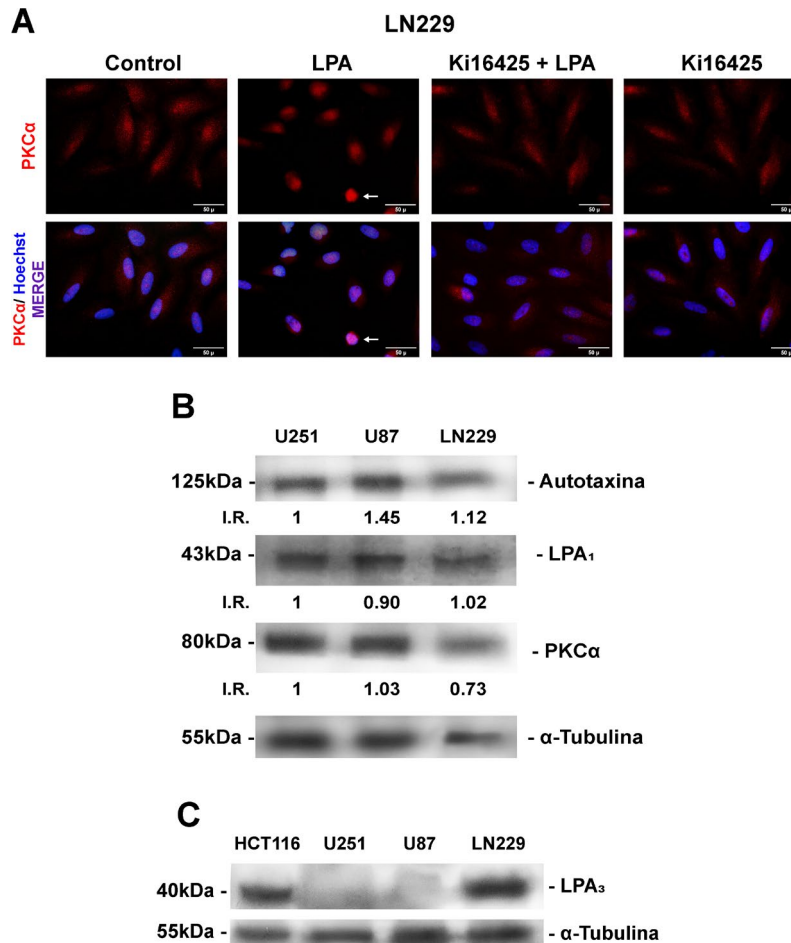
**Figura 21. LPA modula los niveles de ARNm de *VEGF* pero no *EGFR* en células de glioblastoma.** Las células U251 se trataron con P4, LPA, RU486 y los tratamientos conjuntos: P4 + RU486, LPA + RU486, o V (Vehículo; etanol al 0.1%) durante 24 h, posteriormente la expresión génica de A) *VEGF* y B) *EGFR* se determinó por RT-qPCR. Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M. de cada tratamiento, n = 4. La prueba estadística ANOVA de una vía seguido de un post-test

de Tukey determinó la diferencia estadística \*  $P < 0.02$  P4 y LPA vs V; +  $P < 0.009$  vs V, y tratamientos conjuntos; \*\*  $P < 0.01$  P4 vs todos los otros tratamientos.

Los resultados muestran que LPA es capaz de modular *VEGF* de manera similar que P4 después de 24 horas de estimulación. Los niveles de expresión de este mensajero se regulan a la baja cuando se combinan los estímulos con el modular selectivo de RP, RU486. Sin embargo, este modulador actúa como un agonista del receptor cuando se usa solo. En cuanto a los niveles de *EGFR* no se observa una regulación por LPA.

### **9.8 La vía de LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$ /RPPS400 se conserva en diversas líneas de glioblastoma**

Con el fin de observar la funcionalidad de la vía en diferentes líneas celulares elegimos estudiarla agregando una tercera línea celular (LN229) aunada a las ya estudiadas (U251 y U87). Primero evaluamos la translocación de PKC $\alpha$  al núcleo a los 15 minutos de estimulación con 100 nM de LPA y/o 2.5  $\mu$ M de Ki16425 en la línea LN229 (Figura 22A).



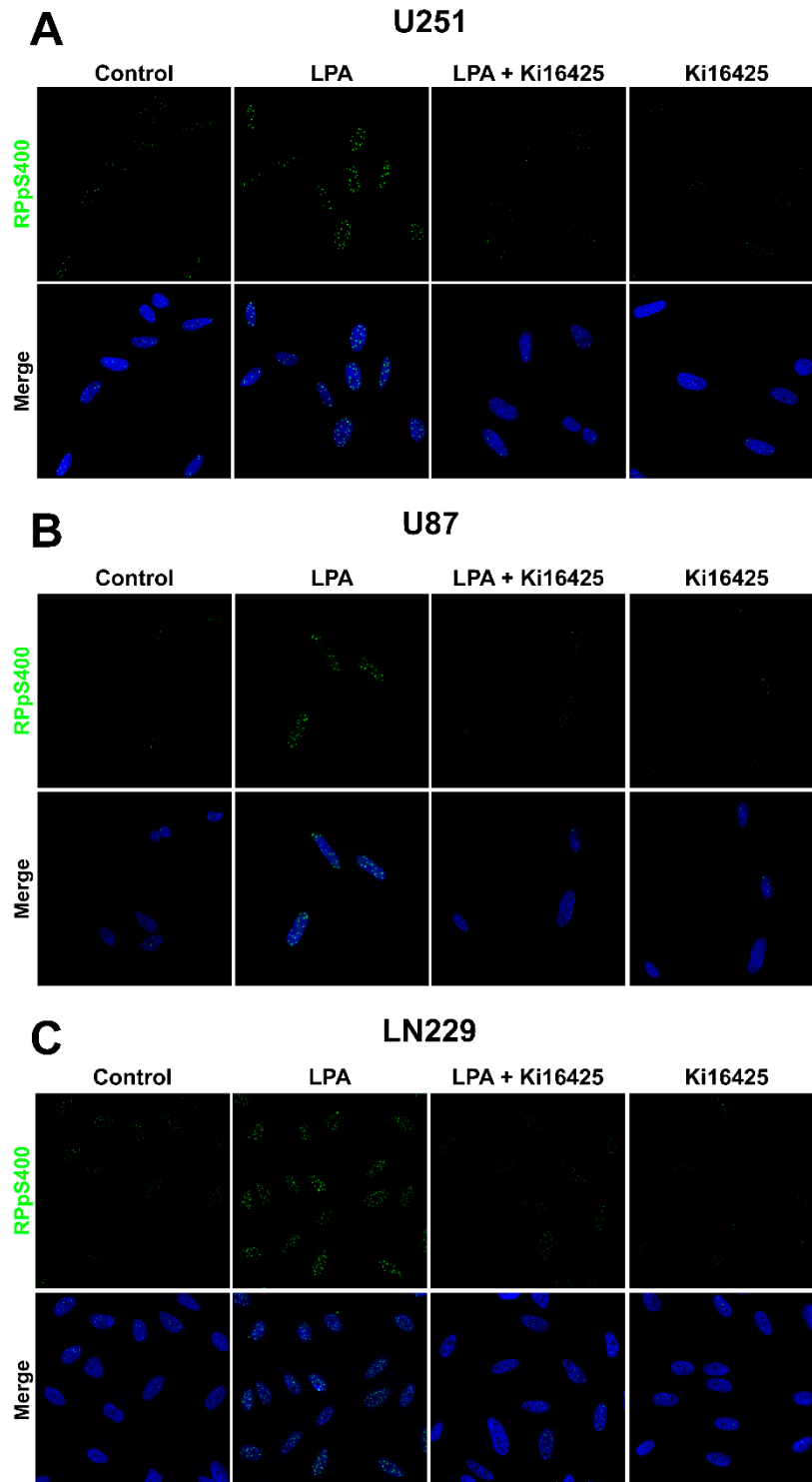
**Figura 22. Efecto LPA en la translocación nuclear de PKC $\alpha$  en la línea LN229.** A) Las células tratadas con Ki16425 (2.5  $\mu$ M) inhiben el efecto de LPA (100 nM) sobre la translocación nuclear de PKC $\alpha$  a 15min de estimulación en la línea LN229. PKC $\alpha$  (Rojo), Hoechst (Azul), Merge (Púrpura). Imágenes representativas de 2 experimentos independientes. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 60x. Barras de escala: 50  $\mu$ m. Las cabezas de flecha indican un núcleo vacío, las flechas indican un núcleo ocupado con PKC $\alpha$ . Se muestra sólo una punta de flecha o flecha por imagen para evitar la saturación de ésta. B) Western Blot representativo para la expresión de ATX, LPA<sub>1</sub> y PKC $\alpha$  en la línea celular de glioblastoma LN229 en comparación con U251 y U87. I.R. (Incremento relativo). Los Blots son representativos de 2 experimentos independientes. C) Western Blot representativo para el contenido de LPA<sub>3</sub> en la línea celular de glioblastoma LN229 en comparación con U251 y U87, y HCT116, como control positivo para el receptor.

Los resultados muestran que LN229 tiene PKC $\alpha$  distribuida tanto en citosol como en el núcleo en condiciones basales, pero la estimulación con LPA concentra esta cinasa en el núcleo y el tratamiento con Ki16425 bloquea este efecto en estas células (Figura 22A). La

línea celular LN229 también expresa ATX y LPA<sub>1</sub> de manera similar a U251, pero expresa un menor contenido de PKC $\alpha$  en comparación con U251 y U87 (Figura 22B).

El contenido del receptor de LPA<sub>3</sub> se analizó en la línea LN229 y se comparó con U251, U87 y HCT116 ya que la expresión de este GPCR no se había reportado previamente (Figura 22C). Los resultados confirman que las líneas celulares U251 y U87 no expresaron LPA<sub>3</sub>, mientras que LN229 expresa este receptor al igual que HCT116, una línea celular de carcinoma de colon, positiva para este receptor (Leve et al., 2015).

Posteriormente, evaluamos la fosforilación del RP en el residuo de S400 después 15 minutos de estimulación con 100 nM de LPA y/o 2.5  $\mu$ M de Ki16425 en las tres líneas celulares mediante inmunofluorescencia, lo que nos permitió no solo observar el RPPS400 sino también su localización celular (Figura 23).



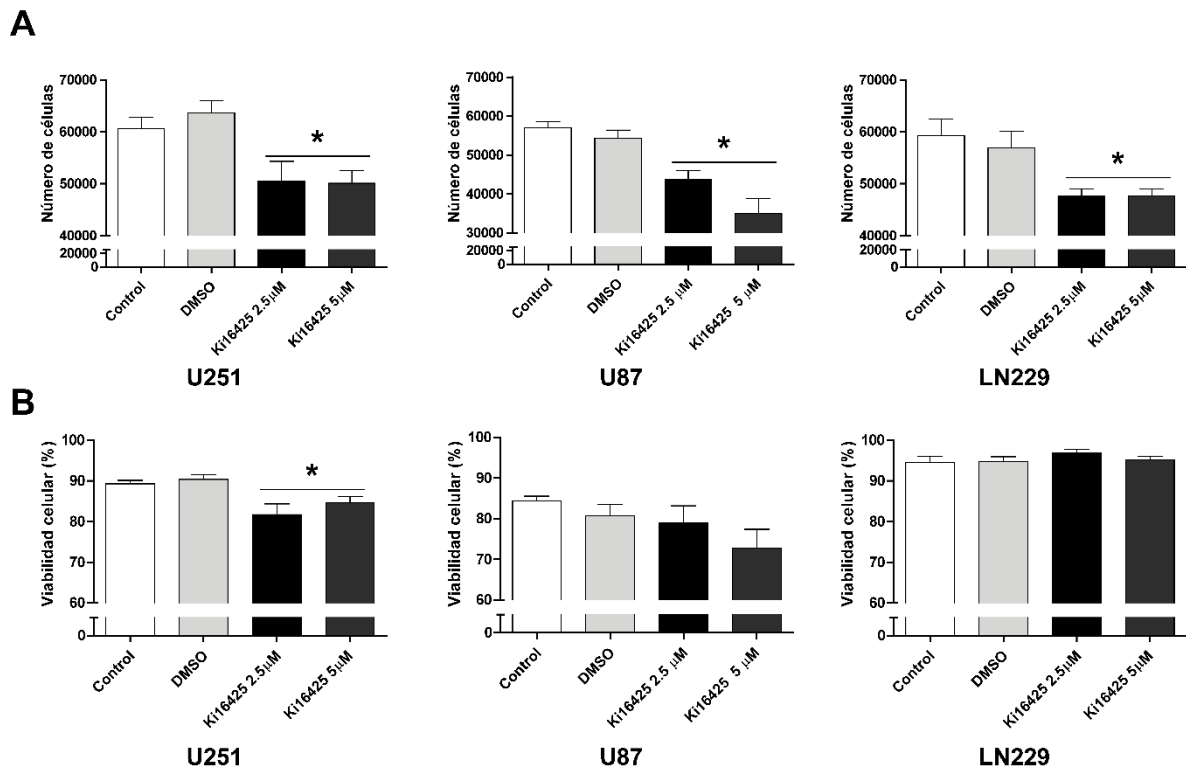
**Figura 23. Localización de RPsS400 en tres líneas celulares de glioblastoma.** Las células tratadas con Ki16425 (2.5 μM) inhiben el efecto de LPA (100 nM) sobre la fosforilación de RPsS400 a 15min de estimulación en las líneas de células de glioblastoma A) U251, B) U87 y C) LN229. RPsS400 (Puntos verdes), Hoechst (Azul). En las tres líneas celulares la señal del RPsS400 es

nuclear. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 60x.

Los resultados muestran que en las tres líneas celulares el LPA a los 15 minutos induce la fosforilación del RP en S400 y que la localización del receptor es nuclear. El Ki16425 bloquea este efecto en todas las líneas.

### 9.9 La inhibición de LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$ impacta en el número de células en GBM

Para evaluar si la translocación de PKC $\alpha$  inducida por LPA resulta en cambios significativos en la proliferación celular, evaluamos el papel de LPA<sub>1</sub> y PKC $\alpha$  en el número de células y la viabilidad de tres líneas celulares de glioblastoma. Estos ensayos se realizaron en presencia de 10% de SFB como fuente de LPA, el cual es un componente abundante del suero (Gaits et al., 1997; Y. Li et al., 2003).

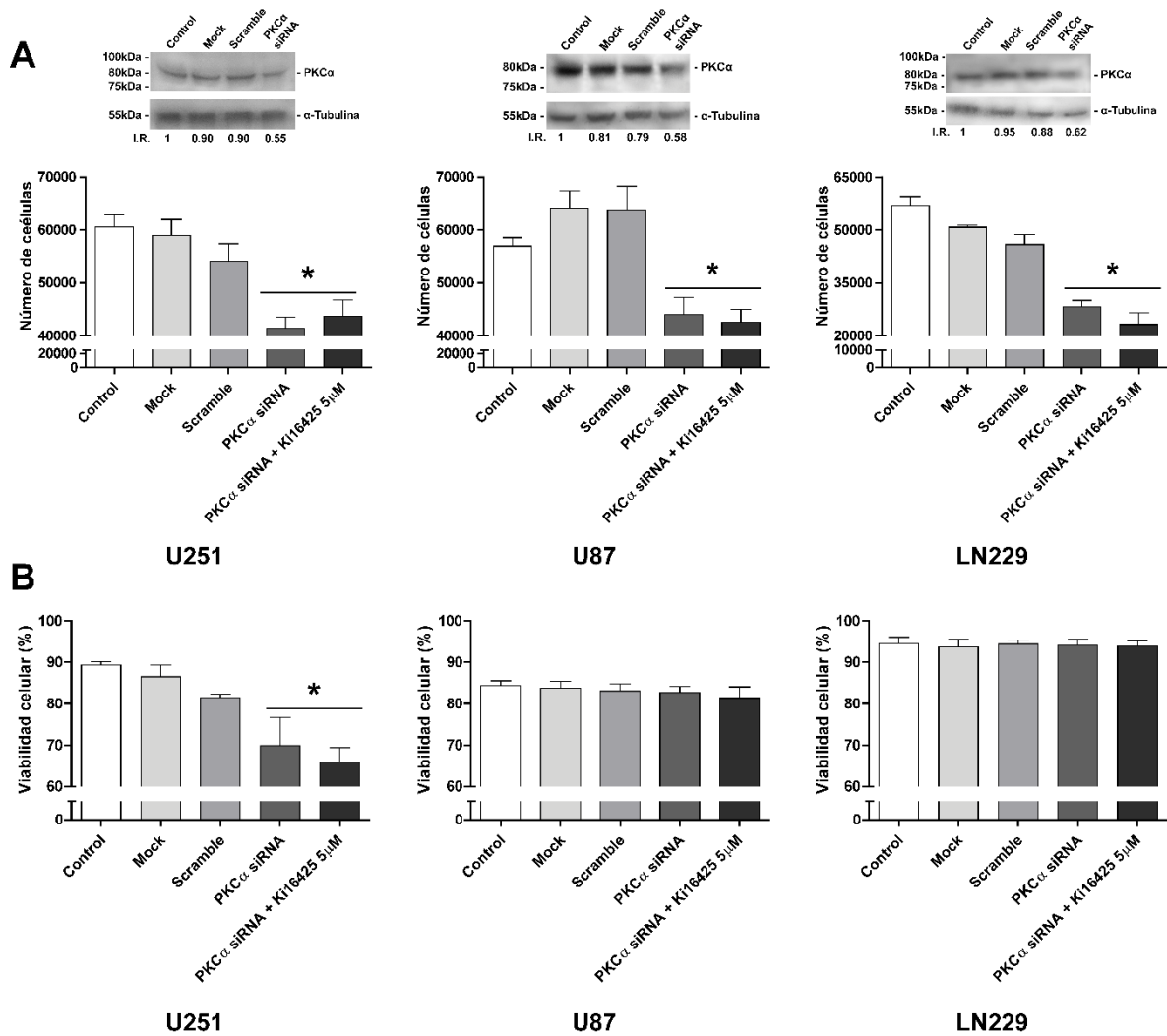


**Figura 24.** El bloqueo de LPA<sub>1</sub> impacta en el número de células en líneas celulares de glioblastoma. El número de células (A) y la viabilidad celular (B) en U251, U87 y LN229 se evaluaron



después de 24 horas de tratamiento con Ki16425 2.5 o 5  $\mu$ M. Los gráficos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 3 experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni determinó la diferencia estadística. \*  $P < 0.05$  con respecto al control y DMSO.

Después de 24 horas de tratamiento con Ki16425 para antagonizar la actividad del receptor LPA<sub>1</sub>, todas las líneas celulares mostraron un menor incremento en el número de células (Figura 24A) y sólo la línea celular U251 mostró una reducción en la viabilidad a este tiempo (Figura 24B). Para estudiar más a fondo el impacto de PKC $\alpha$  en el número de células y la viabilidad, silenciamos la expresión de esta cinasa con un siRNA en las tres líneas celulares. Observamos que el silenciamiento de PKC $\alpha$  el incremento del número de células es menor con respecto al control. No obstante la viabilidad en las líneas celulares U87 y LN229 (Figura 25A y B) no se ve afectada. Sin embargo, en la línea celular U251 ambos procesos presentaron un decremento (Figura 25A y B), esto puede implicar que en estas células LPA<sub>1</sub> y PKC $\alpha$  son relevantes para la proliferación y la supervivencia.



**Figura 25. El bloqueo de LPA<sub>1</sub> y PKC $\alpha$  reduce el número de células en líneas celulares de glioblastoma.** A) (Panel superior) las células U251, U87 y LN229 se transfectaron con un siRNA para PKC $\alpha$ ; control: células intactas; mock: células tratadas sólo con el reactivo de transfección sin siRNA; scramble: células transfectadas con una secuencia de ARN aleatoria. Se muestran Western Blots representativos para PKC $\alpha$  de células lisadas 72 horas después de la transfección de siRNA (silenciamiento). El número de células (panel inferior A) y la viabilidad celular (B) se evaluaron después del silenciamiento de PKC $\alpha$  o el silenciamiento de PKC $\alpha$  + 24h de tratamiento con Ki16425. Los cultivos celulares con mock, scramble, siRNA PKC $\alpha$  y siRNA PKC $\alpha$  + Ki16425 se recolectaron a las 96 h después de la transfección de siRNA. Los gráficos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 3 experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística de ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni determinó la diferencia estadística. \* $P < 0.05$  con respecto al control, mock y scramble.

La combinación de ambos tratamientos en las tres líneas celulares no tuvo un efecto sinérgico o aditivo sobre el número de células o la viabilidad (Figura 27A y B), lo que sugiere que LPA<sub>1</sub> y PKC $\alpha$  están en una vía común. No se puede descartar que los efectos que se observan en la línea LN229 sean una combinación de la señalización por LPA<sub>1/3</sub>.

## 10 DISCUSIÓN

En este trabajo, estudiamos tres líneas celulares de glioblastoma para analizar la activación de PKC $\alpha$  a través del LPA<sub>1</sub>. En primer lugar evaluamos el contenido de la enzima que produce LPA, ATX (Perrakis & Moolenaar, 2014), observamos que todas las líneas celulares tienen un alto contenido de esta enzima y la liberan a los medios de cultivo, lo que sugiere una producción aumentada de LPA que podría contribuir a la activación autocrina y paracrina de LPA<sub>1</sub>. Posteriormente, determinamos que LPA a bajas concentraciones (10 y 100 nM) induce la translocación nuclear de PKC $\alpha$  en la línea celular U251, mientras que solo 100 nM de LPA tiene el mismo efecto en U87, por otro lado a altas concentraciones como 1, 10 y 100  $\mu$ M no se observó ningún efecto. Un efecto similar de este lisofosfolípido se ha observado en la migración de líneas celulares GBM, donde 100 nM y 1  $\mu$ M de LPA indujeron una mayor migración en comparación con 10 y 100  $\mu$ M (Kishi et al., 2006). Estos resultados pueden explicarse por la concentración micelar crítica (CMC) de LPA; en agua pura, LPA tiene un CMC de 0.346 mM, pero a concentraciones altas de sal, la CMC disminuye dramáticamente hasta 0.06 mM (Z. Li et al., 2004). Es esencial tener esto en cuenta, ya que el medio de cultivo tiene abundantes sales y fosfatos que podrían reducir la CMC a concentraciones más bajas, por lo que no se ve el efecto con 1, 10 y 100  $\mu$ M de LPA, probablemente debido a la formación de micelas.

Demostramos que el LPA no induce de manera dependiente del tiempo la translocación de PKC $\alpha$  a la membrana celular en líneas celulares GBM. LPA indujo la translocación nuclear de PKC $\alpha$  de 5 a 15 minutos después de la estimulación que finalmente se redistribuyó al citosol de 30 a 60 minutos tanto en U251 y U87. Además, observamos que la translocación nuclear de PKC $\alpha$  está mediada por LPA<sub>1</sub> en las células U251 y U87, ya que no expresan LPA<sub>3</sub>, y el tratamiento con Ki16425 (el antagonista de LPA<sub>1</sub>) bloqueó la translocación nuclear de PKC $\alpha$ . De manera interesante, el uso de Ki16425 en ausencia de LPA disminuye el contenido basal de PKC $\alpha$  en el núcleo en U251 lo cual nos sugiere una producción autocrina del lisofosfolípido. Esta producción autocrina de LPA se ha demostrado anteriormente en otras líneas de GBM donde se observó que la ATX que producen las

células son capaces de hidrolizar LPC a LPA e inducir la migración de dichas líneas (Kishi et al., 2006). Por lo anterior, es probable que este fenómeno se de en las líneas celulares estudiadas en este trabajo, ya que también demostramos la producción y secreción de ATX.

Asimismo, en este trabajo determinamos que la activación de LPA<sub>1</sub> induce la fosforilación de RP en el residuo S400. El pico de fosforilación de RP en las células U251 y U87 se correlacionó con el tiempo en que PKC $\alpha$  se translocó al núcleo después de la activación de LPA<sub>1</sub>. Resulta interesante que el TPA y el LPA indujeron un patrón diferente de fosforilación del RP; TPA provocó la fosforilación sostenida, mientras que LPA solo a los 5 y 15 minutos en U251 y a los 15 minutos en U87. Estas diferencias podrían deberse a la forma en la que PKC $\alpha$  se activa; TPA induce una fuerte activación de PKC sin retroalimentación para su regulación (Lu et al., 1998). Por otro lado, LPA induce una cascada de señalización que media la desensibilización homóloga de LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> y LPA<sub>3</sub> (Alcántara-Hernández et al., 2015) a través de la misma PKC $\alpha$  que se refleja en una menor activación de la cinasa y la posterior fosforilación del RP. Es importante tener en cuenta las diferencias entre la translocación PKC $\alpha$  inducida por TPA o LPA, ya que puede haber conclusiones erróneas sobre esta activación de la cinasa en condiciones fisiológicas o patológicas cuando solo se usa TPA en el estudio.

Posteriormente, observamos que el antagonizar a LPA<sub>1</sub> disminuye la fosforilación del RP aún con el estímulo de LPA por 15 minutos. Esto resulta interesante ya que el fenómeno de fosforilación del RP y la translocación de PKC $\alpha$  al núcleo se dan en la misma ventana de tiempo en la línea U251.

Aunado a lo anterior, mediante el ensayo de PLA evaluamos si la interacción del RP con PKC $\alpha$  es directa. El ensayo de PLA *in situ* es un método para identificar la proximidad física de proteínas, donde solo se producirá una señal si las dos proteínas están a menos de 40 nm. La selectividad en los ensayos de PLA se potencia porque utiliza un doble reconocimiento, primero por dos anticuerpos contra las proteínas deseadas y posteriormente por anticuerpos secundarios conjugados con oligonucleótidos. Lo anterior proporciona una alta selectividad de detección de proteínas, ya que la unión de una sola sonda de proximidad no es suficiente para generar la señal necesaria para la detección, reduciendo los falsos positivos (Fredriksson et al., 2002).

En este trabajo, el ensayo mostró que a los 5 y 15 minutos de activación con 100nM de LPA existe una proximidad del RP total y PKC $\alpha$  que incrementa con el tiempo. Esto nos sugiere

que ocurre una interacción directa de la cinasa con el receptor total que conlleva a la fosforilación de este último. Es interesante notar que la mayor interacción se ve a los 15 minutos en la línea U251, tiempo al cual ya hemos probado que se acumula la mayor cantidad de PKC $\alpha$  en el núcleo y se observa el pico de fosforilación del RPPS400. Además, es interesante notar que la localización de las interacciones son tanto en citoplasma como en el núcleo, lo que nos sugiere que la interacción de PKC $\alpha$ /RP en el citoplasma puede ser la responsable de llevar a la cinasa al compartimento nuclear.

Adicionalmente, quisimos probar si la vía LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$ /RPPS400 es capaz de modular la expresión de blancos del RP. Se demostró que la interacción de RP y PKC $\alpha$  incrementa con respecto al tiempo tanto en citosol como en núcleo. Se ha reportado que las PKC tienen como blanco a varias proteínas dentro del núcleo, incluyendo histonas, lamina, ADN topoisomerasa, PARP, CREB, p53, GAP-43, receptor de vitamina D3 y RP, entre otras (González-Arenas et al., 2015; Martelli et al., 2006; Trubiani et al., 2016). El trabajo previo de nuestro laboratorio en células de GBM reportó que la activación de PKC $\alpha$  aumentó la fosforilación de RP. Esta modificación indujo la actividad transcripcional del receptor que resultó en un aumento de la expresión del factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) (Marquina-Sánchez et al., 2016), un gen blanco de RP conocido, que induce la proliferación celular de GBM, así como un incremento en el ensayo de gen reportero con ERP (González-Arenas et al., 2015).

Otros genes implicados en la proliferación celular de glioblastomas son *EGFR* y *VEGF* que se regulan por el RP cuando este se activa con P4 (Hernández-Hernández et al., 2012). Por lo anterior, analizamos si la activación de RP por LPA podía modular los niveles de expresión de estos dos genes. Observamos que *VEGF* podía ser regulado a la alta a nivel del mensajero con LPA de manera similar a como es regulado por P4. Por otro lado, los niveles de *EGFR* no se vieron modificados cuando se estimularon las células con LPA pero si cuando se estimularon con P4.

Cuando se induce la fosforilación de RP río abajo de la activación de LPA<sub>1</sub>, *EGFR* y *VEGF* se regulan de manera diferencial. Esto puede deberse a que *VEGF* tiene sitios consenso de ERP además de sitios AP1 y SP1 en su promotor (Mueller et al., 2003; Tischer et al., 1991) por lo que la inducción de *VEGF* por la vía LPA<sub>1</sub>/RP podría estar modulada por ERP como se demostró anteriormente con un ensayo de gen reportero (González-Arenas et al., 2015). *EGFR* tiene sitios SP1 pero no tiene ERP canónicos, se sabe que RP puede activar MAPK o c-Src y que estas cascadas de señalización promueven fosforilaciones distintas a

la que S400 que pueden promover a que el RP se una a sitios SP1( por ejemplo, RPPS345 por MAPK) induciendo la transcripción de genes sin ERP (Hagan et al., 2012; Hudson et al., 1990; Lange et al., 2000). Esto también explica porque el uso de RU48 en ausencia de P4 o LPA no induce un incremento en *EGFR* como se observa en *VEGF*.

Por otro lado, si bien el modulador selectivo RU486 en presencia de P4 y LPA inhibe la expresión de *VEFG*; cuando se utiliza solo se observa un incremento en la transcripción. Esto puede deberse a que RU486 promueve la dimerización del RP así como su unión a ERP (Chen et al., 2014; Germán-castelán et al., 2014). Sin embargo depende de los dímeros que forme si los dímeros son transcripcionalmente activos o no. El RP tiene dos isoformas A y B, donde A es más corta que B por 164 amino ácidos en humanos (Camacho-Arroyo et al., 2017). Se ha observado que los dímeros de RU486 con RP A:A no inducen la transcripción, mientras que B:B si la inducen. Por otro lado, los dímeros A:B inhiben la transcripción y se sugiere que es el dímero unido a RU486 más común en células que responden a P4 (Germán-castelán et al., 2014; Sartorius et al., 1994). Por lo anterior, es posible que el uso único de RU486 induzca la formación de dímeros B:B que incrementen la actividad transcripcional de genes blanco de RP mientras que en presencia de P4 o LPA se induzcan dímeros A:B o A:A y por lo tanto se observe una inhibición del efecto en ambos casos. Por otro lado, RU486 también es un modulador del receptor de glucocorticoides por lo que podría inducir la transcripción de *VEGF* a través de dicho receptor al unirse a sitios AP1 y SP1 en el promotor del gen (G. Pagès & Pouysségur, 2005).

Estos resultados sugieren que la fosforilación de RP en S400 induce la transcripción de genes con ERP al contrario de otro tipo de modificaciones post traduccionales que pueden promover la transcripción de genes con sitios SP1 o AP1.

Posteriormente, evaluamos si la vía de  $LPA_1/PC\alpha/RPPS400$  se conservaba en más líneas celulares, ya que la descripción de la cascada de señalización se realizó principalmente en U251. Primero, observamos que  $PC\alpha$  se transloca al núcleo a los 15 minutos de estimulación en las líneas U251, U87 y LN229. Además, esta translocación es bloqueada por el uso de Ki16425, lo que nos sugiere que la translocación se debe a la señalización por el  $LPA_1$ . Aunque LN229 expresa  $LPA_3$ , muestra un patrón similar de translocación nuclear de la enzima después de los tratamientos con LPA y LPA + Ki16425 a los 15 minutos de estimulación. Es importante notar que en este trabajo utilizamos la especie LPA 18:1, que activan preferentemente  $LPA_1$ , mientras que  $LPA_3$  se activa con mayor afinidad

por 2-acil-LPA (18:2) (Valdés-Rives & González-Arenas, 2017). Sin embargo, no podemos descartar un posible efecto aditivo de LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>3</sub> en esta línea celular.

Adicionalmente, evaluamos la fosforilación y la localización del RP en el residuo S400. Observamos que en todas las líneas celulares LPA indujo la fosforilación de RPPS400, efecto que fue bloqueado por Ki16425. Si bien este efecto se le atribuye a LPA<sub>1</sub> en U251 y U87, no podemos descartar a LPA<sub>3</sub> en el caso de LN229. De manera muy interesante, si bien habíamos observado que la interacción del RP total y la cinasa puede darse en citoplasma y núcleo a los 15 minutos de estimulación con el lisofosfolípido la señal del RPPS400 es francamente nuclear. El RP total puede localizarse en citoplasma y núcleo en la mayoría de las células que lo expresan, sin embargo su actividad de factor de transcripción solo es posible cuando se encuentra el núcleo (Camacho-Arroyo et al., 2017). Por lo tanto, encontrar al RPPS400 solo nuclear se relaciona con la transcripción de diversos genes blanco que pueden impactar en la progresión de GBM como *PIBF* y *VEGF* anteriormente mencionados.

Debido a que los resultados anteriores indicaban la posible implicación de la vía LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$  en la proliferación celular, analizamos el efecto de bloquear la activación de LPA<sub>1</sub> a través de Ki16425 durante 24 h en el número de células y viabilidad en un contexto cercano al patológico al mantenerlas las líneas celulares derivadas de GBM en un medio completo (DMEM + 10% de SFB).

El ensayo mostró un menor incremento en el número de células de las tres líneas a 2.5 y 5  $\mu$ M de Ki16425. Esto nos lleva a plantear la hipótesis de que a pesar de la expresión de LPA<sub>3</sub> en LN229, LPA<sub>1</sub> puede ser la vía principal a través de la cual se regula el número de células, ya que las tres líneas celulares mostraron un menor incremento en el número de células en un 20% después del tratamiento con Ki16425 en comparación con el control. Resulta interesante que cuando PKC $\alpha$  fue silenciado en U251, U87 y LN229 no hubo un efecto aditivo o sinérgico con Ki16425. Estos datos sugieren que LPA<sub>1</sub> podría modificar el número de células preferentemente a través de la activación de PKC $\alpha$ . Vale la pena señalar que la ausencia de PKC $\alpha$  en LN229 disminuyó el número de células en un 50% menos en comparación con el control, mientras que U251 y U87 solo en un 30%. Esto podría deberse al menor contenido de PKC $\alpha$  en esta línea celular en comparación con U251 y U87, pero a una mayor dependencia de esta cinasa para la proliferación.

Por otro lado, la viabilidad celular no se vio afectada en U87 y LN229 con Ki16425 y / o el silenciamiento de PKC $\alpha$ , mientras que en U251 ambos tratamientos disminuyeron el porcentaje de células viables. Esto nos lleva a sugerir que hay una diferencia en cómo estas células regulan su número. En U251, la muerte celular puede aumentar después de bloquear LPA<sub>1</sub> y / o PKC $\alpha$ , mientras que en U87 y LN229 puede haber un efecto citostático. Diversos mecanismos podrían estar involucrados en la regulación del número de células, ya que se han documentado diferencias entre las líneas celulares GBM.

Las proteínas expresadas diferencialmente entre las células U251 y U87 están asociadas con la regulación del metabolismo del nucleótido de nicotinamida, el empalme de ARN, la glucólisis y las vías del metabolismo de las purinas (H. Li et al., 2016). Con respecto a esto, se ha observado la participación de PKC en la regulación del empalme de genes proapoptóticos en diferentes líneas celulares (Revil et al., 2007); la inhibición de estas enzimas induce el empalme alternativo de Bcl-x para generar la proteína Bcl-XS proapoptótica. Sin embargo, se necesita más investigación para establecer los mecanismos que regulan el número de células y la viabilidad en las células U251, U87 y LN229. Aunado a lo anterior, si bien demostramos que la vía LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$ /RPpS400 se activa en tres líneas celulares falta investigar si un bloqueo conjunto de LPA<sub>1</sub> y RPpS400 podría incrementar los efectos observados a 24 horas solo con el uso de Ki16425.

## 11 CONCLUSIONES

El LPA induce la activación de PKC $\alpha$  y su translocación al núcleo en tres líneas derivadas de glioblastoma.

La activación de esta cinasa es mediada por el receptor LPA<sub>1</sub>. La activación de LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$  induce la fosforilación del RP en el residuo S400.

La fosforilación de dicho residuo induce la actividad transcripcional del RP e incrementa la expresión de *VEGF*.

El bloqueo de la vía de señalización de LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$  resulta en un menor número de células, mientras que en una de las líneas también disminuye la viabilidad celular.



## 12 PERSPECTIVAS

Es necesario evaluar el efecto que tiene silenciar a PKC $\alpha$  en la fosforilación de RP en el residuo S400 ya que con este estudio se desconoce la proporción de la que es responsable PKC $\alpha$  con respecto a este receptor fosforilado debido a que es posible que no sea la única cinasa que lo fosforile.

Además, se propone evaluar el efecto de bloquear LPA<sub>1</sub> y RPPS400 en el número de células y viabilidad de las tres líneas estudiadas. Además de extender el tratamiento hasta 96h. Por otra parte, es necesario dilucidar si la disminución en el número de células se debe a un efecto en la proliferación o en la supervivencia celular.

Si bien en este trabajo se centró en la activación de PKC $\alpha$  por LPA<sub>1</sub>, es importante estudiar los efectos de LPA sobre la migración e invasividad, ambas características importantes en la progresión de GBM.

Adicionalmente, se espera llevar estos estudios a un modelo *in vivo* así como cultivos primarios derivados de pacientes para analizar la vía de LPA<sub>1</sub>/RP como posibles blancos terapéuticos.

### 13 REFERENCIAS

- Agnihotri, S., Burrell, K. E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T., & Zadeh, G. (2013). Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. In *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Vol. 61, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0203-0>
- Albers, H. M. H. G., Dong, A., van Meeteren, L. A., Egan, D. A., Sunkara, M., van Tilburg, E. W., Schuurman, K., van Tellingen, O., Morris, A. J., Smyth, S. S., Moolenaar, W. H., & Ovaa, H. (2010). Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(16), 7257–7262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001529107>
- Alcántara-Hernández, R., Hernández-Méndez, A., Campos-Martínez, G. A., Meizoso-Huesca, A., & García-Sáinz, J. A. (2015). Phosphorylation and internalization of lysophosphatidic acid receptors LPA1, LPA2, and LPA3. *PloS One*, *10*(10), e0140583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140583>
- Amisten, S., Braun, O. O., Bengtsson, A., & Erlinge, D. (2008). Gene expression profiling for the identification of G-protein coupled receptors in human platelets. *Thrombosis Research*, *122*(1), 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.08.014>
- An, S., Bleu, T., Hallmark, O. G., & Goetzl, E. J. (1998). Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(14), 7906–7910.
- Aoki, J., Inoue, A., & Okudaira, S. (2008). Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1781*(9), 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2008.06.005>
- Araki, M., Kitayoshi, M., Dong, Y., Hirane, M., Ozaki, S., Mori, S., Fukushima, N., Honoki, K., & Tsujiuchi, T. (2014). Inhibitory effects of lysophosphatidic acid receptor-5 on cellular functions of sarcoma cells. *Growth Factors*, *32*(3–4), 117–122. <https://doi.org/10.3109/08977194.2014.911294>
- Baker, D. L., Desiderio, D. M., Miller, D. D., Tolley, B., & Tigyi, G. J. (2001). Direct Quantitative Analysis of Lysophosphatidic Acid Molecular Species by Stable Isotope Dilution Electrospray Ionization Liquid Chromatography–Mass Spectrometry.

*Analytical Biochemistry*, 292(2), 287–295. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5063>

Bandoh, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H., & Inoue, K. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27776–27785.

Bandoh, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H., & Inoue, K. (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. *FEBS Letters*, 478(1–2), 159–165.

Benesch, M. G. K., Tang, X., Maeda, T., Ohhata, A., Zhao, Y. Y., Kok, B. P. C., Dewald, J., Hitt, M., Curtis, J. M., McMullen, T. P. W., & Brindley, D. N. (2014). Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice. *The FASEB Journal*, 28(6), 2655–2666. <https://doi.org/10.1096/fj.13-248641>

Benesch, M. G. K., Zhao, Y. Y., Curtis, J. M., McMullen, T. P. W., & Brindley, D. N. (2015). Regulation of autotaxin expression and secretion by lysophosphatidate and sphingosine 1-phosphate. *Journal of Lipid Research*, 56(6), 1134–1144. <https://doi.org/10.1194/jlr.M057661>

Callaerts-Vegh, Z., Leo, S., Vermaercke, B., Meert, T., & D'Hooge, R. (2012). LPA5 receptor plays a role in pain sensitivity, emotional exploration and reversal learning. *Genes, Brain, and Behavior*, 11(8), 1009–1019. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00840.x>

Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Cabrera-Muñoz, E., Hernández-Hernández, O. T., & González-Arenas, A. (2012). Role of Progesterone Receptor Isoforms in Human Astrocytomas Growth. In *Tumors of the Central Nervous System, Volume 5* (pp. 57–63). Springer.

Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Vázquez-Martínez, E. R., & Cerbón, M. (2017). Mechanism of Progesterone Action in the Brain. In *Hormones, Brain and Behavior* (Vol. 3, pp. 181–214).

Carmo, A. do, Balça-Silva, J., Matias, D., & Lopes, M. (2013). PKC signaling in glioblastoma. *Cancer Biology & Therapy*, 14(4), 287–294. <https://doi.org/10.4161/cbt.23615>

- Chandrika, G., Natesh, K., Ranade, D., Chugh, A., & Shastry, P. (2016). Suppression of the invasive potential of Glioblastoma cells by mTOR inhibitors involves modulation of NFκB and PKC-α signaling. *Scientific Reports*, 6, 22455. <https://doi.org/10.1038/srep22455>
- Chen, J., Wang, J., Shao, J., Gao, Y., Xu, J., Yu, S., Liu, Z., & Jia, L. (2014). The Unique Pharmacological Characteristics of Mifepristone (RU486): From Terminating Pregnancy to Preventing Cancer Metastasis. *Medicinal Research Reviews*, 34(5), 979–1000. <https://doi.org/10.1002/med.21311>
- Choi, J. W., & Chun, J. (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(1), 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.07.015>
- Choi, J. W., Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C.-W., Mutoh, T., Lin, M.-E., Teo, S. T., Park, K. E., & Mosley, A. N. (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 157–186.
- Chun, J., Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S., & Moolenaar, W. H. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 579 LP – 587.
- Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. (2008). *Nature*, 455(7216), 1061–1068.
- Contos, J. J. A., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., & Chun, J. (2000). Requirement for the LPA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13384–13389. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.13384>
- Contos, J. J. A., Ishii, I., & Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid receptors. *Molecular Pharmacology*, 58(6), 1188–1196.
- Contos, J. J. A., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M. A., Ye, X., Kawamura, S., Brown, J. H., & Chun, J. (2002). Characterization of LPA2 (Edg4) and LPA1/LPA2 (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to LPA2. *Molecular and Cellular Biology*, 22(19), 6921–6929.

- Diep, C. H., Daniel, A. R., Mauro, L. J., Knutson, T. P., & Lange, C. A. (2015). Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol*, *54*(2), R31-53.
- Dusaulcy, R., Rancoule, C., Grès, S., Wanecq, E., Colom, A., Guigné, C., van Meeteren, L. A., Moolenaar, W. H., Valet, P., & Saulnier-Blache, J. S. (2011). Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *Journal of Lipid Research*, *52*(6), 1247–1255.
- Fan, Q.-W., Cheng, C., Knight, Z. A., Haas-Kogan, D., Stokoe, D., James, C. D., McCormick, F., Shokat, K. M., & Weiss, W. A. (2009). EGFR signals to mTOR through PKC and independently of Akt in glioma. *Sci. Signal.*, *2*(55), ra4–ra4.
- Ferry, G., Tellier, E., Try, A., Grés, S., Naime, I., Simon, M. F., Rodriguez, M., Boucher, J., Tack, I., & Gesta, S. (2003). Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(20), 18162–18169.
- Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gústafsdóttir, S. M., Östman, A., & Landegren, U. (2002). Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nature Biotechnology*, *20*(5), 473–477.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0502-473>
- Fuller, C. E. (2016). *Infiltrative Astrocytomas (Diffuse Astrocytoma, Anaplastic Astrocytoma, Glioblastoma) BT - Atlas of Pediatric Brain Tumors* (A. M. Adesina, T. Tihan, C. E. Fuller, & T. Y. Poussaint (Eds.); pp. 25–41). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33432-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33432-5_4)
- Gaits, F., Fourcade, O., Le Balle, F., Gueguen, G., Gaigé, B., Gassama-Diagne, A., Fauvel, J., Salles, J.-P., Mauco, G., Simon, M.-F., & Chap, H. (1997). Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Letters*, *410*(1), 54–58. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00411-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00411-0)
- Germán-castelán, L., Manjarrez-marmolejo, J., González-Arenas, A., González-morán, M. G. M. G., & Camacho-arroyo, I. (2014). Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/393174>

- González-Agüero, G., Gutiérrez, A., González-Espinosa, D., Solano, J., Morales, R., González-Arenas, A., Cabrera-Muñoz, E., & Camacho-Arroyo, I. (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*, *32*(2), 129–135. <https://doi.org/10.1007/s12020-007-9023-0>
- González-Agüero, G., Ondarza, R., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., Camacho-Arroyo, I., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., & Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Research Bulletin*, *56*(1), 43–48. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00590-1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00590-1)
- González-Arenas, A., Peña-Ortiz, M. Á., Hansberg-Pastor, V., Marquina-Sánchez, B., Baranda-Ávila, N., Nava-Castro, K., Cabrera-Wrooman, A., González-Jorge, J., & Camacho-Arroyo, I. (2015). Pkca and pkcδ activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells. *Endocrinology*, *156*(3), 1010–1022. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1137>
- Gonzalez-Gil, I., Zian, D., Vazquez-Villa, H., Ortega-Gutierrez, S., & Lopez-Rodriguez, M. L. (2015). The status of the lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1R). *MedChemComm*, *6*(1), 13–23. <https://doi.org/10.1039/C4MD00333K>
- Grimm, S. L., Hartig, S. M., & Edwards, D. P. (2016). Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 428, Issue 19). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.020>
- Hagan, C. R., Daniel, A. R., Dressing, G. E., & Lange, C. A. (2012). Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *357*(1), 43–49.
- Harper, K., Arsenault, D., Boulay-Jean, S., Lauzier, A., Lucien, F., & Dubois, C. M. (2010). Autotaxin Promotes Cancer Invasion via the Lysophosphatidic Acid Receptor 4: Participation of the Cyclic AMP/EPAC/Rac1 Signaling Pathway in Invadopodia Formation. *Cancer Research*, *70*(11), 4634 LP – 4643.
- Hayashi, M., Okabe, K., Yamawaki, Y., Teranishi, M., Honoki, K., Mori, T., Fukushima, N., & Tsujiuchi, T. (2011). Loss of lysophosphatidic acid receptor-3 enhances cell migration in rat lung tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *405*(3), 450–454. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.051>

- Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R., & Chun, J. (1996). Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *The Journal of Cell Biology*, 135(4), 1071 LP – 1083.
- Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., & Camacho-Arroyo, I. (2012). Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1–2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.04.005>
- Hla, T., & Maciag, T. (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9308–9313.
- Hoelzinger, D. B., Mariani, L., Weis, J., Woyke, T., Berens, T. J., McDonough, W., Sloan, A., Coons, S. W., & Berens, M. E. (2005). Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia*, 7(1), 7–16.
- Hoelzinger, D. B., Nakada, M., Demuth, T., Rosensteel, T., Reavie, L. B., & Berens, M. E. (2008). Autotaxin: a secreted autocrine/paracrine factor that promotes glioma invasion. *Journal of Neuro-Oncology*, 86(3), 297–309. <https://doi.org/10.1007/s11060-007-9480-6>
- Hu, J.-G., Wang, X.-F., Zhou, J.-S., Wang, F.-C., Li, X.-W., & Lü, H.-Z. (2010). Activation of PKC-alpha is required for migration of C6 glioma cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 70, 239–245.
- Hudson, L. G., Thompson, K. L., Xu, J., & Gill, G. N. (1990). Identification and characterization of a regulated promoter element in the epidermal growth factor receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7536–7540.
- Igumenova, T. I. (2015). Dynamics and membrane interactions of protein kinase C. *Biochemistry*, 54(32), 4953–4968.
- Im, D. S., Heise, C. E., Harding, M. A., George, S. R., O'Dowd, B. F., Theodorescu, D., & Lynch, K. R. (2000). Molecular Cloning and Characterization of a Lysophosphatidic Acid Receptor, Edg-7, Expressed in Prostate. *Molecular Pharmacology*, 57(4), 753

LP – 759.

- Isakov, N. (2018). Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Seminars in Cancer Biology*, 48, 36–52.
- Ishii, I., Contos, J. J. A., Fukushima, N., & Chun, J. (2000). Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LPA1/VZG-1/EDG-2, LPA2/EDG-4, and LPA3/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Molecular Pharmacology*, 58(5), 895–902.
- Janssens, R., Boeynaems, J. M., Godart, M., & Communi, D. (1997). Cloning of a human heptahelical receptor closely related to the P2Y5 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(1), 106–112.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6895>
- Jongsma, M., Matas-Rico, E., Rzadkowski, A., Jalink, K., & Moolenaar, W. H. (2011). LPA is a chemorepellent for B16 melanoma cells: action through the cAMP-elevating LPA5 receptor. *PloS One*, 6(12), e29260.
- Kariagina, A., Aupperlee, M. D., & Haslam, S. Z. (2008). Progesterone receptor isoform functions in normal breast development and breast cancer. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 18(1).
- Kawagoe, H., Soma, O., Goji, J., Nishimura, N., Narita, M., Inazawa, J., Nakamura, H., & Sano, K. (1995). Molecular cloning and chromosomal assignment of the human brain-type phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase gene (PDNP2). *Genomics*, 30(2), 380–384. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.0036>
- Khalid, H., Shibata, S., Kishikawa, M., Yasunaga, A., Iseki, M., & Hiura, T. (1997). Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer*, 80(11), 2133–2140.
- Kihara, Y., Maceyka, M., Spiegel, S., & Chun, J. (2014). Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *British Journal of Pharmacology*, 171(15), 3575–3594. <https://doi.org/10.1111/bph.12678>
- Kim, J. J., Kurita, T., & Bulun, S. E. (2013). Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocrine Reviews*, 34(1), 130–162.



- Kishi, Y., Okudaira, S., Tanaka, M., Hama, K., Shida, D., Kitayama, J., Yamori, T., Aoki, J., Fujimaki, T., & Arai, H. (2006). Autotaxin Is Overexpressed in Glioblastoma Multiforme and Contributes to Cell Motility of Glioblastoma by Converting Lysophosphatidylcholine TO Lysophosphatidic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17492–17500. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601803200>
- Kohutek, Z. A., Redpath, G. T., & Hussaini, I. M. (2009). ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C- $\alpha$  dependent and promotes glioblastoma cell migration. *Journal of Neuroscience*, 29(14), 4605–4615.
- Kotarsky, K., Boketoft, Å., Bristulf, J., Nilsson, N. E., Norberg, Å., Hansson, S., Owman, C., Sillard, R., Leeb-Lundberg, L. M. F., & Olde, B. (2006). Lysophosphatidic Acid Binds to and Activates GPR92, a G Protein-Coupled Receptor Highly Expressed in Gastrointestinal Lymphocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(2), 619 LP – 628.
- Lai, Y.-J., Chen, C.-S., Lin, W.-C., & Lin, F.-T. (2005). c-Src-mediated phosphorylation of TRIP6 regulates its function in lysophosphatidic acid-induced cell migration. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 5859–5868.
- Lai, Y.-J., Lin, W.-C., & Lin, F.-T. (2007). PTPL1/FAP-1 negatively regulates TRIP6 function in lysophosphatidic acid-induced cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24381–24387.
- Lange, C. A., Shen, T., & Horwitz, K. B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(3), 1032–1037.
- Lee, C.-W., Rivera, R., Dubin, A. E., & Chun, J. (2007). LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4310–4317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610826200>
- Lee, C.-W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A. E., & Chun, J. (2006). GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23589–23597. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603670200>
- Lee, M., Choi, S., Halldén, G., Yo, S. J., Schichnes, D., & Aponte, G. W. (2009). P2Y5 is a

- Gα(i), Gα(12/13) G protein-coupled receptor activated by lysophosphatidic acid that reduces intestinal cell adhesion. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(4). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00191.2009>
- Lee, S. Y., Lee, H.-Y., Kim, S. D., Jo, S. H., Shim, J. W., Lee, H.-J., Yun, J., & Bae, Y.-S. (2008). Lysophosphatidylserine stimulates chemotactic migration in U87 human glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(1), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.117>
- Lee, Z., Cheng, C.-T., Zhang, H., Subler, M. A., Wu, J., Mukherjee, A., Windle, J. J., Chen, C.-K., & Fang, X. (2008). Role of LPA4/P2Y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5435–5445. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-03-0316>
- Leve, F., Peres-Moreira, R. J., Binato, R., Abdelhay, E., & Morgado-Díaz, J. A. (2015). LPA Induces Colon Cancer Cell Proliferation through a Cooperation between the ROCK and STAT-3 Pathways. *PLOS ONE*, 10(9), e0139094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139094>
- Li, H., Lei, B., Xiang, W., Wang, H. F. W., & Liu, Y. (2016). Differences in protein expression between the U251 and U87 cell lines. *Turk Neurosurg*, 1. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1>
- Li, Y., Gonzalez, M. I., Meinkoth, J. L., Field, J., Kazanietz, M. G., & Tennekoon, G. I. (2003). Lysophosphatidic acid promotes survival and differentiation of rat Schwann cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213244200>
- Li, Z., Mintzer, E., & Bittman, R. (2004). The critical micelle concentrations of lysophosphatidic acid and sphingosylphosphorylcholine. *Chemistry and Physics of Lipids*, 130(2), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.03.001>
- Lin, M.-E., Rivera, R. R., & Chun, J. (2012). Targeted deletion of LPA5 identifies novel roles for lysophosphatidic acid signaling in development of neuropathic pain. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(21), 17608–17617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330183>
- Liu, S., Umezū-Goto, M., Murph, M., Lu, Y., Liu, W., Zhang, F., Yu, S., Stephens, L. C., Cui, X., Murrow, G., Coombes, K., Muller, W., Hung, M.-C., Perou, C. M., Lee, A. V., Fang, X., & Mills, G. B. (2009). Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid

receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell*, 15(6), 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.027>

López-González, M. A., & Sotelo, J. (2000). Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surgical Neurology*, 53(2), 157–162.

[https://doi.org/10.1016/S0090-3019\(99\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0090-3019(99)00177-9)

Loskutov, Y. V., Griffin, C. L., Marinak, K. M., Bobko, A., Margaryan, N. V., Geldenhuys, W. J., Sarkaria, J. N., & Pugacheva, E. N. (2018). LPA signaling is regulated through the primary cilium: a novel target in glioblastoma. *Oncogene*, 1.

<https://doi.org/10.1038/s41388-017-0049-3>

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109.

<https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Lu, Z., Liu, D., Hornia, A., Devonish, W., Pagano, M., & Foster, D. A. (1998). Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 18(2), 839–845. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.2.839>

Mandil, R., Ashkenazi, E., Blass, M., Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Rosenthal, G., Umansky, F., Lorenzo, P. S., Blumberg, P. M., & Brodie, C. (2001). Protein Kinase C $\alpha$  and Protein Kinase C $\delta$  Play Opposite Roles in the Proliferation and Apoptosis of Glioma Cells. *Cancer Research*, 61(11), 4612–4619.

Marquina-Sánchez, B., González-Jorge, J., Hansberg-Pastor, V., Wegman-Ostrosky, T., Baranda-Ávila, N., Mejía-Pérez, S., Camacho-Arroyo, I., & González-Arenas, A. (2016). The interplay between intracellular progesterone receptor and PKC plays a key role in migration and invasion of human glioblastoma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.10.001>

Martelli, A. M., Evangelisti, C., Nyakern, M., & Manzoli, F. A. (2006). Nuclear protein

- kinase C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(5), 542–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.02.009>
- Mazzocca, A., Dituri, F., De Santis, F., Filannino, A., Lopane, C., Betz, R. C., Li, Y.-Y., Mukaida, N., Winter, P., & Tortorella, C. (2015). Lysophosphatidic acid receptor LPAR6 supports the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 75(3), 532–543.
- Mills, G. B., & Moolenaar, W. H. (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(8), 582–591. <https://doi.org/10.1038/nrc1143>
- Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A., & Giepmans, B. N. G. (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*, 26(8), 870–881.
- Moolenaar, W. H. (2000). Development of Our Current Understanding of Bioactive Lysophospholipids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 905(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06532.x>
- Mueller, M. D., Vigne, J.-L., Pritts, E. A., Chao, V., Dreher, E., & Taylor, R. N. (2003). Progesterins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertility and Sterility*, 79(2), 386–392.
- Mut, M., Amos, S., & Hussaini, I. M. (2010). PKC alpha phosphorylates cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells. *Turkish Neurosurgery*, 20(3), 277–285.
- Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M. G., Hara, T., Shore, M. E., Rahme, G. J., Richman, A. R., Silverbush, D., Shaw, M. L., Hebert, C. M., Dewitt, J., Gritsch, S., Perez, E. M., Gonzalez Castro, L. N., Lan, X., Druck, N., Rodman, C., Dionne, D., Kaplan, A., ... Suvà, M. L. (2019). An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835-849.e21. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.06.024>
- Newton, A. C. (2010). Protein kinase C: poised to signal. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(3), E395–E402.
- Newton, A. C. (2018). Protein kinase C: perfectly balanced. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53(2), 208–230. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1442408>

- Noguchi, K., Ishii, S., & Shimizu, T. (2003). Identification of P2Y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25600–25606.
- Ohuchi, H., Hamada, A., Matsuda, H., Takagi, A., Tanaka, M., Aoki, J., Arai, H., & Noji, S. (2008). Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Developmental Dynamics*, 237(11), 3280–3294.
- Okabe, K., Hayashi, M., Yamawaki, Y., Teranishi, M., Honoki, K., Mori, T., Fukushima, N., & Tsujiuchi, T. (2011). Possible involvement of lysophosphatidic acid receptor-5 gene in the acquisition of growth advantage of rat tumor cells. *Molecular Carcinogenesis*, 50(8), 635–642. <https://doi.org/10.1002/mc.20750>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*, 20(suppl\_4), iv1–iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now131>
- Pagès, C., Simon, M.-F., Valet, P., & Saulnier-Blache, J. S. (2001). Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 64(1–4), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(01\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(01)00110-1)
- Pagès, G., & Pouysségur, J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene—a concert of activating factors\*. *Cardiovascular Research*, 65(3), 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.09.032>
- Park, J. H., Jung, N., Kang, S. J., Kim, H. S., Kim, E., Lee, H. J., Jung, H. R., Choe, M., & Shim, Y. J. (2019). Survival and Prognosis of Patients with Pilocytic Astrocytoma: A Single-Center Study. *Brain Tumor Research and Treatment*, 7(2), 92–97.
- Pasternack, S. M., von Kugelgen, I., Al Aboud, K., Lee, Y.-A., Ruschendorf, F., Voss, K., Hillmer, A. M., Molderings, G. J., Franz, T., Ramirez, A., Nurnberg, P., Nothen, M. M., & Betz, R. C. (2008). G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature Genetics*, 40(3), 329–334. <https://doi.org/10.1038/ng.84>
- Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., Cahill, D. P., Nahed, B. V., Curry, W. T., Martuza, R. L., Louis, D. N., Rozenblatt-Rosen, O., Suvà, M. L., Regev, A., & Bernstein, B. E. (2014). Single-cell RNA-seq

- highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6190), 1396–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>
- Perkins, A., & Liu, G. (2016). Primary Brain Tumors in Adults: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*, 93(3), 211–217.
- Perrakis, A., & Moolenaar, W. H. (2014). Autotaxin: structure-function and signaling. *Journal of Lipid Research*, 55(6), 1010–1018. <https://doi.org/10.1194/jlr.R046391>
- Perry, J., Laperriere, N., & Mason, W. (2017). Radiation plus temozolomide in patients with glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 376(22).
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pierson-Mullany, L. K., & Lange, C. A. (2004). Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), 10542–10557.
- Piña-Medina, A. G., Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Cerbón, M., & Camacho-Arroyo, I. (2016). Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids*, 105, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.11.008>
- Revil, T., Toutant, J., Shkreta, L., Garneau, D., Cloutier, P., & Chabot, B. (2007). Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing. *Molecular and Cellular Biology*, 27(24), 8431–8441. <https://doi.org/10.1128/MCB.00565-07>
- Sano, T., Baker, D., Virag, T., Wada, A., Yatomi, Y., Kobayashi, T., Igarashi, Y., & Tigyi, G. (2002). Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21197–21206. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201289200>
- Sartorius, C. A., Groshong, S. D., Miller, L. A., Powell, R. L., Tung, L., Takimoto, G. S., & Horwitz, K. B. (1994). New T47D Breast Cancer Cell Lines for the Independent Study of Progesterone B- and A-Receptors: Only Antiprogestin-occupied B-Receptors Are Switched to Transcriptional Agonists by cAMP. *Cancer Research*, 54(14), 3868 LP – 3877. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/54/14/3868.abstract>

- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Seo, E. J., Kwon, Y. W., Jang, I. H., Kim, D. K., Lee, S. I., Choi, E. J., Kim, K., Suh, D., Lee, J. H., Choi, K. U., Lee, J. W., Mok, H. J., Kim, K. P., Matsumoto, H., Aoki, J., & Kim, J. H. (2016). Autotaxin Regulates Maintenance of Ovarian Cancer Stem Cells through Lysophosphatidic Acid-Mediated Autocrine Mechanism. *STEM CELLS*, 34(3), 551–564. <https://doi.org/10.1002/stem.2279>
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J. B., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. a., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., ... Mirimanoff, R. O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., & Bogdahn, U. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Sumida, H., Noguchi, K., Kihara, Y., Abe, M., Yanagida, K., Hamano, F., Sato, S., Tamaki, K., Morishita, Y., Kano, M. R., Iwata, C., Miyazono, K., Sakimura, K., Shimizu, T., & Ishii, S. (2010). LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood*, 116(23), 5060–5070. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-272443>
- Takahashi, K., Fukushima, K., Onishi, Y., Inui, K., Node, Y., Fukushima, N., Honoki, K., & Tsujiuchi, T. (2017). Lysophosphatidic acid (LPA) signaling via LPA4 and LPA6 negatively regulates cell motile activities of colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1), 652–657. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.088>
- Takuwa, Y., Takuwa, N., & Sugimoto, N. (2002). The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *Journal of Biochemistry*, 131(6), 767–771.

- Tanaka, M., Okudaira, S., Kishi, Y., Ohkawa, R., Iseki, S., Ota, M., Noji, S., Yatomi, Y., Aoki, J., & Arai, H. (2006). Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(35), 25822–25830.
- Tang, X., Benesch, M. G. K., & Brindley, D. N. (2015). Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology. *Journal of Lipid Research*, *56*(11), 2048–2060. <https://doi.org/10.1194/jlr.R058362>
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., & Abraham, J. A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(18), 11947–11954.
- Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K., & Fukuzawa, K. (2002). Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(42), 39436–39442.
- Tomsig, J. L., Snyder, A. H., Berdyshev, E. V, Skobeleva, A., Mataya, C., Natarajan, V., Brindley, D. N., & Lynch, K. R. (2009). Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *Biochemical Journal*, *419*(3), 611–618.
- Trubiani, O., Guarnieri, S., Diomedede, F., Marigliò, M. A., Merciaro, I., Morabito, C., Cavalcanti, M. F. X. B., Cocco, L., & Ramazzotti, G. (2016). Nuclear translocation of PKC $\alpha$  isoenzyme is involved in neurogenic commitment of human neural crest-derived periodontal ligament stem cells. *Cellular Signalling*, *28*(11), 1631–1641. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.07.012>
- Ueda, H., Matsunaga, H., Olaposi, O. I., & Nagai, J. (2013). Lysophosphatidic acid: chemical signature of neuropathic pain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1831*(1), 61–73.
- Umezū-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., & Aoki, J. (2002). Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*, *158*(2), 227–233.



- Valdés-Rives, S. A., & González-Arenas, A. (2017). Autotaxin-Lysophosphatidic Acid: From Inflammation to Cancer Development. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9173090>
- Van Meeteren, L. A., Ruurs, P., Stortelers, C., Bouwman, P., van Rooijen, M. A., Pradère, J. P., Pettit, T. R., Wakelam, M. J. O., Saulnier-Blache, J. S., & Mummery, C. L. (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Molecular and Cellular Biology*, 26(13), 5015–5022.
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Wegman-Ostrosky, T., Reynoso-Noverón, N., Mejía-Pérez, S. I., Sánchez-Correa, T. E., Alvarez-Gómez, R. M., Vidal-Millán, S., Cacho-Díaz, B., Sánchez-Corona, J., Herrera-Montalvo, L. A., & Corona-Vázquez, T. (2016). Clinical prognostic factors in adults with astrocytoma: Historic cohort. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 146, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.05.002>
- Williams, J. R., Khandoga, A. L., Goyal, P., Fells, J. I., Perygin, D. H., Siess, W., Parrill, A. L., Tigyi, G., & Fujiwara, Y. (2009). Unique ligand selectivity of the GPR92/LPA5 lysophosphatidate receptor indicates role in human platelet activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 17304–17319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003194>
- Willier, S., Butt, E., & Grunewald, T. G. P. (2013). Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: a focussed review and analysis of LPA receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biology of the Cell*, 105(8), 317–333.
- Wippold, F. J., Lämmle, M., Anatelli, F., Lennerz, J., & Perry, A. (2006). Neuropathology for the Neuroradiologist: Palisades and Pseudopalisades. *American Journal of Neuroradiology*, 27(10), 2037 LP – 2041.
- Yanagida, K., Kurikawa, Y., Shimizu, T., & Ishii, S. (2013). Current progress in non-Edg

family LPA receptor research. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(1), 33–41.

<https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2012.08.003>

Yanagida, K., Masago, K., Nakanishi, H., Kihara, Y., Hamano, F., Tajima, Y., Taguchi, R., Shimizu, T., & Ishii, S. (2009). Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, P2Y5/LPA6. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17731–17741.

Ye, X., Hama, K., Contos, J. J. A., Anliker, B., Inoue, A., Skinner, M. K., Suzuki, H., Amano, T., Kennedy, G., Arai, H., Aoki, J., & Chun, J. (2005). LPA(3)-mediated lysophosphatidic acid signalling in implantation and embryo spacing. *Nature*, 435(7038), 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature03505>

Ye, X., Skinner, M. K., Kennedy, G., & Chun, J. (2008). Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling. *Biology of Reproduction*, 79(2), 328–336. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.068783>

Yung, Y. C., Stoddard, N. C., & Chun, J. (2014). LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Lipid Research*, 55(7), 1192–1214. <https://doi.org/10.1194/jlr.R046458>

Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Mirendil, H., & Chun, J. (2015). Lysophosphatidic Acid Signaling in the Nervous System. *Neuron*, 85(4), 669–682. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.01.009>

Zhang, H., Xu, X., Gajewiak, J., Tsukahara, R., Fujiwara, Y., Liu, J., Fells, J. I., Perygin, D., Parrill, A. L., Tigyi, G., & Prestwich, G. D. (2009). Dual Activity Lysophosphatidic Acid Receptor Pan-Antagonist/Autotaxin Inhibitor Reduces Breast Cancer Cell Migration In vitro and Causes Tumor Regression In vivo. *Cancer Research*, 69(13), 5441–5449. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0302>

## 14 ANEXOS

Artículo de Investigación:

Valdés-Rives, Silvia Anahi; de la Fuente-Granada, Marisol; Velasco-Velázquez, Marco A.; González-Flores, Oscar; González-Arenas, Aliesha. LPA<sub>1</sub> receptor activation induces PKC $\alpha$  nuclear translocation in glioblastoma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2019.

Artículo de Revisión:

Valdés-Rives, Silvia Anahi; Casique-Aguirre, Diana; Germán-Castelán, Liliana; Velasco-Velázquez, Marco A.; González-Arenas, Aliesha. Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications. *BioMed Research International*. 2017.

Artículo de Revisión:

Valdés-Rives, Silvia Anahi; González-Arenas, Aliesha. Autotaxin-Lysophosphatidic Acid: From Inflammation to Cancer Development. *Mediators of Inflammation*. 2017



## LPA<sub>1</sub> receptor activation induces PKC $\alpha$ nuclear translocation in glioblastoma cells

Silvia Anahi Valdés-Rives<sup>a</sup>, Marisol de la Fuente-Granada<sup>a</sup>, Marco A. Velasco-Velázquez<sup>b,c</sup>, Oscar González-Flores<sup>d,e</sup>, Aliasha González-Arenas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Farmacología y, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

<sup>c</sup> Unidad Periférica de Investigación en Biomedicina Traslacional (C.M.N. 20 de noviembre, ISSSTE), Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

<sup>d</sup> Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Tlaxcala, Mexico

<sup>e</sup> Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, UAM-I, Ciudad de México, Mexico



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Glioblastoma  
LPA  
LPA<sub>1</sub> receptor  
PKC $\alpha$   
Nucleus

### ABSTRACT

Lysophosphatidic acid (LPA) is a ubiquitous lysophospholipid that induces a wide range of cellular processes such as wound healing, differentiation, proliferation, migration, and survival. LPA signaling is increased in a number of cancers. In Glioblastoma (GBM), the most aggressive brain tumor, autotaxin the enzyme that produces LPA and its receptor LPA<sub>1</sub> are overexpressed. LPA<sub>1</sub> is preferentially couple to G $\alpha_q$  proteins in these tumors that in turn activates PKCs. PKCs are involved in many cellular processes including proliferation and metastasis. In this study, we aimed to determine if a classical PKC ( $\alpha$  isozyme), could be activated through LPA<sub>1</sub> in GBM cell lines and if this activation impacts on cell number. We found that LPA<sub>1</sub> induces PKC $\alpha$  translocation to the nucleus, but not to the cell membrane after LPA treatment and the cell number diminished when LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$  signaling was blocked, suggesting a relevant role of LPA<sub>1</sub> and PKC $\alpha$  in GBM growth.

### 1. Introduction

Lysophosphatidic acid (LPA) is a small lysophospholipid that consists of an acyl chain at the sn-1 (or sn-2) position of a glycerol backbone and a phosphate head group (Moolenaar, 2006). It acts through six GPCRs named LPA<sub>1-6</sub> that are coupled to G $\alpha$  proteins: G $\alpha_{q/11}$ , G $\alpha_{i/o}$ , G $\alpha_{12/13}$ , G $\alpha_s$ . Consequently, depending on cellular context, LPA can exert a wide range of physiological effects such as wound healing, differentiation, neurogenesis, and survival (Yung et al., 2015; Gonzalez-Gil et al., 2015). LPA is mainly produced by autotaxin (ATX) a 125kDa-secreted enzyme from the family of ectonucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (Perrakis and Moolenaar, 2014). ATX generates LPA from plasma membrane phospholipids and from circulating lysophosphatidylcholine (LPC) bound to albumin (Zhang et al., 2009). Due to the small nature of LPA, it is water soluble, and different concentrations of this lysophospholipid have been reported in body fluids.

Aberrant ATX-LPA signaling has been linked to some pathologies

namely inflammation, autoimmunity, neurological disorders, fibrosis, and cancer (Valdés-Rives and González-Arenas, 2017; Yung et al., 2014). In several malignancies, ATX expression and LPA concentrations are elevated, i.e., LPA can reach up to 80 $\mu$ M in ascites fluid from ovarian cancer (Yung et al., 2014; Mills and Moolenaar, 2003; Benesch et al., 2014), while in non-pathological conditions concentrations around 5 $\mu$ M have been reported in serum plasma (Yung et al., 2014; Mills and Moolenaar, 2003; Choi and Chun, 2013).

Moreover, the LPA<sub>1</sub> receptor has been linked to malignant progression by enhancing proliferation, migration, angiogenesis, and cancer stem-cell maintenance in some tumors such as breast cancer, pancreatic cancer, ovarian cancer, and glioblastoma (Zhang et al., 2009; Lee et al., 2015; Seo et al., 2016; Fukushima et al., 2017).

Glioblastoma (GBM), also known as an astrocytoma grade IV, represents the maximal evolution stage of astrocytomas and it is among the most lethal human malignancies (Louis et al., 2007; Ostrom et al., 2018). The median survival for GBM patients, with the best therapy, is

\* Corresponding Author at: Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México, Mexico.

E-mail addresses: [anahivaldes@gmail.com](mailto:anahivaldes@gmail.com) (S.A. Valdés-Rives), [mdelafuente@iibiomedicas.unam.mx](mailto:mdelafuente@iibiomedicas.unam.mx) (M. de la Fuente-Granada), [marcovelasco@unam.mx](mailto:marcovelasco@unam.mx) (M.A. Velasco-Velázquez), [oglezflo@gmail.com](mailto:oglezflo@gmail.com) (O. González-Flores), [alieshagonzalez@gmail.com](mailto:alieshagonzalez@gmail.com) (A. González-Arenas).

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.03.003>

Received 27 June 2018; Received in revised form 6 February 2019; Accepted 4 March 2019

Available online 05 March 2019

1357-2725/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

12–15 months, and only 3–5% of the patients survive for more than three years. In the Mexican population, it has been estimated that the mean age of incidence is  $45 \pm 15$  years, compared to the global estimate of  $60 \pm 15$  years (Wegman-Ostrosky et al., 2016; Louis et al., 2016).

A recent study showed that primary cilium regulates LPA<sub>1</sub> signaling in astrocytes, and the loss of the cilium induced an increased proliferation in an LPA-dependent manner in these cells (Loskutov et al., 2018). In GBM, the primary cilia are lost, and LPA<sub>1</sub> is redistributed in the cell membrane enhancing a signaling pathway to induce malignant progression. Moreover, ATX and LPA<sub>1</sub> are augmented in GBM, and LPA<sub>1</sub> increases its coupling to G $\alpha_q$  and G $\alpha_{12}$  proteins (Loskutov et al., 2018; Kishi et al., 2006; Tabuchi, 2015; Steinberg, 2008). G $\alpha_q$  proteins activate phospholipase C (PLC), which in turn produces diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) from phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) (Koivunen et al., 2006; Steinberg, 2008). DAG activates classic and novel PKCs, serine/threonine kinases.

The role of PKCs in cancer progression is well-known (do Carmo et al., 2013). In GBM, PKC $\alpha$  is the most expressed among these kinases (Koivunen et al., 2006; Mandil et al., 2001). PKC $\alpha$  is known to induce a proliferative and pro-survival effect in GBM (Cameron et al., 2008; González-Arenas et al., 2015), but since this kinase has a wide variability of actions its contribution through specific signaling pathways for the development of GBM is poorly understood, and its target in therapy has ended in failure (do Carmo et al., 2013). Therefore, we aimed to study the activation of PKC $\alpha$  through the stimulation of LPA<sub>1</sub> to understand one of the mechanisms through which these two molecules participate in glioblastoma biology.

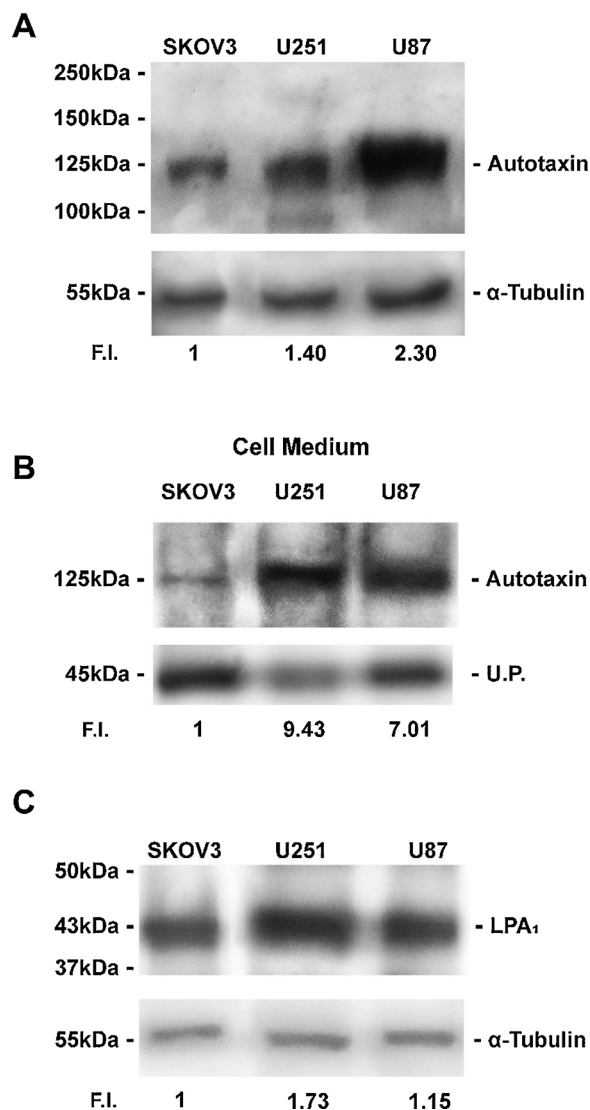
## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell Culture and treatments

All cell lines were culture in DMEM medium (In Vitro, Mex), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C under a 95% air and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. CaCo2 needs 20% of (FBS). Cell lines used: human GBM derived cell lines U251, U87 and LN229 (American Type Culture Collection, USA); human ovarian cancer-derived cell line SKOV3 (American Type Culture Collection, USA); human colon cancer-derived cell lines CaCo2 and HCT-116 (American Type Culture Collection, USA). Tetradecanoyl phorbol acetate (TPA; Sigma-Aldrich, USA) was used to activate PKC $\alpha$ . 1-Oleoyl Lysophosphatidic Acid (LPA; Cayman Chemical, USA) was used to activate LPA receptors. LPA<sub>1</sub> antagonist Ki16425 (Sigma-Aldrich, USA) was added 30 min before the LPA treatment when used.

### 2.2. Cellular fractionation

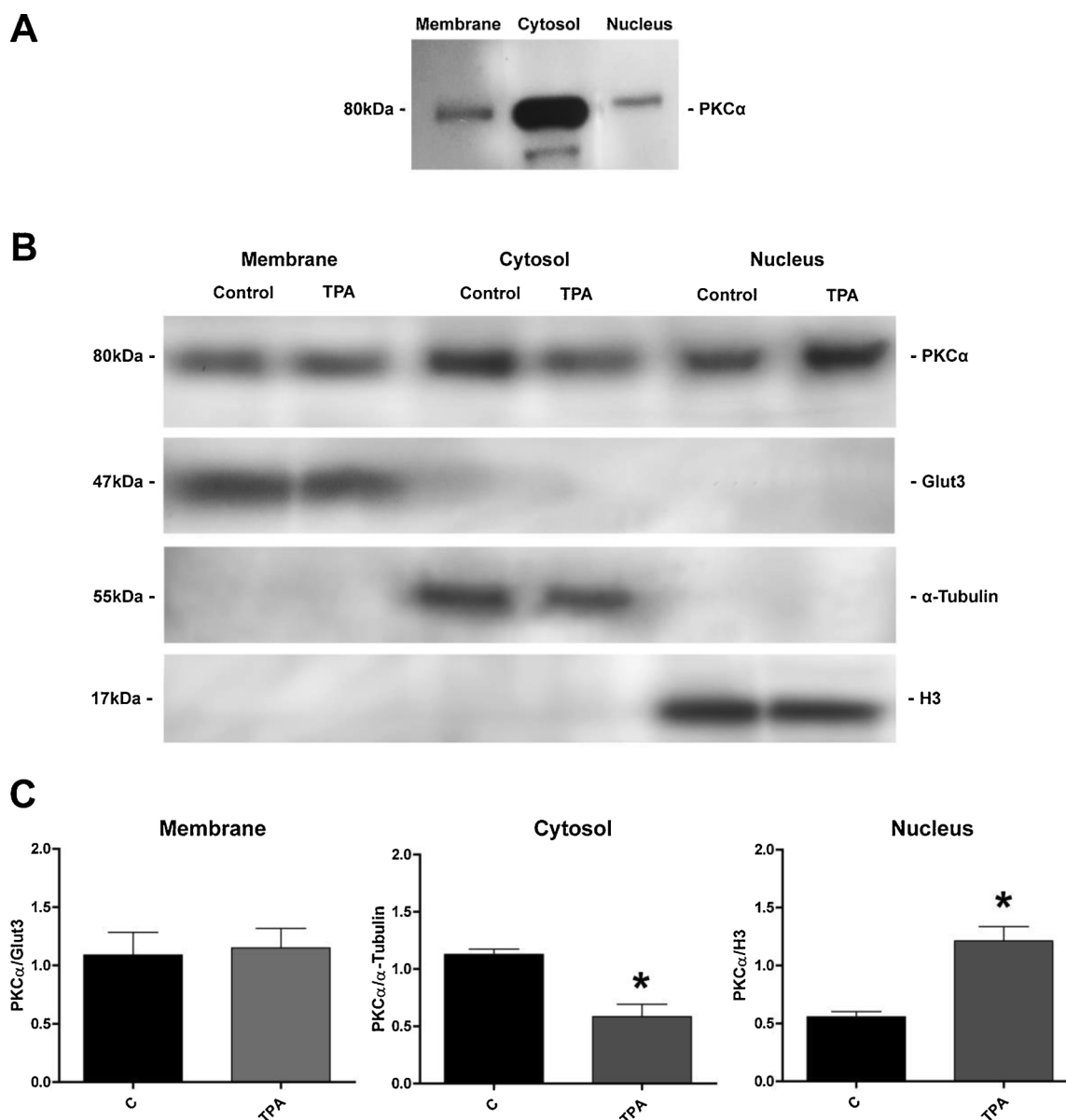
$10 \times 10^6$  cells were maintained as described in the *Cell culture and treatments*. Twelve hours before treatments, the medium was changed for phenol red-free DMEM without fetal bovine serum. After treatments, cells were homogenized in ice-cold Buffer A with protease inhibitors (20 mM Tris–HCl, 0.25 M sucrose, 2 mM EDTA and 2 mM EGTA in distilled water, pH = 7.5). The cell suspension underwent one freeze-thaw cycle in dry ice. The samples were centrifuged at 2800 x g at 4 °C for 10 min. The pellets (nuclear fraction) were resuspended in 200  $\mu$ L of Buffer A and stored until used. The supernatant was centrifuged at 200,000 x g at 4 °C for 105 min using an ultracentrifuge. The supernatant (cytosol) was stored until used. The pellet was resuspended in ice-cold Buffer B with protease inhibitors (20 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, and 1% Triton X-100 in distilled water, pH = 7.5) and centrifuged at 16,000 x g at 4 °C for 15 min. The supernatant (Membrane fraction) was stored until used. Proteins were quantified using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).



**Fig. 1.** Glioblastoma cell lines highly express autotaxin and LPA<sub>1</sub>. A) Representative Western Blot for autotaxin content in glioblastoma cell lines (U251 and U87) and SKOV3. B) Representative Western Blot for AXT secreted to the cell medium in glioblastoma cell lines (U251 and U87) and SKOV3. U.P.: unspecific protein taken for quantification purposes. C) Representative Western Blot for LPA<sub>1</sub> content in glioblastoma cell lines (U251 and U87) and SKOV3. F.I. (Fold increase). All blots are representative of two independent experiments.

### 2.3. Western blotting

Nuclear (100  $\mu$ g), cytosolic (50  $\mu$ g) and membrane (50  $\mu$ g) proteins were separated by electrophoresis on 10% and 7.5% SDS-PAGE gels respectively at 20 mA. Colored markers (Bio-Rad, USA) were included for size determination. Gels were transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, USA) for 2 h (60 mA, at room temperature in semi-dry conditions). The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk and 2% bovine serum albumin at room temperature for 2 h. Membranes were incubated with an antibody against PKC $\alpha$  (0.66  $\mu$ g/mL; sc-8393; Santa Cruz Biotechnology, USA) at 4 °C overnight. Blots were then incubated with an anti-mouse secondary antibody (1:5000) conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, USA) for 45 min. To correct for differences in the amount of total protein loaded in each lane, PKC $\alpha$  content in the nuclear fraction was normalized to that of histone 3 (H3), PKC $\alpha$  content in the cytosolic fraction was normalized to that of  $\alpha$ -tubulin, and PKC $\alpha$  content in the membrane fraction was normalized to that of glucose transporter, Glut3. Blots were stripped



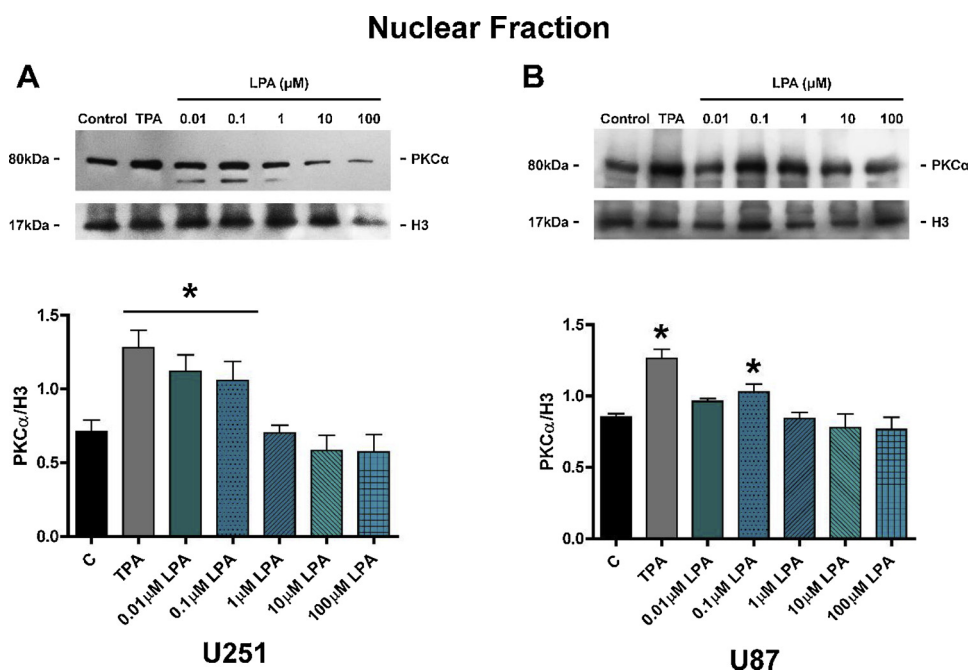
**Fig. 2. TPA induces PKC $\alpha$  translocation to the nucleus.** A) Representative western blot of PKC $\alpha$  cellular distribution under non-stimulus conditions in different cell fractions of U251 cell line. B) Representative western blots of PKC $\alpha$  content in the cell membrane, cytosol, and nucleus after 5 min of TPA (1 $\mu$ M) stimulation (Control (C): DMSO 10%); Glut 3 transporter,  $\alpha$ -tubulin, and histone H3 were used as specific proteins for each compartment. C) Graphic representation of 3 independent experiments. PKC $\alpha$  from each compartment was compared to its specific protein for quantification. Results are expressed as the mean + S.E.M., Bonferroni post-test determined statistical difference, \*p < 0.05 versus control.

with glycine [0.1 M, pH 2.5; 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)] at 4 °C overnight and at room temperature for 30 min. Then they were re-probed with 0.1  $\mu$ g/mL of rabbit anti-histone 3 polyclonal antibody (06-599-MN; Merck Millipore, USA), 0.4  $\mu$ g/mL of mouse anti- $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody (sc-398103; Santa Cruz Biotechnology, USA), 0.66  $\mu$ g/mL of mouse anti-Glut3 monoclonal antibody (sc-74399; Santa Cruz Biotechnology, USA) respectively at 4 °C overnight. Blots were then incubated with an anti-mouse secondary antibody (1:15,000; Abcam, USA), or an anti-rabbit secondary antibody (1: 12,000; Santa Cruz Biotechnology, USA) conjugated to horseradish peroxidase at room temperature for 45 min. Chemiluminescence signals were detected exposing the membranes to Kodak Biomax Light Film (Sigma-Aldrich, USA) using Supersignal West Femto as peroxidase substrate (Thermo Scientific, USA). Detection of the LPA<sub>1</sub> receptor, LPA<sub>3</sub> receptor, and ATX was done in whole cells under control conditions homogenized in RIPA lysis buffer with protease inhibitors (1 mM EDTA,

2  $\mu$ g/mL leupeptin, 2  $\mu$ g/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride). Proteins were obtained by centrifugation at 12,500 rpm, at 4 °C for 15 min and quantified using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Proteins (100  $\mu$ g) were determined by Western blotting. Blots were incubated with 3  $\mu$ g/mL LPA<sub>1</sub> rabbit polyclonal antibody (ab23698; Abcam, USA), 1  $\mu$ g/mL LPA<sub>3</sub> mouse monoclonal antibody (sc-390270; Santa Cruz Biotechnology, USA) and 0.2  $\mu$ g/mL ATX mouse monoclonal antibody (sc-374222; Santa Cruz Biotechnology, USA). To correct for differences in the amount of total protein loaded in each lane the content was normalized to that of  $\alpha$ -tubulin as described above.

#### 2.4. Immunofluorescence

8,000 cells per well were plated in Millicell EZ 4-well glass slides (Millipore, USA). Eighteen hours before treatments, the medium was



**Fig. 3.** LPA induces PKC $\alpha$  nuclear translocation in glioblastoma cells. Cell lines were treated with TPA (1 $\mu$ M) or different LPA concentrations (0.01  $\mu$ M–100  $\mu$ M) for 5 min in U251 (A) or U87 (B). Upper panels: Representative Western Blots of nuclear fractions, Bottom panels: Graphic representation of 3 independent experiments. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M., Bonferroni post-test determined statistical difference \* $p$  < 0.05 versus the control.

changed for phenol red-free DMEM without fetal bovine serum. After the treatments, cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde solution at 37 °C and permeabilized with 100% methanol for 6 min at -4 °C. Next, fixed cells were blocked with 1% bovine serum albumin in PBS for 1 h at room temperature and incubated at 4 °C for 24 h with 1  $\mu$ g/mL of monoclonal mouse antibody anti-PKC $\alpha$  (sc-8393; Santa Cruz Biotechnology, USA) in 0.5% bovine serum albumin in PBS. The samples were rinsed thrice in PBS for 5 min each and incubated in the dark with anti-mouse Alexa Fluor 594-labeled secondary antibodies (Invitrogen, USA) for 45 min. Nuclei were stained with 1  $\mu$ g/mL Hoechst 33,342 solution (Thermo Scientific, USA), and the cells were coverslipped with fluorescence mounting medium (Biacare Medical, USA). To detect Alexa Fluor 594 and Hoechst fluorescence the samples were visualized in an Olympus B $\times$ 43 F microscope using different wavelengths to excite the fluorochromes. Photographs were taken at 60x magnification. To establish colocalization of the detected signals merged images were generated using ImageJ software (National Institutes of Health, USA). The examiner was unaware of the treatment conditions of the cells. Isotype controls were performed for all immunofluorescence (data not shown). For nuclear PKC $\alpha$  quantification, the samples were visualized in a Nikon A1R + STORM confocal microscope. The nuclear PKC $\alpha$  stain was quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, USA). The DAPI images were used to select the nuclei, and the area was an overlay in the PKC $\alpha$  channel. The fluorescence was divided by the nuclear area to obtain a mean fluorescence intensity per nucleus.

## 2.5. Viability assay

15,000 cells per well were plated in a 24-well plate. DMEM with 10% of FBS was used for this assay. The cells were treated for 24 h with Ki16425 2.5 or 5  $\mu$ M. Cells were detached with PBS-EDTA, and the cell suspension was stained with Trypan Blue (T-6146, Sigma, USA). Cell number was first determined in a Neubauer chamber. The percentage of viable cells was calculated by dividing the number of viable cells by the number of total cells and multiplying by 100.

## 2.6. Cell transfection with siRNAs

Specific small interfering RNAs (siRNAs) (Santa Cruz

Biotechnology) were used to inhibit the expression of PKC $\alpha$  (sc-36423). Control siRNA has a scramble sequence that does not lead to the specific degradation of any known cellular mRNA. U251, U87, and LN229 were grown in six-well plates to a confluence of 60% and then were transfected with 0.35 nM of siRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life Technologies) as described by the manufacturer. To confirm PKC $\alpha$  silencing, a western blot for the enzyme were carried out in cell lysates after 72 h of siRNA transfection.

## 2.7. Flow cytometry

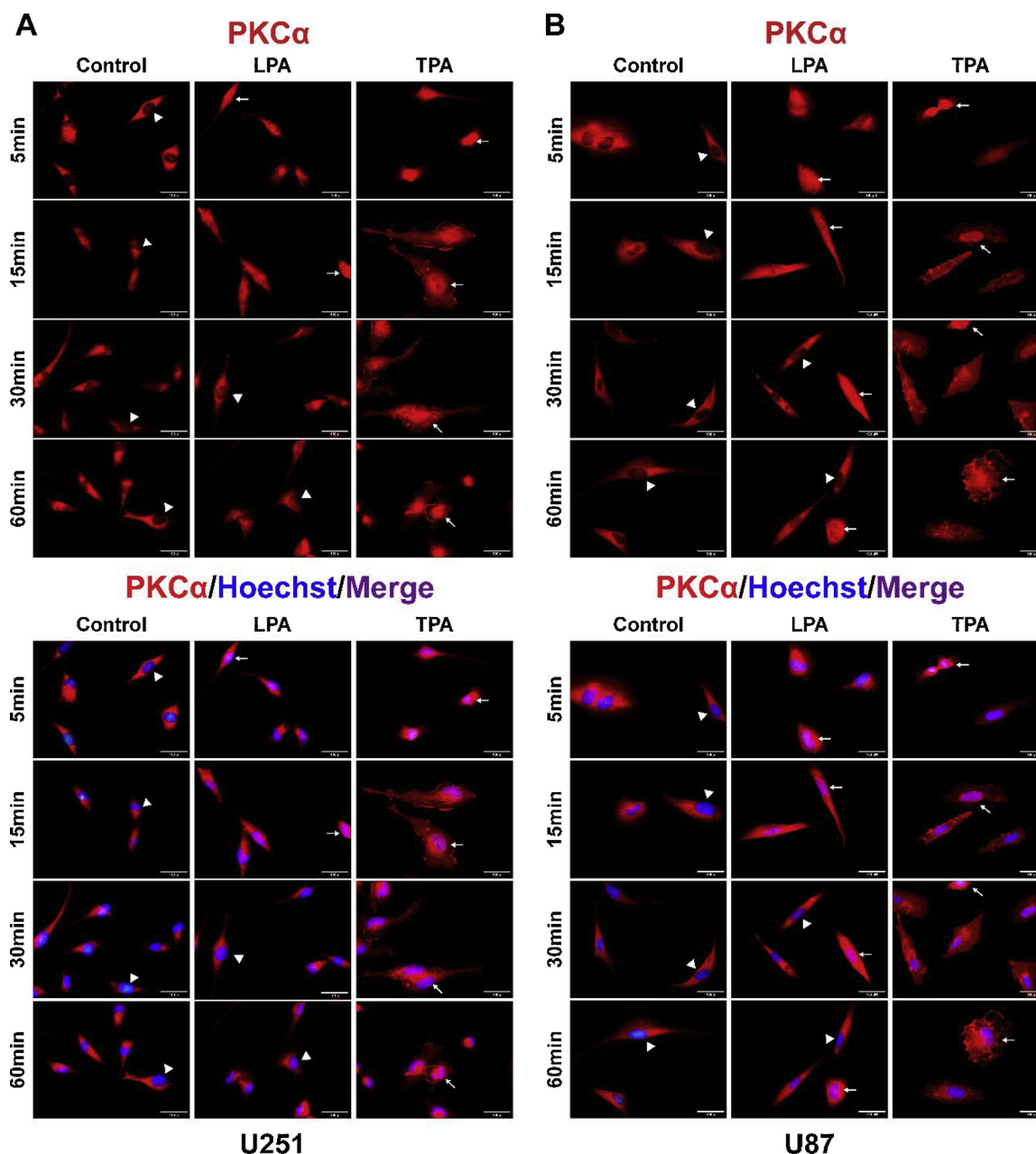
To assess phosphorylation of PR at S400 intracellular staining was performed. Immediately after the stimulation of times indicated, cells were collected, fixed with PBS/Paraformaldehyde 2% at 37 °C for 10 min, and permeabilized with ice-cold methanol at 4 °C for 30 min. Then, cells were washed with FACs buffer (PBS/4% fetal bovine serum) and incubated with blocking solution (FACs buffer/10% goat serum) for 20 min at 4 °C using goat serum. After blockage, cells were stained by using 0.5  $\mu$ g/50  $\mu$ l of rabbit anti-pS400PR (ab60954, Abcam, USA) at 4 °C for 20 min and washed with FACs buffer. Cells were then incubated with secondary goat anti-rabbit IgG-AF488 antibody by using 0.5  $\mu$ g/50  $\mu$ l (A11034, Invitrogen, USA) at 4 °C for 30 min, protected from light. Cells were washed and resuspended in FACs buffer. Samples were acquired in an Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Life Technologies, USA) and analyzed using FlowJo 10.0 software (Tree Star Inc., USA).

Specific characteristics of the antibodies described in sections 2.3, 2.4 and 2.5 can be consulted in Supplementary Table 1.

## 2.8. Statistical analysis

All data were analyzed and plotted using the GraphPad Prism 5.0 software for Windows XP (GraphPad Software, USA). Statistical analysis of comparable groups was performed using a one-way ANOVA with a Bonferroni posttest. A value of  $P = 0.05$  or less was considered statistically significant as stated in figure legends.





**Fig. 4. Temporal translocation of PKC $\alpha$  induced by LPA and TPA in glioblastoma cells.** Translocation of PKC $\alpha$  with respect to time in A) U251 and B) U87 cells treated with LPA (100 nM) and TPA (1  $\mu$ M). Top: PKC $\alpha$  (Red), Bottom: Hoechst (Blue), Merge (Purple). Representative images of 3 independent experiments. Photographs were taken at 60x magnification. Scale bar = 100  $\mu$ m. Arrowheads indicate empty nucleus, arrows indicate occupied nucleus with PKC $\alpha$ . Just one arrowhead or arrow per image are shown not to saturate the pictures (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

### 3. Results

#### 3.1. GBM-derived cell lines express autotaxin and LPA1

ATX enzyme is the main pathway by which LPA is produced in physiological and some pathological conditions. Our results show a 2.30 and 1.40 fold increase in ATX content in U87 and U251 respectively compared with SKOV3 (Fig. 1A), an ovarian cell line that highly express this enzyme and LPA<sub>1</sub> receptor (Seo et al., 2016; Kishi et al., 2006). We also evaluated ATX secretion in these cell lines, U251 and U87 presented a 9.43 and 7-fold increase respectively of secreted ATX compared to SKOV3 (Fig. 1B).

LPA<sub>1</sub> content was also augmented in U251 and U87 cells (1.73 and 1.15-fold increase, respectively) compared with SKOV3 protein content

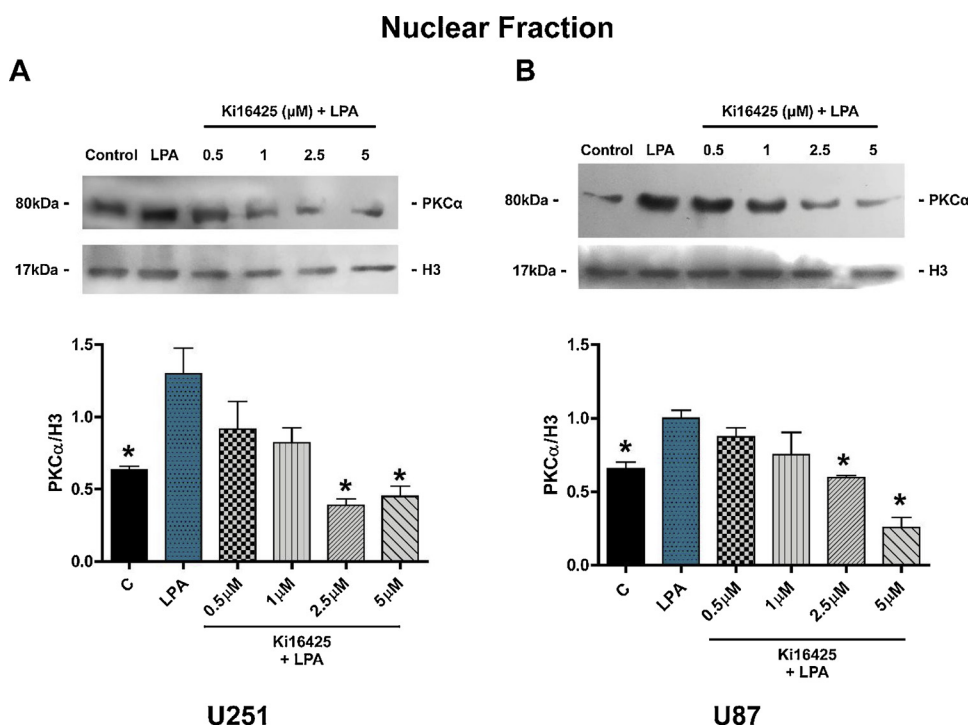
(Fig. 1C).

The expression of ATX and LPA receptors have been reported before for U251 and U87 cell lines at a mRNA level (Kishi et al., 2006; Lee et al., 2008), but have not been demonstrated at a protein level, as has been done in this work.

#### 3.2. Low concentrations of LPA induce PKC $\alpha$ nuclear translocation

To evaluate the effect of LPA on PKC $\alpha$  activation by kinase translocation, first, we assessed a positive control of PKC $\alpha$  activation, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). GBM cells were treated with TPA 1  $\mu$ M, and after 5 min of stimulation, PKC $\alpha$  translocation was measured in the cell membrane, cytoplasm, and nucleus. Our results show that PKC $\alpha$  is mainly located in the cytoplasm under no





**Fig. 5. Ki16425 at increasing concentrations antagonizes LPA effect on PKCα translocation.** Cells treated with increasing concentrations of Ki16425 inhibits PKCα translocation to the nucleus in A) U251 and B) U87 after 5 min of LPA (100 nM) stimulation. Upper panels: Representative Western Blot, Bottom panel: Graphic representation, results are expressed as the mean + S.E.M of 3 independent experiments. Bonferroni post-test determined statistical difference \* $p < 0.05$  versus LPA.

stimulation (Fig. 2A), but strongly translocated to the nucleus at 5 min with TPA, and not to the cell membrane in glioblastoma cells (Fig. 2B-C).

To study if PKCα translocation induced by LPA is like the one produced by TPA, first, we tested the effect of different LPA concentrations (Fig. 3). Interestingly, in U251 concentrations of 10 and 100 nM of LPA induced a significant PKCα translocation to the nucleus compared to the control, while in U87 PKCα translocation was achieved at 100 nM of LPA. We also evaluated the content of PKCα in the cytosol, which showed the opposite result (Supplementary Fig. 1). Low concentrations of LPA diminished PKCα content in the cytosol, while higher concentration maintained the content similar to the control in this cell fraction. It is worth noting that 1, 10, and 100 μM of LPA did not promote a PKCα translocation to the cell membrane at 5 min of stimulation (Supplementary Fig. 2).

### 3.3. LPA does not induce PKCα membrane translocation in GBM in a time-dependent manner

PKCα is known to translocate to the cell membrane after activation. We were interested in studying if this translocation was time-dependent in LPA activation. Therefore, we evaluated the effect of 100 nM LPA on PKCα translocation at 5, 15, 30, and 60 min. We chose 100 nM LPA since it elicited a similar nuclear translocation of PKCα in both cell lines. We decided to compare LPA effect with TPA because in many PKCα studies it is the most common activator used to understand this kinase effects on cellular biology.

Remarkably, the effect on PKCα translocation through time differs depending on its activator (Fig. 4). LPA induced the kinase nuclear translocation at 5 and 15 min in both cell lines, which was later redistributed to the cytoplasm at 30 and 60 min but with no accumulation at the cell membrane. On the other hand, TPA induced a robust translocation of the protein to the nucleus at 5 min after treatment. However, at 15, 30 and 60 min of stimulation, while some PKCα could be detected in the nucleus, it was also redistributed to the cytoplasm and the cell membrane. Our results show that LPA promotes a PKCα nuclear translocation, not a membrane translocation, in glioblastoma cell lines.

### 3.4. Ki16425 inhibits PKCα nuclear translocation in GBM

As already mentioned, LPA can induce its effects through several GPCRs. To determine if the results obtained were elicited through LPA<sub>1</sub>, we used an LPA<sub>1</sub>/LPA<sub>3</sub> antagonist Ki16425.

To determine the optimal concentration of Ki16425 to inhibit PKCα nuclear translocation, we evaluated the effect of the antagonist at different concentrations after 5 min of stimulation with LPA 100 nM (Fig. 5). We also assessed the kinase content in the cytosol at different concentrations of the antagonist (Supplementary Fig. 3). Our results determined that 2.5 μM and 5 μM of Ki16425 inhibit PKCα nuclear translocation in glioblastoma cell lines.

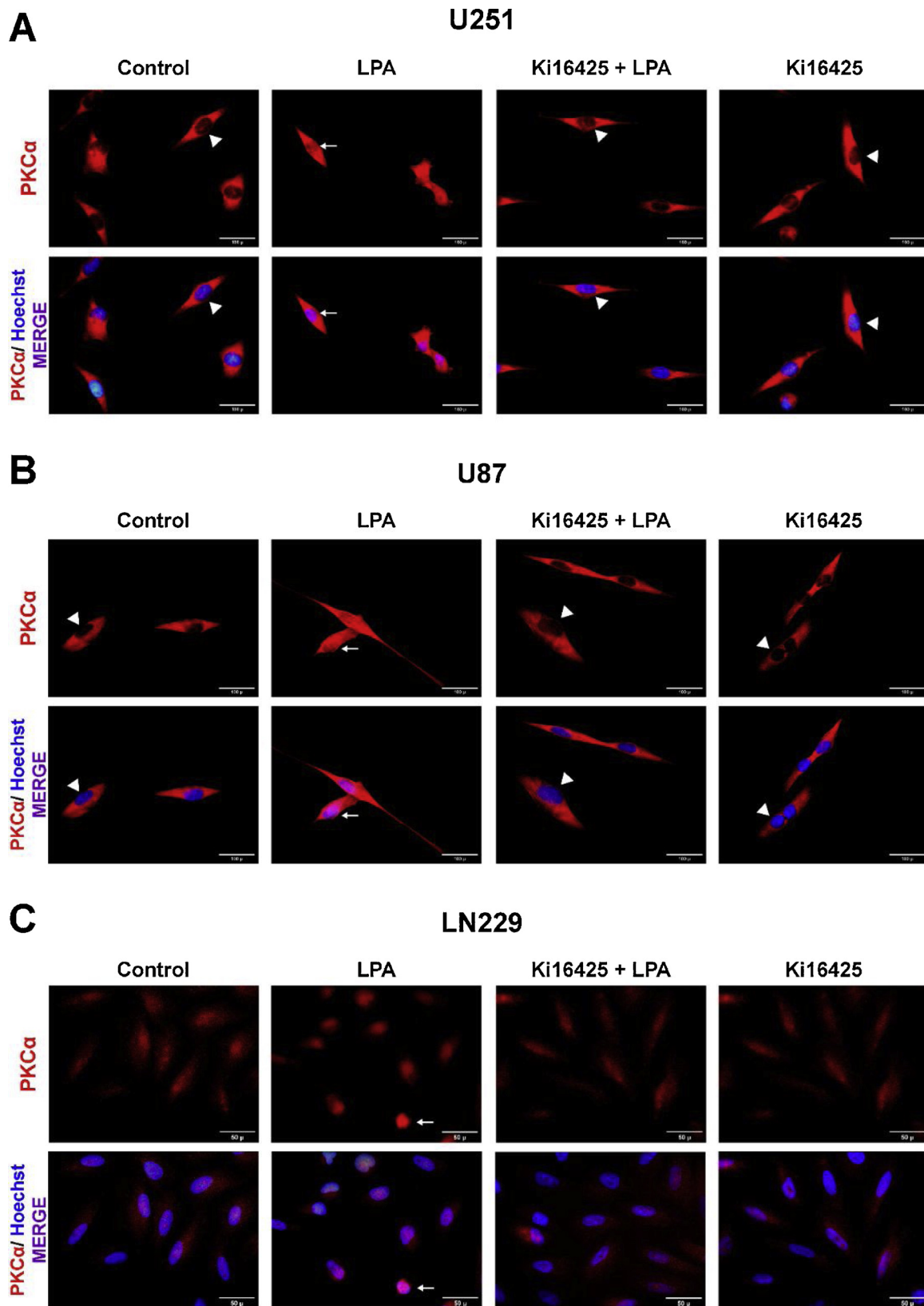
We have shown that PKCα nuclear translocation occurs at 5–15 min after stimulation with LPA (Fig. 4), we decided to test the inhibition of PKCα translocation at 15 min with Ki16425 (Fig. 6). We chose to study this signaling pathway by adding a third cell line (LN229) to see if it will be a conserved pathway in different GBM cell lines. LN229 also expresses ATX and LPA<sub>1</sub> similarly to U251, but PKCα has a lower content in comparison to U251 and U87 (Supplementary Fig. 4).

LPA<sub>3</sub> receptor content was analyzed in all glioblastoma cell lines since this protein has not been previously reported in these cells and could contribute to the effects of LPA shown in this study. U251 and U87 cell lines did not express LPA<sub>3</sub>, while LN229 expresses this receptor as HCT116, a colon carcinoma cell line, positive to this receptor. CaCo2, a cell line that has been reported negative to LPA<sub>3</sub>, was used as a negative control (Supplementary Fig. 5) (Leve et al., 2015).

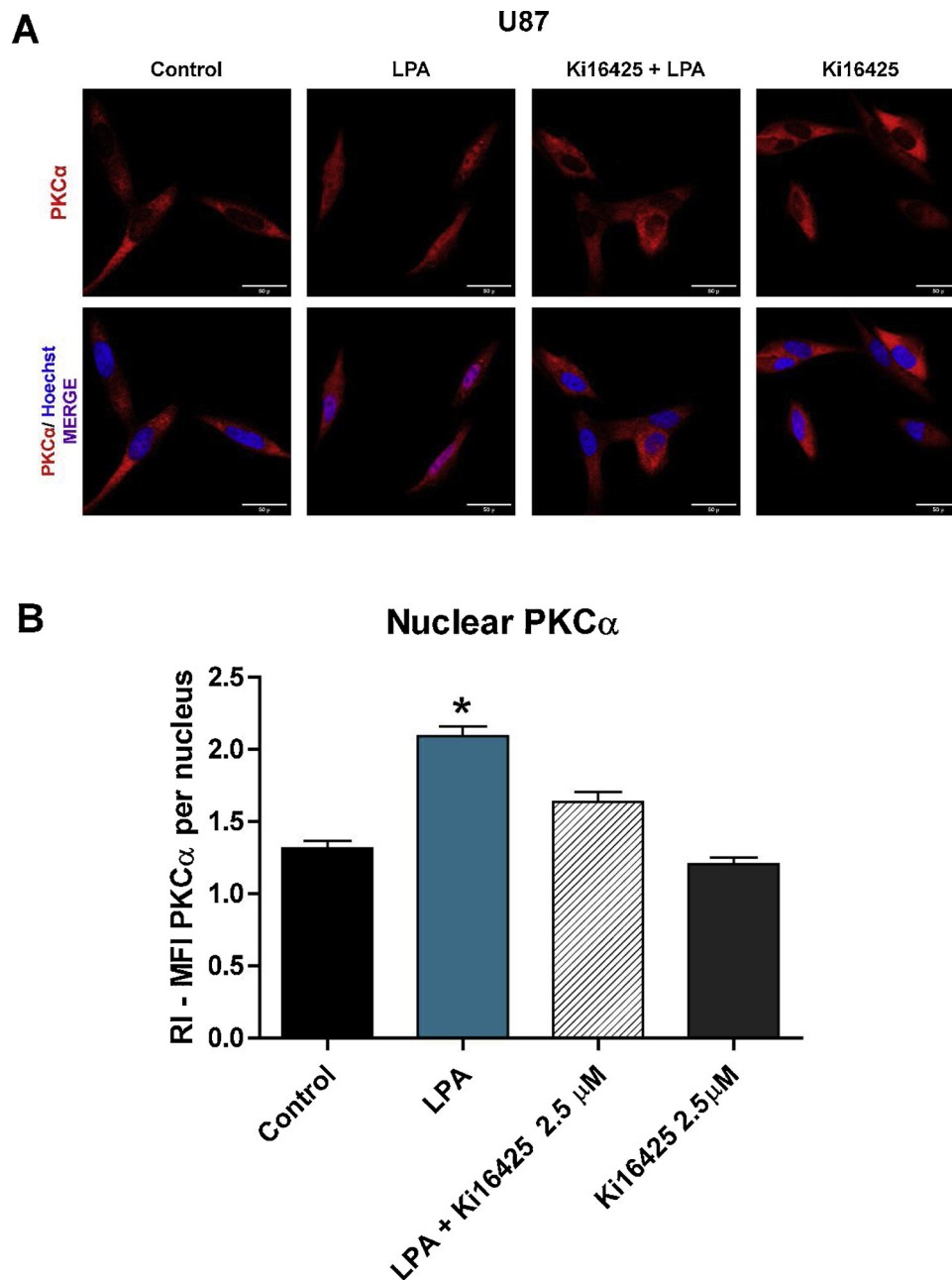
Our results show that in U251 and U87 cell lines, LPA induces PKCα translocation to the nucleus meanwhile Ki16425, an antagonist for LPA<sub>1</sub>, blocks this effect. On the other hand, LN229 has PKCα distributed in both cytosol and nucleus in control conditions, but LPA stimulation concentrates this kinase in the nucleus and Ki16425 treatment blocks this effect in these cells.

Moreover, we decided to quantify the translocation of PKCα to the nucleus in U87 cells after stimulation with LPA 100 nM and/or Ki16425 2.5 μM (15 min) using confocal microscopy (Fig. 7).

The results showed that LPA 100 nM after 15 min induces a significant translocation of PKCα to the nucleus compared to control and the LPA<sub>1</sub> receptor antagonist, Ki16425, blocks this effect even when



**Fig. 6.** LPA<sub>1</sub> mediates LPA effect on PKC $\alpha$  translocation. Cells treated with Ki16425 (2.5 $\mu$ M) inhibits LPA (100 nM) effect on PKC $\alpha$  nuclear translocation at 15 min of stimulation in all glioblastoma cells lines A) U251, B) U87 and C) LN229. PKC $\alpha$  (Red), Hoechst (Blue), Merge (Purple). Representative images of 3 independent experiments. Photographs were taken at 60x magnification. Scale bars: 100  $\mu$ m for U251 and U87, 50  $\mu$ m for LN229. Arrowheads indicate empty nucleus, arrows indicate occupied nucleus with PKC $\alpha$ . Just one arrowhead or arrow per image are shown not to saturate the pictures (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).



**Fig. 7. Nuclear PKC $\alpha$  quantification.** A) Representative images of confocal microscopy of U87 cells stimulated with LPA 100 nM and/or Ki16425 2.5  $\mu$ M. B) Graphic representation, results are expressed as the mean + S.E.M of 3 independent experiments, 150 nuclei cells were quantified per treatment. Bonferroni post-test determined statistical difference \* $p < 0.05$  versus control, LPA + Ki16425 and Ki16425. Photographs were taken at 20x magnification with a 3.62 zoom in a Nikon A1R + STORM confocal microscope. Scale bar = 100  $\mu$ m.

LPA is added. These results demonstrate that nuclear translocation of PKC $\alpha$  induced by LPA is mediated through its LPA<sub>1</sub> receptor.

### 3.5. LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$ inhibition decreases cell number in GBM

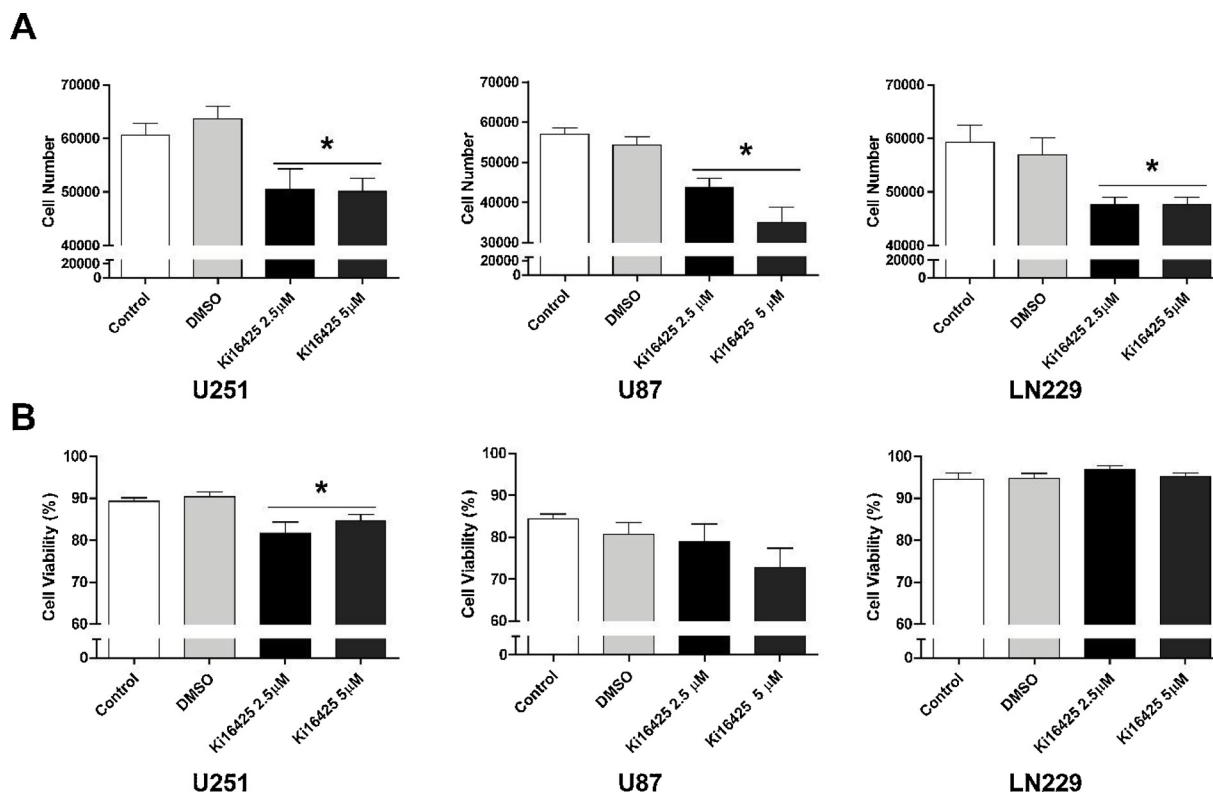
To confirm that PKC $\alpha$  translocation induced by LPA resulted in meaningful changes in cell proliferation, we evaluate the role of LPA<sub>1</sub> and PKC $\alpha$  on cell number and viability of glioblastoma cell lines. These assays were performed in the presence of 10% of FBS as the source of LPA, that is an abundant component of serum (Gaits et al., 1997; Li et al., 2003).

After 24 h of treatment with Ki16425 to antagonize LPA<sub>1</sub> receptor activity, all cell lines showed a decrease in cell number (Fig. 8A) and only U251 cell line showed a reduction in viability at this time

(Fig. 8B). To further study the impact of PKC $\alpha$  on cell number and viability, we silenced the expression of this kinase with a siRNA in the three cell lines, we observed that PKC $\alpha$  silencing decreased cell number but not viability in U87 and LN229 cell lines (Fig. 9A and B). However, in U251 cell line both processes were diminished (Fig. 9A and B), this may imply that in these cells LPA<sub>1</sub> and PKC $\alpha$  are relevant for proliferation and survival. Both treatments in the three cell lines did not have a synergistic or additive effect on cell number or viability (Fig. 9A and B) suggesting that LPA<sub>1</sub> and PKC $\alpha$  are in a common pathway.

### 3.6. LPA induces the phosphorylation of the progesterone receptor in the residue serine 400 (S400)

Previously, our group has demonstrated that PKC $\alpha$  phosphorylates



**Fig. 8.** LPA<sub>1</sub> inhibition decreased cell number in GBM cell lines. Cell number (A) and cell viability (B) in U251, U87, and LN229 were evaluated after 24 h of treatment with Ki16425 2.5 or 5 μM. Graphics represent the mean + S.E.M of 3 independent experiments by triplicate. Bonferroni post-test determined statistical difference \**p* < 0.05 versus control, and DMSO.

progesterone receptor (PR) at S400 (González-Arenas et al., 2015). The phosphorylation of PR on this residue induced an increase in proliferation, migration, and invasion in glioblastoma cells in vitro (González-Arenas et al., 2015; Marquina-Sánchez et al., 2016) suggesting a significant role of PKCα signaling in the nucleus by the activation of a nuclear receptor as PR that contributes to tumor development (González-Arenas et al., 2015; Lee et al., 2008). To assess if LPA<sub>1</sub> activation would induce PR phosphorylation S400 as a target of PKCα, we stimulated U87 and U251 cells with LPA 100 nM for 5, 15, 30 and 60 min using TPA as a positive activator of PKCα (Fig. 10A) and Ki16425 to antagonize LPA<sub>1</sub> activity (Fig. 10B).

We observed that LPA increased PR phosphorylation at serine 400 in both cell lines at 15 min (Fig. 10A). Interestingly, PKC activation with TPA induced PR phosphorylation from 5 to 30 min in U87 cells and until 60 min in U251 (Fig. 10A). Ki16425 blocked the phosphorylation induced by LPA at 15 min, while the treatment with only this LPA<sub>1</sub> receptor antagonist caused a decrease in PR basal phosphorylation that was significant compared to the control (Fig. 10B).

#### 4. Discussion

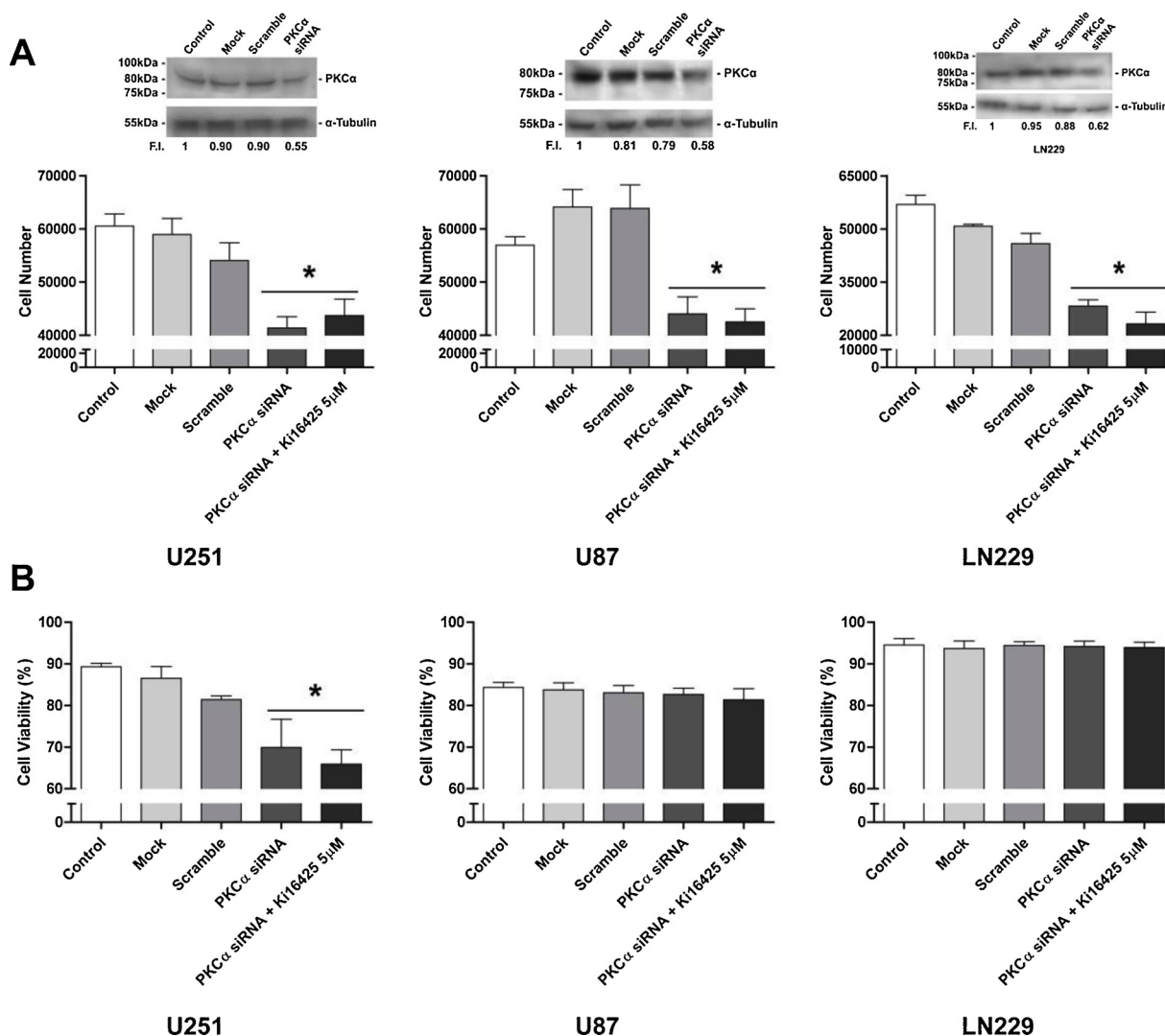
In this work, we studied three glioblastoma cell lines to analyze PKCα activation through LPA<sub>1</sub>. Firstly we evaluated the content of the enzyme that produces LPA, ATX (Perrakis and Moolenaar, 2014), we observed that all cell lines have a high content of this enzyme and release it to the culture media, suggesting an augmented LPA production that could contribute to LPA<sub>1</sub> activation. Next, we determined that LPA at low concentrations (10 and 100 nM) induced nuclear translocation of PKCα in U251 and U87 cell lines, meanwhile at high concentrations such as 1, 10 and 100 μM no effect was seen. A similar effect of this lysophospholipid has been observed in migration of GBM cell lines, where 100 nM and 1 μM of LPA induced higher migration compared to 10 and 100 μM (Kishi et al., 2006). These results may be explained by

the critical micelle concentration (CMC) of LPA; in pure water, LPA has a CMC of 0.346 mM, but at higher concentrations of salt, the CMC decreases dramatically to 0.06 mM (Li et al., 2004). It is essential to take this into account since the culture medium has abundant salts and phosphates that could reduce CMC to lower concentrations resulting in no effect of 1, 10 and 100 μM of LPA, probably due to micelle formation.

We demonstrated that LPA induces in a time-dependent manner PKCα translocation to the cell membrane in three GBM cell lines. LPA induced PKCα nuclear translocation from 5 to 15 min after stimulation that finally redistributed to the cytoplasm from 30 to 60 min. Additionally, we observed that PKCα nuclear translocation is mediated through LPA<sub>1</sub> in U251 and U87 cells, since they did not contain LPA<sub>3</sub>, and treatment with Ki16425 (the antagonist of LPA<sub>1</sub>) blocked the nuclear translocation of PKCα. Although LN229 expresses LPA<sub>3</sub>, it shows a similar pattern of nuclear translocation of the enzyme after LPA and LPA + Ki16425 treatments. Moreover, in this study, we used LPA 18:1 species, which preferentially activate LPA<sub>1</sub>, while LPA<sub>3</sub> is activated by 2-acyl-LPA (Valdés-Rives and González-Arenas, 2017). However, we can't dismiss a possible additive effect of LPA<sub>1</sub> and LPA<sub>3</sub> in this cell line.

The effect of blocking LPA<sub>1</sub> activation through Ki16425 for 24 h showed a similar reduction in the number of the three GBM cell lines at 2.5 and 5 μM. This leads us to hypothesize that despite the expression of LPA<sub>3</sub> in LN229, LPA<sub>1</sub> may induce the main pathway through which cell number is regulated since the three cell lines decreased cell number in 20% after Ki16425 treatment. Interestingly, when PKCα was silenced in U251, U87 and LN229 there was no additive or synergistic effect with Ki16425. These data suggest that LPA<sub>1</sub> could induce cell number preferentially through PKCα activation. It is worth noting that the absence of PKCα in LN229 reduced cell number in 50% compared to control, while U251 and U87 decreased it in 30%. This could be due to the lesser content of PKCα in this cell line compared to U251 and U87 but a higher dependency on this kinase for proliferation.

On the other hand, cell viability was not affected in U87 and LN229



**Fig. 9.** LPA<sub>1</sub> and PKC $\alpha$  inhibition reduce the cell number in GBM cell lines. A) (upper panel) U251, U87, and LN229 cells were transfected with a siRNA for PKC $\alpha$ ; Control: intact cells; Mock: cells treated only with transfection reagent without siRNA; Scramble: cells transfected with an aleatory RNA sequence. Representative Western blots for PKC $\alpha$  from cells lysed at 72 h after siRNA transfection (silencing) are shown. Cell number (lower panel A) and cell viability (B) were evaluated after PKC $\alpha$  silencing or PKC $\alpha$  silencing + 24 h of Ki16425 treatment. Cell cultures with mock, scramble, siRNA PKC $\alpha$ , and siRNA PKC $\alpha$  + Ki16425 were harvested at 96 h after siRNA transfection. Graphics represent the mean + S.E.M of 3 independent experiments by triplicate. Bonferroni post-test determined statistical difference \* $p$  < 0.05 versus control, mock and scramble.

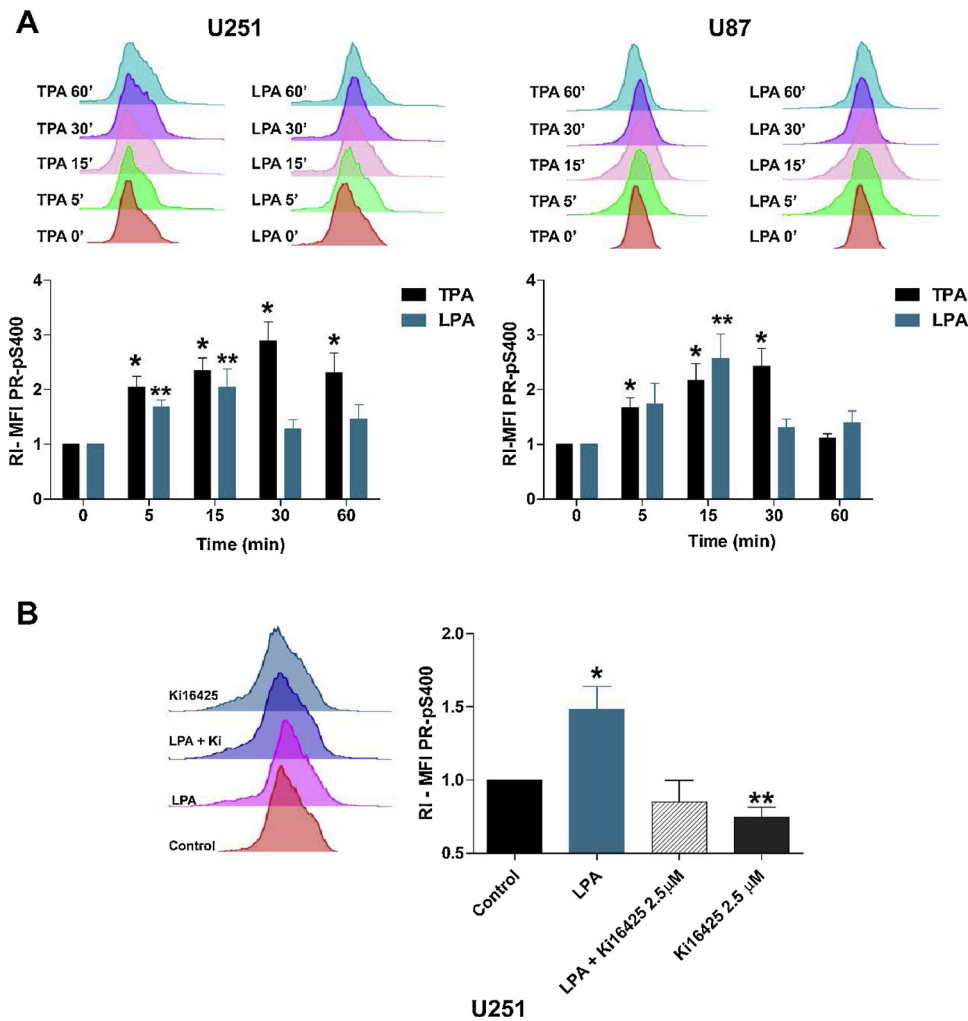
with Ki16425 and/or silencing of PKC $\alpha$ , while in U251 both treatments decreased this process. This leads us to suggest that there is a difference in how these cells regulate cell number. In U251 cell death may increase after blocking LPA<sub>1</sub> and/or PKC $\alpha$ , whereas in U87 and LN229 there may be a cytostatic effect. Diverse mechanisms could be involved in regulating cell number since differences between GBM cell lines have been documented. Differentially expressed proteins between the U251 and U87 cells are associated with regulation of nicotinamide nucleotide metabolism, RNA splicing, glycolysis, and purine metabolism pathways (Li et al., 2016). In this regard participation of PKCs in the splicing regulation of proapoptotic genes has been observed in different cell lines (Revil et al., 2007); inhibition of these enzymes induce the alternative splicing of Bcl-x to generate the proapoptotic Bcl-x<sub>S</sub> protein. However further investigation is needed to establish the mechanisms that regulate cell number and viability in U251, U87, and LN229 cells.

PKCs have been reported to target several proteins within the nucleus including histones, lamin, DNA topoisomerase, PARP, CREB, p53, GAP-43, Vitamin D3 receptor and PR among others (González-Arenas et al., 2015; Martelli et al., 2006; Trubiani et al., 2016). Our previous work in GBM cells reported that PKC $\alpha$  activation increased PR

phosphorylation. This modification induced the receptor transcriptional activity that resulted in an increase of progesterone-induced blocking factor (PIBF) expression (Marquina-Sánchez et al., 2016), a known PR target gene, that induces glioblastoma cell proliferation (González-Arenas et al., 2015). Other genes involved in cell proliferation as EGFR and VEGF are also upregulated by PR activation in a glioblastoma cell line (Hernández-Hernández et al., 2012).

In this work, we determined that LPA<sub>1</sub> activation induce PR phosphorylation. The highest PR phosphorylation in U251 and U87 cells correlated with the time at which PKC $\alpha$  translocated to the nucleus after LPA<sub>1</sub> activation. Interestingly, TPA and LPA induced a different pattern of PR phosphorylation; TPA induced more sustained phosphorylation, while LPA only at 5 and 15 min in U251 and 15 min in U87. These differences could be due to the activation of PKC $\alpha$ ; TPA induces a strong activation of PKCs without regulatory feedback (Lu et al., 1998). On the other hand, LPA induces a signaling cascade that mediates LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> and LPA<sub>3</sub> homologous desensitization (Alcántara-Hernández et al., 2015) that could decrease PKC $\alpha$  activation and the subsequent PR phosphorylation. However, further studies are needed to establish if PR phosphorylation on S400 is due to PKC $\alpha$  that has been





**Fig. 10. LPA induces the phosphorylation of PR (S400).** A) Upper panels: Representative histogram of the MFI (Mean Fluorescence Intensity) of U251 and U87 cell lines stimulated (5–60 min) with LPA 100 nM or TPA 1 μM. Bottom panels: Values are expressed as relative MFI, calculated by subtracting MFI of secondary antibody control and then dividing by the MFI of T0' of each experiment. Graphic representation, results are expressed as the mean ± S.E.M of 3 independent experiments. Bonferroni post-test determined statistical difference \*p < 0.05, versus control, on cells stimulated with TPA; \*\*p < 0.05, versus control, on cells stimulated with LPA. B) Left panel: Representative histogram of the MFI of U251 cell line with LPA 100 nM and/or Ki16425 2.5 μM. Right panel: Values are expressed as relative MFI. Graphic representation, results are expressed as the mean ± S.E.M of 3 independent experiments. Bonferroni post-test determined statistical difference \*p < 0.05, versus control and LPA + Ki16425; \*\*p < 0.05, versus control.

activated by LPA<sub>1</sub>.

It is important to note the differences between PKCα translocation induced by TPA or LPA, as there may be mistaken conclusions about this kinase activation in physiological or pathological conditions. Additionally, the study of LPA signaling cascades in GBM is an interesting topic since it could point to different targets for therapy in this lethal cancer.

## 5. Conclusions

GBM tumors are highly heterogeneous, therefore finding common pathways among the different subtypes is essential. Recent studies show that LPA might be relevant for GBM biology. In three GBM cell lines, LPA induced PKCα activation through LPA<sub>1</sub>, which led to kinase nuclear translocation that impacts on cell number and viability. Further studies are needed to elucidate LPA<sub>1</sub>/PKCα relevance in GBM growth that could lead to new therapeutic targets.

## Author Contributions

All authors contributed equally to this work.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

## Acknowledgments

This work was supported by UNAM-PAPIIT IA200718 and by Fondo Sectorial de Investigación para la Educación CB-255936/2015 CONACYT. Silvia Anahi Valdés-Rives is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a Fellowship 582,548 from CONACYT. We thank Miguel Tapia-Rodríguez (Unidad de Microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) Salvador Ramírez-Jiménez (Programa de Cáncer de mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), Valeria Hansberg-Pastor, Gabriela Piña-Medina (Facultad de Química, UNAM) and Marcos García-Juárez (UAT-CINVESTAV) for their technical support.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.03.003>.

## References

- Alcántara-Hernández, R., Hernández-Méndez, A., Campos-Martínez, G.A., Meizoso-Huesca, A., García-Sáinz, J.A., 2015. Phosphorylation and internalization of lysophosphatidic acid receptors LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, and LPA<sub>3</sub>. *PLoS One* 10, e0140583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140583>.
- Benesch, M.G.K., Tang, X., Maeda, T., Ohhata, A., Zhao, Y.Y., Kok, B.P.C., Dewald, J., Hitt, M., Curtis, J.M., McMullen, T.P.W., Brindley, D.N., 2014. Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice. *FASEB J.* 28, 2655–2666. <https://doi.org/10.1096/fj.13-248641>.

- Cameron, A.J., Procyk, K.J., Leitges, M., Parker, P.J., 2008. PKC alpha protein but not kinase activity is critical for glioma cell proliferation and survival. *Int. J. Cancer* 123, 769–779. <https://doi.org/10.1002/ijc.23560>.
- Choi, J.W., Chun, J., 2013. Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.07.015>.
- do Carmo, A., Balga-Silva, J., Matias, D., Lopes, M., 2013. PKC signaling in glioblastoma. *Cancer Biol. Ther.* 14, 287–294. <https://doi.org/10.4161/cbt.23615>.
- Fukushima, K., Takahashi, K., Yamasaki, E., Onishi, Y., Fukushima, N., Honoki, K., Tsujiuchi, T., 2017. Lysophosphatidic acid signaling via LPA1 and LPA3 regulates cellular functions during tumor progression in pancreatic cancer cells. *Exp. Cell Res.* 352, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.007>.
- Gaits, F., Fourcade, O., Le Balle, F., Gueguen, G., Gaigé, B., Gassama-Diagne, A., Fauvel, J., Salles, J.-P., Mauco, G., Simon, M.-F., Chap, H., 1997. Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett.* 410, 54–58. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00411-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00411-0).
- González-Arenas, A., Peña-Ortiz, M.Á., Hansberg-Pastor, V., Marquina-Sánchez, B., Baranda-Ávila, N., Nava-Castro, K., Cabrera-Wrooman, A., González-Jorge, J., Camacho-Arroyo, I., 2015. Pkca and pkcδ activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells. *Endocrinology* 156, 1010–1022. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1137>.
- González-Gil, I., Zian, D., Vazquez-Villa, H., Ortega-Gutiérrez, S., Lopez-Rodríguez, M.L., 2015. The status of the lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1R). *Medchemcomm* 6, 13–23. <https://doi.org/10.1039/C4MD00333K>.
- Hernández-Hernández, O.T., González-García, T.K., Camacho-Arroyo, I., 2012. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.04.005>.
- Kishi, Y., Okudaira, S., Tanaka, M., Hama, K., Shida, D., Kitayama, J., Yamori, T., Aoki, J., Fujimaki, T., Arai, H., 2006. Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine TO lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 281, 17492–17500. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601803200>.
- Koivunen, J., Aaltonen, V., Peltonen, J., 2006. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett.* 235, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.033>.
- Lee, S.Y., Lee, H.-Y., Kim, S.D., Jo, S.H., Shim, J.W., Lee, H.-J., Yun, J., Bae, Y.-S., 2008. Lysophosphatidylserine stimulates chemotactic migration in U87 human glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.117>.
- Lee, S.-C., Fujiwara, Y., Liu, J., Yue, J., Shimizu, Y., Norman, D.D., Wang, Y., Tsukahara, R., Szabo, E., Patil, R., Banerjee, S., Miller, D.D., Balazs, L., Ghosh, M.C., Waters, C.M., Oravec, T., Tigyi, G.J., 2015. Autotaxin and LPA 1 and LPA 5 receptors exert disparate functions in tumor cells versus the host tissue microenvironment in melanoma invasion and metastasis. *Mol. Cancer Res.* 13, 174–185. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0263>.
- Leve, F., Peres-Moreira, R.J., Binato, R., Abdelhay, E., Morgado-Díaz, J.A., 2015. LPA induces Colon Cancer cell proliferation through a cooperation between the ROCK and STAT-3 pathways. *PLoS One* 10 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139094>.
- Li, Y., Gonzalez, M.I., Meinkoth, J.L., Field, J., Kazanietz, M.G., Tennekoon, G.I., 2003. Lysophosphatidic acid promotes survival and differentiation of rat Schwann cells. *J. Biol. Chem.* 278, 9585–9891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213244200>.
- Li, Z., Mintzer, E., Bittman, R., 2004. The critical micelle concentrations of lysophosphatidic acid and sphingosylphosphorylcholine. *Chem. Phys. Lipids* 130, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.03.001>.
- Li, H., Lei, B., Xiang, W., Wang, H.F.W., Liu, Y., 2016. Differences in protein expression between the U251 and U87 cell lines. *Turk. Neurosurg.* 1. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1>.
- Loskutov, Y.V., Griffin, C.L., Marinak, K.M., Bobko, A., Margaryan, N.V., Geldenhuys, W.J., Sarkaria, J.N., Pugacheva, E.N., 2018. LPA signaling is regulated through the primary cilium: a novel target in glioblastoma. *Oncogene* 1. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0049-3>.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 114, 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131, 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- Lu, Z., Liu, D., Hornia, A., Devonish, W., Pagano, M., Foster, D.A., 1998. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell Biol.* 18, 839–845. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.2.839>.
- Mandil, R., Ashkenazi, E., Blass, M., Kronfeld, I., Kazimirska, G., Rosenthal, G., Umansky, F., Lorenzo, P.S., Blumberg, P.M., Brodie, C., 2001. Protein kinase Cα and protein kinase Cδ play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Cancer Res.* 61, 4612–4619.
- Marquina-Sánchez, B., González-Jorge, J., Hansberg-Pastor, V., Wegman-Ostrosky, T., Baranda-Ávila, N., Mejía-Pérez, S., Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., 2016. The interplay between intracellular progesterone receptor and PKC plays a key role in migration and invasion of human glioblastoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.10.001>.
- Martelli, A.M., Evangelisti, C., Nyakern, M., Manzoli, F.A., 2006. Nuclear protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids* 1761, 542–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.02.009>.
- Mills, G.B., Moolenaar, W.H., 2003. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 582–591. <https://doi.org/10.1038/nrc1143>.
- Mooleenar, W.H., 2006. Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 905, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06532.x>.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2018. CBRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro. Oncol.* 20, iv1–iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now131>.
- Perrakis, A., Moolenaar, W.H., 2014. Autotaxin: structure-function and signaling. *J. Lipid Res.* 55, 1010–1018. <https://doi.org/10.1194/jlr.R046391>.
- Revil, T., Toutant, J., Shkreta, L., Garneau, D., Cloutier, P., Chabot, B., 2007. Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* 27, 8431–8441. <https://doi.org/10.1128/MCB.00565-07>.
- Seo, E.J., Kwon, Y.W., Jang, I.H., Kim, D.K., Lee, S.I., Choi, E.J., Kim, K., Suh, D., Lee, J.H., Choi, K.U., Lee, J.W., Mok, H.J., Kim, K.P., Matsumoto, H., Aoki, J., Kim, J.H., 2016. Autotaxin regulates maintenance of ovarian Cancer stem cells through lysophosphatidic acid-mediated autocrine mechanism. *Stem Cells* 34, 551–564. <https://doi.org/10.1002/stem.2279>.
- Steinberg, S.F., 2008. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* 88, 1341–1378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2007>.
- Tabuchi, S., 2015. The autotaxin-lysophosphatidic acid-lysophosphatidic acid receptor cascade: proposal of a novel potential therapeutic target for treating glioblastoma multiforme. *Lipids Health Dis.* 14, 56. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0059-5>.
- Trubiani, O., Guarnieri, S., Diomedea, F., Mariggio, M.A., Merciaro, I., Morabito, C., Cavalcanti, M.F.X.B., Cocco, L., Ramazzotti, G., 2016. Nuclear translocation of PKCα isoenzyme is involved in neurogenic commitment of human neural crest-derived periodontal ligament stem cells. *Cell. Signal.* 28, 1631–1641. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2016.07.012>.
- Valdés-Rives, S.A., González-Arenas, A., 2017. Autotaxin-lysophosphatidic acid: from inflammation to Cancer development. *Mediators Inflamm.* 2017, 9173090. <https://doi.org/10.1155/2017/9173090>.
- Wegman-Ostrosky, T., Reynoso-Noverón, N., Mejía-Pérez, S.I., Sánchez-Correa, T.E., Alvarez-Gómez, R.M., Vidal-Millán, S., Cacho-Díaz, B., Sánchez-Corona, J., Herrera-Montalvo, L.A., Corona-Vázquez, T., 2016. Clinical prognostic factors in adults with astrocytoma: historic cohort. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 146, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.05.002>.
- Yung, Y.C., Stoddard, N.C., Chun, J., 2014. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.* 55, 1192–1214. <https://doi.org/10.1194/jlr.R046458>.
- Yung, Y.C., Stoddard, N.C., Mirendil, H., Chun, J., 2015. Lysophosphatidic acid signaling in the nervous system. *Neuron* 85, 669–682. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.01.009>.
- Zhang, H., Xu, X., Gajewiak, J., Tsukahara, R., Fujiwara, Y., Liu, J., Fells, J.I., Perygin, D., Parrill, A.L., Tigyi, G., Prestwich, G.D., 2009. Dual activity lysophosphatidic acid receptor Pan-Antagonist/Autotaxin inhibitor reduces breast Cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo. *Cancer Res.* 69, 5441–5449. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0302>.

## Review Article

# Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications

**Silvia Anahi Valdés-Rives,<sup>1</sup> Diana Casique-Aguirre,<sup>2</sup> Liliana Germán-Castelán,<sup>1</sup> Marco A. Velasco-Velázquez,<sup>2,3</sup> and Aliesha González-Arenas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico*

<sup>2</sup>*Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico*

<sup>3</sup>*Unidad Periférica de Investigación en Biomedicina Translacional, ISSSTE C.M.N. 20 de Noviembre, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico*

Correspondence should be addressed to Marco A. Velasco-Velázquez; [marcovelasco@unam.mx](mailto:marcovelasco@unam.mx) and Aliesha González-Arenas; [alieshagonzalez@gmail.com](mailto:alieshagonzalez@gmail.com)

Received 28 July 2017; Revised 22 September 2017; Accepted 28 September 2017; Published 12 November 2017

Academic Editor: Francesco Pasqualetti

Copyright © 2017 Silvia Anahi Valdés-Rives et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most hostile type of brain cancer. Its aggressiveness is due to increased invasion, migration, proliferation, angiogenesis, and a decreased apoptosis. In this review, we discuss the role of key regulators of apoptosis in GBM and glioblastoma stem cells. Given their importance in the etiology and pathogenesis of GBM, these signaling molecules may represent potential therapeutic targets.

## 1. Introduction

The most frequent and aggressive human brain tumor is glioblastoma multiforme (GBM), which is a glial cell-derived tumor (glioma) with high malignant potential that has a tendency to invade the surrounding tissue [1]. These tumors arise either from glioma altered cells that facilitate tumor initiation and progression or from glioblastoma stem cells (GSCs) that possess the ability to self-renew and initiate tumor formation [2].

GBM originates anywhere in the brain but is mainly located in the cerebral cortex, appearing more frequently in adults between 40 and 60 years old [1]. GBM represent the maximal progression stage of astrocytomas, which are classified according to their histopathological and molecular features into four grades (I–IV). The survival of patients is inversely related to tumor grade [1]. GBM patients have a median survival of just 4.6 months. In optimally treated patients, the median survival increases to 14 months with a

26% two-year survival rate [3, 4]. The classical chemotherapeutic drug used in the treatment of this kind of tumors is Temozolomide, an agent that alkylates DNA at the N-7 or O-6 positions of guanine residues; therefore, it triggers cell death [5].

GBM can arise de novo (primary GBM) or transform from a lower grade astrocytoma (secondary GBM); thus each is characterized by distinct genetic events. GBM de novo frequently has EGFR amplification (34%) and PTEN loss/mutations (24%), while secondary GBM is characterized by TP53 mutations (65%) and IDH1 mutations (70%). Despite these differences, both tumors have the same histopathological features [6–8]. Nevertheless, primary GBM are more aggressive and less responsive to treatment compared to secondary ones.

## 2. GBM Intertumor Heterogeneity

A catalog of genomic abnormalities of GBM has been reported through the Cancer Genome Atlas [9], which



allowed Verhaak's group to classify GBM into four subtypes: classical, mesenchymal, proneural, and neural [10]. The classical subtype has *EGFR* amplification and loss of *TP53* and *CDKN2A*. It also harbors an *EGFRvIII* mutation constitutively active due to the deletion of exons 2–7 of the *EGFR* gene. This subtype presents Nestin overexpression and has activated the Notch and SHH pathways [10]. The mesenchymal subtype is associated with poor overall survival and contains *NFI* mutations and loss of *IDH1*, *PIK3RI*, and *PDGFRA*. It presents overexpression of *MET* and *CHI3L1* and activation of the NF $\kappa$ B pathway [10].

The proneural subgroup has augmented frequency of mutations in *IDH1* and *TP53* and amplifications of *PDGFRA* and *PIK3CA/PIK3RI*. This group has the highest percentage of younger patients [10]. The neural subtype has elevated levels of neural markers such as *NEFL*, but it has no unique distinguishing alterations from other classes, although elevated rates of *EGFR*, *TP53*, and *PTEN* mutations are observed [10].

To date, the differences on apoptotic pathways between GBM subtypes have not been clarified. The identification of the mechanisms leading to decreased apoptosis in each subtype might lead to better therapies in the future. For example, the proneural subtype could be dependent on the PI3K/AKT pathway for survival, whereas the mesenchymal subtype could be dependent on the TNF/NF $\kappa$ B pathway. Thus, epidemiological, molecular, and pharmacological studies are required to identify the best therapeutic strategies for each GBM subtype.

### 3. Signals Regulating Apoptosis in GBM

Apoptosis is an essential mechanism by which the homeostatic balance between cell proliferation and cell death is maintained [24, 25]. In apoptosis, cells activate a molecular pathway that leads them to die in case they become damaged and the cell mechanism fails to repair it. This process can be achieved through the activation of two molecular pathways, the extrinsic and the intrinsic pathway. Both pathways lead to the proteolytic activation caspases [24, 25]. These proteases induce cell changes that include chromatin condensation, DNA fragmentation, membrane blebbing, and cell shrinkage [24, 25]. The extrinsic pathway is triggered from outside the cell by proapoptotic ligands that activate cell surface death receptors. After binding to them, the formation of a death-inducing signaling complex (DISC) is induced. This protein complex activates procaspase-8 and procaspase-10 and, eventually, caspase-3 to execute apoptosis [24, 25]. The intrinsic pathway is activated from inside the cell by severe cell stress, such as DNA damage. The latter promotes mitochondrial outer membrane permeabilization and activation of BH3-only proapoptotic B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family proteins. This allows the release of proapoptotic proteins, like cytochrome c and second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) from the mitochondria into the cytosol. Cytochrome c forms a complex with apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) known as the apoptosome to activate caspase-9. This caspase, in turn, activates the effector

caspase-3, caspase-6, and caspase-7, which in turn executes apoptosis [24, 25].

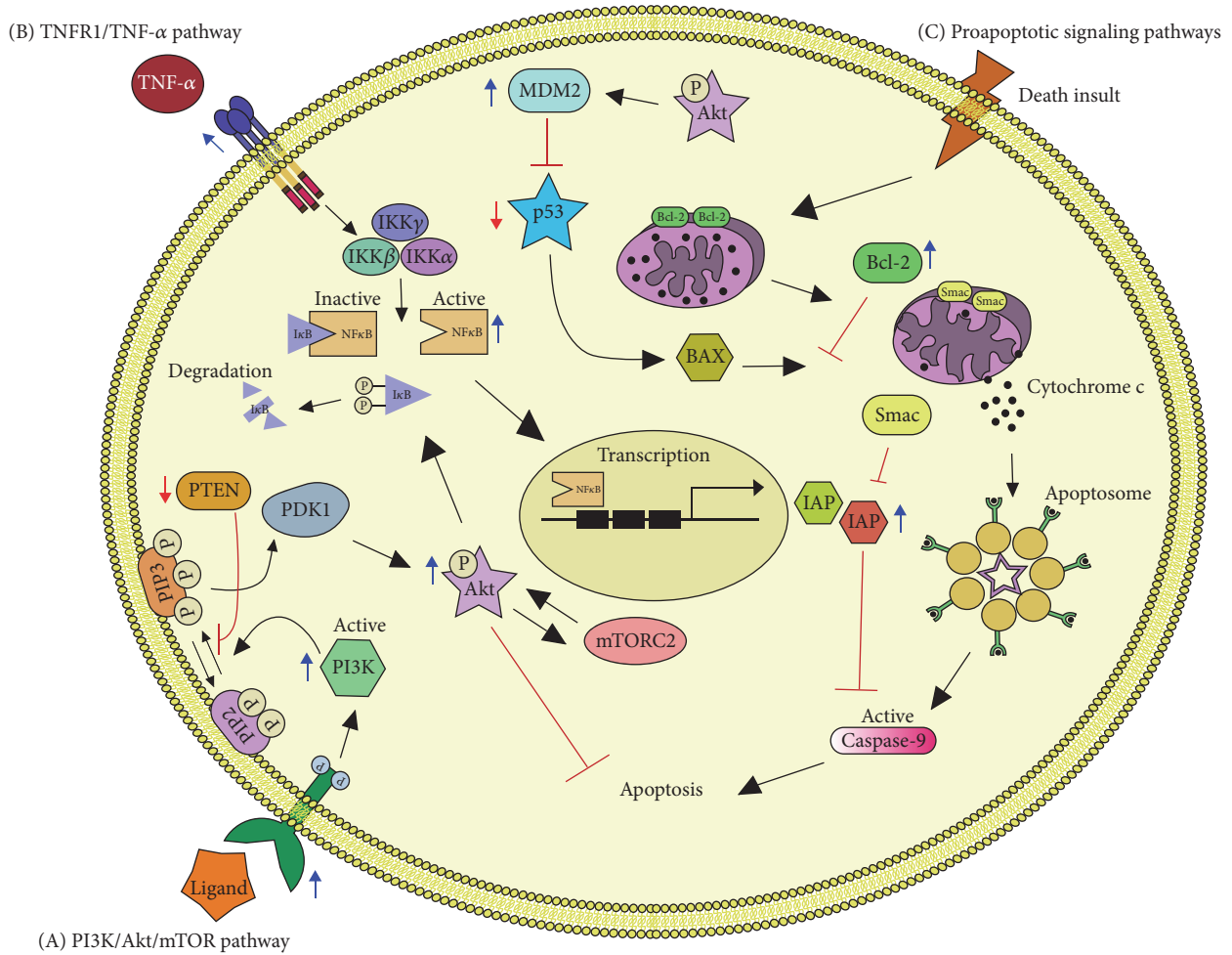
GBM cells show intrinsic deregulation in apoptotic cell death. Furthermore, antitumor drugs and radiotherapy affect the pathways that control apoptosis in GBM cells, activating prosurvival mechanisms that make the treatments ineffective. Thus, research into the possible enhancement of apoptosis of GBM is a primary goal in the development of new and more effective treatments. In the present review, we summarize the role of apoptosis-controlling intracellular pathways in GBM cells (Figure 1) and discuss their importance as therapeutic targets. Finally, we highlight the differences in apoptosis signaling in the subpopulation of GSCs.

**3.1. PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibits GBM Apoptosis.** PI3K is a kinase that plays a central role in signaling pathways controlling cell survival, proliferation, motility, angiogenesis, and apoptosis [25–27]. The activation of PI3K through its cognate cell surface receptors, such as growth factor receptors, phosphorylates the plasma membrane lipid phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) producing the second messenger phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> induces the accumulation of signaling proteins such as AKT and the phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) by direct binding. Association with PIP<sub>3</sub> at the cell membrane results in AKT phosphorylation by induced-proximity to PDK1 [26]. After its activation, AKT regulates downstream targets like GSK-3 $\beta$ , Bad, and mTOR complex to name a few [26, 28].

It has been reported that PI3K/AKT signaling is probably deregulated in 80% of all GBM. The latter is estimated because the majority of tumors have overexpression of *EGFRvIII* variant and loss of *PTEN* (see Section 3.2) [10, 29]. Furthermore, there is a direct correlation between AKT activation and the histopathological grade of glioma with 84% of GBM positive to phosphorylated AKT (pAKT), whereas it is scarcely detected in healthy tissue [30]. AKT is the intermediary of PI3K-dependent cell survival responses since its absence abrogates these effects.

In GBM, pAKT induces overexpression of MDM2 proto-oncogene, which is an important negative regulator of p53 [31–33] and inhibits the apoptosis-inducing protein Bad that is inactive when phosphorylated [34]. Moreover, AKT can indirectly activate mTOR, which is a protein kinase critical for cell proliferation deregulated in GBM [11, 35]. mTOR acts as both a downstream effector and an upstream regulator and its signaling is carried out by two protein complexes known as mTORC1 and mTORC2. mTORC1 regulates cell growth, while mTORC2 phosphorylates AKT at Ser-473 and then further takes part in cell survival, metabolism, proliferation, and cytoskeletal organization [11, 36].

The impact of PI3K/AKT/mTOR pathway in cell survival suggests that its inhibition may lead to increase apoptosis and to be of therapeutic value in GBM [35]. Additionally, its inhibition could increase the cytotoxic potential of the glioma-associated microglia because it polarizes microglial cells towards the M1 phenotype, with cytotoxic activities, and prevents the induction of the M2 that promotes tumor growth [36].



**FIGURE 1: Apoptotic Pathways in Glioblastoma.** (A) The activation of PI3K ensues by the binding of a ligand to a receptor tyrosine kinase (RTK). The RTK activation by phosphorylation of its intracellular domain activates the catalytic subunit of PI3K; this results in the generation of PIP<sub>3</sub> from PIP<sub>2</sub>. PIP<sub>3</sub> activates PDK1 which in turn phosphorylates AKT. AKT phosphorylates many downstream targets, including IκB to induce NFκB activation and mTORC2 and MDM2 to induce cell survival. PTEN antagonizes the PI3K pathway by dephosphorylating the second messenger PIP<sub>3</sub> to PIP<sub>2</sub>. (B) TNF-α is a potent activator of NFκB, which binds to its receptor (TNFR1) enabling the degradation of IκB, by the IKK complex. This allows the translocation of NFκB to the nucleus where it regulates the expression of its target genes such as IAPs, which can directly bind and inhibit caspase-3, caspase-7, and caspase-9. (C) A variety of death stimuli can induce the release of cytochrome C from the mitochondria and trigger the formation of the apoptosome with subsequent caspase cascade activation leading to apoptosis. BCL-2 controls the mitochondrial membrane permeability and can inhibit this process, whereas BAX stimulates it. BAX is activated by p53 but p53 is negatively regulated by MDM2. Smac is located within the mitochondrial intermembrane space and enters the cytosol when cells undergo apoptosis to inhibit IAPs. Blue arrows denote overexpression and red arrows denote loss of function.

Several dual inhibitors targeting PI3K and mTOR have been developed (Table 1). For example, PI-103 and NVP-BEZ235 induce growth blockage and autophagy induction better than does the mTORC1 inhibitor rapamycin, by blocking the phosphorylation of AKT and mTORC1 target 4EBP1 [11, 35]. However, temsirolimus, a small-molecule inhibitor of mTOR, displays a limited clinical efficacy, since only a subset of patients with high levels of phosphorylated p70s6 kinase in tumor samples were more likely to benefit from treatment. Temsirolimus increased 2.3 months the median survival of GBM patients [14].

At the moment, targeted therapy towards PI3K/AKT/mTOR pathway has not achieved satisfactory results. For

further studies, it is important to analyze the reason why some treatments are more beneficial than others taking the following into consideration as possible limiting factors: the number of targets they have, the capacity to cross the blood brain barrier and to reach an optimal concentration in the tumor microenvironment, heterogeneity of GBM, and the activation of alternative signaling pathways.

**3.2. PTEN Loss in GBM Apoptosis.** PTEN is a tumor suppressor gene that antagonizes the PI3K/AKT/mTOR pathway by functioning as a lipid phosphatase. PTEN acts on the lipid signaling intermediate PIP<sub>3</sub> to convert it into PIP<sub>2</sub>, thereby preventing the activation of AKT [37]. PTEN is a

TABLE 1: Summary of drugs targeting apoptotic pathways in GBM.

Drug	Target	Mechanism of action	STAGE*	ID ( <a href="https://clinicaltrials.gov">https://clinicaltrials.gov</a> )	Reference
PI-103	AKT & mTORC1	Prevents phosphorylation of AKT and 4EBP1	PC		[11]
BKM120	PI3K	Direct inhibition of PI3K	Ph I	NCT01339052	[12]
NVP-BEZ235	PI3K and mTOR	ATP-competitive inhibitor of PI3K and mTOR	Ph II	NCT02430363	[13]
Temsirolimus	mTOR	Direct inhibition of mTOR	Ph II	NCT00016328	[14]
Bortezomib	I $\kappa$ B complex	Proteasome inhibitor that blocks I $\kappa$ B degradation	Ph II	NCT00998010	[15]
BAY 11-7082	I $\kappa$ K	Inhibits I $\kappa$ K and prevents NF $\kappa$ B nuclear translocation	PC		[16]
DHMEQ	NF $\kappa$ B	Inhibits NF $\kappa$ B DNA binding	PC		[17]
ABT-737	BCL-2	Direct binding and inhibition of BCL-2	PC		[18]
AT-101	BCL-2, BCL-XL, MCL-1 & BCL-W	BH3 mimetic and BCL-2 family inhibitor	Ph II	NCT00540722	[19]
ABT-263/GX15-070	BCL-2 & MCL-1	Direct binding and inhibition of BCL-2 and MCL-1	PC		[20]
LBW242/BV6	XIAP, c-IAP1, & c-IAP2	Smac mimetic	PC		[21–23]

\*PC: preclinical; Ph I: phase 1 clinical trial; Ph II: phase 2 clinical trial.

unique phosphatase; there are no PTEN-related proteins that compensate for its loss of function. It has been reported that PTEN is inactivated in GBM. Mutations in PTEN have been associated with the malignant evolution of astrocytic tumors since they are most frequently found in GBM and rarely in lower grades [38, 39]. PTEN mRNA levels are much lower in glioma tissue compared with benign brain tumors and tumor-adjacent normal tissues [40]. The lack of PTEN function is associated with poor survival rather than with tumor initiation in anaplastic astrocytoma and GBM [41]. There is extensive evidence suggesting that the loss of PTEN by mutation, methylation, or deletion leads to a decreased apoptosis [37, 42]. The loss of PTEN is frequent in GBM, and therefore it is difficult to target it for therapy. Recently, a correction of PTEN mutation in GBM cell lines was reported [43]. Using adenoassociated virus-mediated gene edition *PTEN* allele was corrected in two GBM cell lines—42MGBA and T98G. In both cases, the edition resulted in reduced cellular proliferation in an AKT-dependent (42MGBA) and AKT-independent (T98G) manner [43]. Thus, genome editing technologies can be applied to correct genetic mutations in a gain-of-function manner [44, 45]. Whether these strategies are useful for GBM

treatment in patients and whether tumor editing is possible in the brain remain to be clarified.

**3.3. Role of NF $\kappa$ B in GBM Apoptosis.** NF $\kappa$ B [nuclear factor kappa B] is a transcription factor for a large group of genes which are involved in apoptosis, cell adhesion, proliferation, and inflammation [46]. NF $\kappa$ B has 5 subunits: p50, p52, p65, RelB, and c-Rel. These subunits exist in homo- or heterodimers, the most abundant dimer being p65/p50. NF $\kappa$ B is sequestered in the cytoplasm by I $\kappa$ B. This association is rapidly interrupted by diverse signals like cytokines, pathogens, stress signals, and radiation [47]. These signals activate a kinase complex known as I $\kappa$ K. I $\kappa$ K complex is formed of three subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) which phosphorylates and inactivates I $\kappa$ B, which allows the nuclear translocation of NF $\kappa$ B and the subsequent regulation of its target genes including those of Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) [47, 48]. Levels of activated NF $\kappa$ B, measured by phosphorylation of the subunits p65/p50, are much higher in GBM compared with that of healthy tissue, and they present a positive correlation with glioma grade [30]. Approximately 96% of the tumors analyzed in two independent studies express activated NF $\kappa$ B [30, 49]. Similarly, it has been found that

NF $\kappa$ B is constitutively activated in several human-derived glioblastoma cell lines like U251-MG, U87-MG, and U373 [30].

There are two mechanisms of NF $\kappa$ B activation in GBM: AKT phosphorylation of I $\kappa$ B and TNF- $\alpha$ /TNFR1 pathway [30, 49–51]. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induces the main antiapoptotic activity of NF $\kappa$ B through its death receptors TNFR1 by suppression of caspase-8 activation [50, 52, 53]. The expression of TNFR1 is elevated in GBM compared with the lower grade and scarcely detectable in astrocytomas and healthy brain tissue suggesting a vital role in these tumors [54].

Enhancement of apoptosis by targeting NF $\kappa$ B has had several approaches (Table 1). Bortezomib is a proteasome inhibitor that blocks I $\kappa$ B proteins degradation, among others. It has been evaluated in phase 1 clinical trial either alone or in combination with Temozolomide and radiotherapy [15, 55]. The usage of bortezomib alone showed a partial clinical efficacy although it was not reflected on the overall survival. The combined therapy bortezomib with Temozolomide and radiotherapy was reported to be well tolerated and safe. Currently, a phase 2 trial is active with an overall survival of two years for newly diagnosed GBM undergoing this therapy [15, 55]. BAY 11-7082, an I $\kappa$ K inhibitor, effectively inhibits NF $\kappa$ B which leads to lower chemoresistance, improves sensitivity to photodynamic therapy, and induces senescence [16]. To date, no clinical trials have been reported for this inhibitor. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) is an NF $\kappa$ B inhibitor undergoing preclinical testing [17], where it has shown that inhibition of NF $\kappa$ B activation and its nuclear translocation lead to increased apoptosis [17, 56].

NF $\kappa$ B influences multiple cellular processes in normal cells. Therefore, care must be taken when blocking the NF $\kappa$ B pathway to minimize off-target effects and unwanted toxicities. Dual or multitarget therapies may prove more beneficial by targeting several regulators of this pathway, although no studies or drugs have been reported to date.

**3.4. BCL-2 in GBM Apoptosis.** The B-cell lymphoma-2 (BCL-2) is a family of proteins ranging in size from 20 to 37 kDa: BCL-2, BCL-x<sub>L</sub>, MCL-1, BCL-w, BFL-1/A1, BCL-B, BAX, BAK, and BOK [57]. This family participates in cell death and modulates different processes that include apoptosis (BAX, BAK, and BID), necrosis (BAX), and autophagy inhibition (BCL-2, BCL-x<sub>L</sub>, MCL-1, and BCL-w) [57]. The 26 kDa form of BCL-2 protein is localized on the outer mitochondrial membrane, nuclear envelope, and endoplasmic reticulum [58, 59]. This protein is able to regulate the outer mitochondrial membrane permeability of transition pores by blocking proapoptotic proteins like BAX and BAK. Thus, it inhibits the release of cytochrome c from the mitochondria and prevents the formation of the apoptosome, activation of caspases, and eventually cell death [60]. BCL-2 protein is overexpressed in GBM [61] and recurrent tumors [62]. *In vitro* studies have shown that the use of antisense constructs or chemical inhibitors, such as ABT-737, is capable of mitigating the antiapoptotic effects of BCL-2 and renders the cells sensitive to cytotoxic treatments (Table 1) [18, 63]. However, GBM has

shown resistance to ABT-737 and a similar compound ABT-263 by upregulating MCL-1, another antiapoptotic member of the BCL-2 family. The combined use of ABT-263 and GX15-070, an inhibitor of MCL-1, has shown to effectively reverse this resistance [20]. Preclinical studies seem promising, especially when inhibitors are in combination with additional chemotherapy agents [64]. Once the benefit of using BCL-2 family inhibitors has been established, an obstacle to overcome will be to evaluate if these drugs are able to cross the blood brain barrier, since *in vivo* studies have only been done with subcutaneous tumors of GBM cell lines.

**3.5. Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) Role in GBM.** IAPs comprise a family of proteins which have a common domain of 70-amino-acid baculovirus repeats (BIR domains) in their structure. This family of proteins consists of 8 members: NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, livin, survivin, and BRUCE [65, 66]. These proteins can inhibit apoptosis by neutralizing active caspases, through their degradation or by blocking caspase-3, caspase-7, and caspase-9 by binding to their catalytically active pockets [65]. Smac is a protein that promotes cytochrome c release and TNF- $\alpha$  dependent apoptosis by direct binding and inhibition of IAPs (XIAP, c-IAP1, and c-IAP2), at the same time inhibiting the TNF- $\alpha$ /TNFR antiapoptotic pathway [66].

Within the genomic alterations commonly detected in GBM is the amplification of chromosomal band 11q22, which contains IAP1- and IAP2-encoding genes [67, 68]. Three types of IAPs are widely expressed in glioma cell lines at both mRNA and protein level [69]. They participate in cell survival under apoptotic *stimuli*. This suggests that IAPs may play a role in the resistance of gliomas to apoptosis induced by radio- and chemotherapy [69]. In accordance, the inhibition of IAPs, namely, XIAP and survivin, by antisense oligos sensitizes tumor cells to death [70, 71]. Smac mimetics (e.g., LBW242 and BV6) can also sensitize cancer cells to chemo- and radiotherapy and induce regression of malignant gliomas *in vivo* (Table 1) [21–23, 66]. LBW242, in combination with the PDGFR kinase inhibitor AMN107, triggered apoptosis in human GBM cells *in vitro* and had synergistic effects in mouse models of GBM and primary human GBM neurospheres [21]. In the same fashion, BV6 sensitizes GBM to Temozolomide which induces caspase-8 activation and apoptosis [22].

*In vitro* and *in vivo* data show IAPs as promising targets in anticancer therapy, although the efficacy and tolerability of adverse effects of these agents remain to be determined in clinical trials.

## 4. Apoptosis Control in Glioblastoma Stem Cells (GSCs)

GBM tumors present heterogeneous clonal subpopulations. For example, up to three different molecular subtypes have been found in the same patient, with a prevalence of mesenchymal subtype in males [4, 72, 73]. This clonal divergence can be caused by the genetic instability intrinsic to cancer cells combined with the selective pressure elicited by therapeutic



interventions [74]. Furthermore, intratumor heterogeneity is increased by cell plasticity, which allows glioblastoma cells to dedifferentiate to a stem cell-like state [75].

GSCs have functional properties distinct to the rest of glioblastoma tumor cells. They can self-renew and generate progenitor cells, creating a hierarchy consisting of subpopulations of tumorigenic and nontumorigenic cells [76]. GSCs drive GBM growth and promote tumor recurrence and drug resistance [77]. Thus, the presence of GSCs is associated with aggressive tumors and higher mortality rates [77]. Accordingly, the monitoring of the intratumor heterogeneity using GSCs molecular markers in the initial surgery and surgery for recurrent GBM may be important for the most effective management of GBM [78]. Furthermore, GSCs have been pointed as targets for the development of better therapies for this kind of tumors [79].

GSCs express different molecular markers associated with their maintenance, including pluripotency factors such as SOX2, Nanog, and OCT4 [80, 81]. However, GSCs are commonly identified by CD133 or CD44 expression. CD133 is a membrane glycoprotein encoded by prominine-1 gene (PROM1). CD133 is expressed in hematopoietic stem cells, endothelial progenitor cells, and neural stem cells [82, 83], and it is essential for the maintenance of GSCs [80]. CD133 silencing in GSCs reduces proliferation, self-renewal, and tumorigenic capacity. Accordingly, GBM patients with high CD133 levels show poor clinical prognosis [84].

CD44 is a surface receptor that preferentially binds to hyaluronic acid (HA) [85]. In cancer cells, CD44 modulates adhesion, migration, and cell division. CD44 is expressed in GSCs and stem cells from other tumors such as breast and colon carcinomas and leukemias [86–88]. In brain tumors, CD44 expression is associated with increased tumor initiation and progression. In a mouse model of glioma, CD44<sup>+/+</sup> animals developed significantly more high-grade gliomas and had shorter survival times than did CD44<sup>+/-</sup> or CD44<sup>-/-</sup> mice [89]. Accordingly, CD44 showed higher expression in higher-grade brain tumors [90].

Recent evidence suggests that CD133<sup>+</sup> and CD44<sup>+</sup> cells represent two different populations of GSCs with different transcriptomic signatures and cell functions. GSCs expressing CD133 display a proneural phenotype, while CD44<sup>+</sup> GSCs are mesenchymal [91]. Patients with tumor CD44 expression have more aggressive, angiogenic, and radiation-resistant phenotypes but respond better to Temozolomide. In contrast, patients with CD133 expression had a better response to radiotherapy [92]. Moreover, CD133<sup>+</sup> and CD44<sup>+</sup> cells can be found simultaneously in xenotransplants generated from patients-derived glioma cells. Hypoxia induces a change from CD44<sup>+</sup> to CD133<sup>+</sup>, but chemotherapy switches from CD133<sup>+</sup> to CD44<sup>+</sup> [78]. Thus, cell plasticity allows the bidirectional conversion between the two phenotypes in response to environmental factors.

**4.1. PI3K/AKT/mTOR Pathway Also Controls Apoptosis in GSCs.** The PI3K/AKT/mTOR signaling cascade promotes proliferation and survival in GSCs. The evidence supporting this idea comes mainly from the effects of inhibitors of the

pathway in GSCs. For example, the use of FC85, a dual AKT/mTOR inhibitor, induces apoptosis both in glioblastoma cell lines and in GSC-enriched cultures. Furthermore, the reactivation of p53 with an MDM2 inhibitor enhances the apoptotic effect of FC85 in GSCs [33]. NVP-BEZ235 is an imidazoquinoline that acts as a dual inhibitor of PI3K/mTOR, and it is currently in phase 1 and 2 clinical trials for advanced solid tumors and metastatic cancer (Table 1). NVP-BEZ235 inhibits proliferation and enhances radiosensitivity in a cell line derived from CD133<sup>+</sup> GSCs. The combination of NVP-BEZ235 and radiation blocks cell proliferation and increases apoptosis. Such effects correlate with the increased expression of the proapoptotic proteins BID, Bax, and caspase-3 as well as with augmented radiation-induced DNA damage [13]. The PI3K pathway is also active in cancer stem cells from prostate [93] and breast [94] tumors, highlighting the role of this pathway in the biology of cancer stem cells.

**4.2. Apoptosis Signals Specific of GSCs.** GSCs are phenotypically and biologically different to the GMB bulk cells. Proteins that are differentially expressed in GSCs can regulate their survival. The examples provided below show that this is the case but also demonstrate that GSCs are sensitive to apoptosis-induction when these molecules are targeted.

Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT3) is a transcription factor whose activation plays a crucial role in proliferation, apoptosis-induction, and differentiation of GSCs. STAT-3 knock-down reduces the percentage of CD133<sup>+</sup> cells and neurosphere-formation in GSC-enriched cultures and decreases tumorigenicity *in vivo* [95, 96]. In human GBM cells grown as neurospheres to increase GSC content, pharmacological inhibition of STAT-3 dimerization decreases the expression of pluripotency, proproliferative, and antiapoptotic genes. The treatment reduces BCL-XL and survivin expression, inducing caspase-3 activation and apoptosis in GSCs [97]. Similarly, inhibition of STAT3 with the natural compound cardamonin (2',4'-dihydroxy-6'-methoxychalcone) suppresses STAT3 downstream gene expression including BCL-XL, survivin, BCL-2, Mcl-1, and VEGF. Consequently, cardamonin inhibits proliferation and induces apoptosis in CD133<sup>+</sup> GSCs [98].

The Notch signaling pathway is overactivated in GBM, particularly in those with EGFR amplification (reviewed in [99]). The treatment of GBM neurosphere cultures with  $\gamma$ -secretase inhibitors to prevent Notch cleavage reduces the number of CD133<sup>+</sup> cells and *in vitro* clonogenicity, demonstrating that the Notch pathway is important for stemness maintenance. Blockage of the Notch pathway induces both decreased proliferation and increased apoptosis. The latter effect is associated with an inhibition of AKT- and STAT3-phosphorylation and an increase in the proapoptotic cleaved form of caspase-3 [100]. These data suggest that Notch cross-talk with PI3K/AKT and STAT3 signaling promotes the survival of GSCs.

Finally, the Hedgehog pathway has also been implicated in the control of apoptosis of GSCs. Arsenic trioxide (AT) can directly bind and inhibit GLI proteins [101, 102] which are transcriptional effectors of the Hedgehog pathway. The

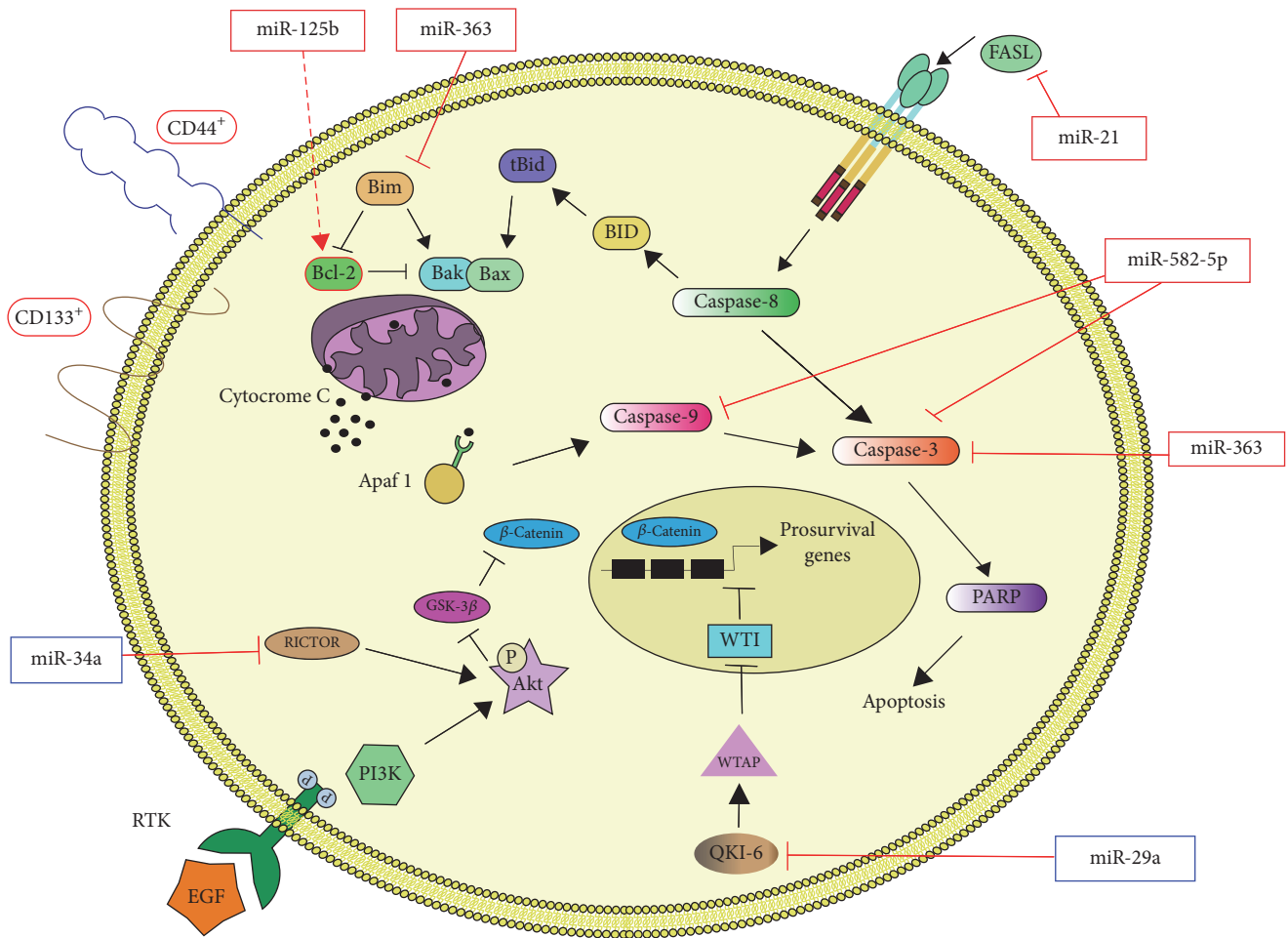


FIGURE 2: *miRNAs in GSC Apoptosis*. Schematic representation of the interactions between miRNAs and apoptosis signals in GSCs. Red lines represent the findings discussed in text (solid lines for direct and dashed lines for indirect regulation) while black lines represent established apoptotic pathways. Framed miRNAs or proteins indicate whether they are overexpressed (red frame) or underexpressed (blue frame) in GSCs.

treatment of glioblastoma neurosphere cells with AT induces apoptosis by increasing caspase-3 cleavage. AT reduces the expression of Hedgehog pathway target genes, such as PTCH1, N-Myc, and GLI2, but also the expression of the Notch pathway target genes HES1, HES5, and HEY1 and that of the pluripotency factor SOX2 [103]. These data suggest that apoptosis-induction by AT may be caused by impairment in multiple pathways controlling stemness.

**4.3. Role of microRNAs (miRNAs) in GSC Apoptosis.** At present, studies analyzing the cellular processes regulated by miRNAs in GSCs are scarce. However, as for other CSC, miRNAs seem to play key roles in apoptosis, differentiation, proliferation, migration, and invasion, as well as resistance of GSCs. In this section, we present the linkage of miRNAs to the signaling controlling apoptosis in GSCs (summarized in Figure 2). This information supports the idea that miRNAs can be potential therapeutic targets for the eradication of GSCs, as previously proposed [76, 77].

MiR-125b is overexpressed in CD133<sup>+</sup> GSCs and its expression correlates with increased resistance to Temozolomide [104, 105]. A reduction in the expression of miR-125b-2 in combination with Temozolomide leads to apoptosis in GSCs by decreasing BCL-2 expression and increasing Bax, cytochrome c, Apaf-1, caspase-3, and poly-ADP-ribose polymerase (PARP) proteins [104]. Furthermore, Bak1 is a direct target of miR-125b in GSCs and its exogenous forced expression restores Temozolomide sensitivity [105]. Similarly, in breast cancer cells, miR-125b confers resistance to paclitaxel through suppression of Bak1 [106].

The expression of miR-21 is also increased in CD133<sup>+</sup>-enriched neurosphere cultures. In those cells, Fas ligand (FASL) is downregulated by miR-21; consequently, they have increased proliferation and reduced apoptosis. The inhibition of miR-21 increases FASL expression and induces apoptosis [107], probably due to the FAS-mediated activation of the caspase cascade. Similarly, miR-582-5p and miR-363 are overexpressed in CD133<sup>+</sup> human GSCs in comparison to

CD133<sup>+</sup> normal neural stem cells. In GSCs, miR-582-5p and miR-363 target caspase-3, caspase-9, and Bim. Accordingly, the inhibition of the microRNAs restores the expression of targets and leads to decreased cell growth and increased apoptosis [108].

On the other hand, the expression of miR-34a is lower in glioma compared to normal brain tissue and in CD44<sup>+</sup>-enriched glioma cell lines compared with nontumorigenic neural stem cells. MiR-34a targets Rictor, a component of the mTORC2 complex. Thus, ectopic overexpression of miR-34a in GSCs downregulates Rictor, impairing AKT phosphorylation. Reduced activation of AKT, in turn, increases the levels of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) and the degradation of  $\beta$ -catenin. Consequently  $\beta$ -catenin target genes, such as c-Myc and Cyclin D1, are downregulated causing cell cycle arrest and apoptosis [109].

Recently, it has been reported that miR-29a expression is reduced in CD133<sup>+</sup> GSCs in comparison with that of CD133<sup>-</sup> nonstem cells. MiR-29a negatively regulates the expression of Quaking gene isoform 6 (QKI-6) by binding to its 3'-UTR. QKI-6 promotes the expression of WTAP [110], which in turn interacts with and inhibits the activity of the transcriptional repressor Wilms Tumor protein 1 (WT1) [111]. Thus, a lower level of miR-29a in GSCs releases the WT1-mediated repression of key prosurvival target genes, such as EGFR [112], and promotes the activation of the PI3K pathway [110]. Consequently, miR29a is a tumor suppressor in GMB and its loss allows GSCs to have continuous activation of pathways controlling both invasion and survival.

## 5. Conclusions

Induction of apoptosis in GBM has showed limited benefits to date. However, clarification of the precise apoptotic mechanism altered in each GBM molecular subtype can develop subtype-specific therapies in the future. Moreover, the development of new therapeutic strategies should consider the presence of GSCs within GBM tumors. GSCs and nonstem GBM cells show common characteristics but also substantial differences. For example, PI3K/AKT/mTOR pathway is deregulated in both subpopulations but the impact of stemness-related pathways or miRNAs in GSCs apoptosis is quite unique.

Thus, in order to increase overall survival of GMB patients, we still require basic and clinical research that focuses on the apoptosis signaling pathways. We foresee that such investigations will uncover new targets for therapeutic intervention.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Authors' Contributions

All authors participated in the writing of the manuscript and read and approved its final version.

## Acknowledgments

This work was supported by UNAM-PAPIIT IN228616 and CONACYT 221103 (Marco A. Velasco-Velázquez). Diana Casique-Aguirre is recipient of a Scholarship from the DGAPA-UNAM Postdoctoral Program. The authors thank Dr. Susana Castro-Obregon for the review and suggestions to this work and Mrs. Josefina Bolado, Head of the Scientific Paper Translation Department, from División de Investigación at Facultad de Medicina UNAM, for editing the English-language version of this manuscript.

## References

- [1] D. N. Louis, H. Ohgaki, and O. D. Wiestler, "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system," *Acta Neuropathologica*, vol. 114, no. 2, pp. 97–109, 2007.
- [2] I. A. Ho and W. S. Shim, "Contribution of the microenvironmental niche to glioblastoma heterogeneity," *BioMed Research International*, vol. 2017, pp. 1–13, 2017.
- [3] R. Stupp, M. E. Hegi, W. P. Mason et al., "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial," *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 5, pp. 459–466, 2009.
- [4] A. Sottoriva, I. Spiteri, S. G. M. Piccirillo et al., "Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 10, pp. 4009–4014, 2013.
- [5] H. S. Friedman, T. Kerby, and H. Calvert, "Temozolomide and treatment of malignant glioma," *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no. 7, pp. 2585–2597, 2000.
- [6] C. R. Miller and A. Perry, "Glioblastoma: morphologic and molecular genetic diversity," *Archives of Pathology & Laboratory Medicine. College of American Pathologists*, vol. 131, pp. 397–406, 2007.
- [7] H. Ohgaki, P. Dessen, B. Jourde et al., "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study," *Cancer Research*, vol. 64, no. 19, pp. 6892–6899, 2004.
- [8] J. L. Izquierdo-Garcia, P. Viswanath, P. Eriksson et al., "Metabolic reprogramming in mutant IDH1 glioma cells," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 2, Article ID e0118781, 2015.
- [9] "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature. Macmillan Publishers Limited. 2008; 455: 1061–8".
- [10] R. G. W. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom et al., "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1," *Cancer Cell*, vol. 17, pp. 98–110, 2010.
- [11] Q.-W. Fan and W. A. Weiss, "Inhibition of PI3K-Akt-mTOR signaling in glioblastoma by mTORC1/2 inhibitors," *Methods in Molecular Biology*, vol. 821, pp. 349–359, 2012.
- [12] "Phase II Study of BKM120 for subjects with recurrent glioblastoma," <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01339052>.
- [13] W. J. Wang, L. M. Long, N. Yang et al., "NVP-BEZ235, a novel dual PI3K/mTOR inhibitor, enhances the radiosensitivity of human glioma stem cells in vitro," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 34, no. 5, pp. 681–690, 2013.
- [14] E. Galanis, J. C. Buckner, M. J. Maurer et al., "Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme:



- a north central cancer treatment group study," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 23, pp. 5294–5304, 2005.
- [15] G. J. Kubicek, M. Werner-Wasik, M. Machtay et al., "Phase I trial using proteasome inhibitor bortezomib and concurrent temozolomide and radiotherapy for central nervous system malignancies," *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, vol. 74, no. 2, pp. 433–439, 2009.
- [16] I. Coupienne, S. Bontems, M. Dewaele et al., "NF-kappaB inhibition improves the sensitivity of human glioblastoma cells to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy," *Biochemical Pharmacology*, vol. 81, no. 5, pp. 606–616, 2011.
- [17] T. Fukushima, M. Kawaguchi, K. Yorita et al., "Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin, a small molecule inhibitor of nuclear factor-kB, on glioblastoma," *Neuro-Oncology*, vol. 14, no. 1, pp. 19–28, 2012.
- [18] K. E. Tagscherer, A. Fassl, B. Campos et al., "Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins," *Oncogene*, vol. 27, no. 52, pp. 6646–6656, 2008.
- [19] J. B. Fiveash, S. A. Chowdhary, D. Peereboom et al., "NABTT-0702: A phase II study of R-(-)-gossypol (AT-101) in recurrent glioblastoma multiforme (GBM)," *Journal of Clinical Oncology American Society of Clinical Oncology*, vol. 27, 2009.
- [20] G. Karpel-Massler, C. Shu, L. Chau et al., "Combined inhibition of Bcl-2/Bcl-xL and Usp9X/Bag3 overcomes apoptotic resistance in glioblastoma in vitro and in vivo," *Oncotarget*, vol. 6, pp. 14507–14521, 2015.
- [21] D. S. Ziegler, R. D. Wright, S. Kesari et al., "Resistance of human glioblastoma multiforme cells to growth factor inhibitors is overcome by blockade of inhibitor of apoptosis proteins," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 9, pp. 3109–3122, 2008.
- [22] L. Wagner, V. Marschall, S. Karl et al., "Smac mimetic sensitizes glioblastoma cells to Temozolomide-induced apoptosis in a RIP1- and NF-κB-dependent manner," *Oncogene*, vol. 32, no. 8, pp. 988–997, 2013.
- [23] S. Fulda, W. Wick, M. Weller, and K.-M. Debatin, "Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL-or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo," *Nature Medicine*, vol. 8, no. 8, pp. 808–815, 2002.
- [24] M. A. García, A. Ramírez, E. López-Ruiz et al., "Apoptosis as a therapeutic target in cancer and cancer stem cells: novel strategies and futures perspectives. Citeseer; 2012".
- [25] I. M. Ghobrial, T. E. Witzig, and A. A. Adjei, "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 55, no. 3, pp. 178–194, 2005.
- [26] L. C. Cantley, "The phosphoinositide 3-kinase pathway," *Science*, vol. 296, no. 5573, pp. 1655–1657, 2002.
- [27] T. F. Franke, C. P. Hornik, L. Segev, G. A. Shostak, and C. Sugimoto, "PI3K/Akt and apoptosis: size matters," *Oncogene*, vol. 22, no. 56, pp. 8983–8998, 2003.
- [28] S. R. Datta, A. Brunet, and M. E. Greenberg, "Cellular survival: a play in three acts," *Genes & Development*, vol. 13, no. 22, pp. 2905–2927, 1999.
- [29] H. Mao, D. G. Lebrun, J. Yang, V. F. Zhu, and M. Li, "Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets," *Cancer Investigation*, vol. 30, no. 1, pp. 48–56, 2012.
- [30] H. Wang, H. Wang, W. Zhang, H. J. Huang, W. S. L. Liao, and G. N. Fuller, "Analysis of the activation status of Akt, NFκB, and Stat3 in human diffuse gliomas," *Laboratory Investigation*, vol. 84, no. 8, pp. 941–951, 2004.
- [31] M.-E. Halatsch, U. Schmidt, A. Unterberg, and V. I. Vougioukas, "Uniform MDM2 overexpression in a panel of glioblastoma multiforme cell lines with divergent EGFR and p53 expression status," *Anticancer Reseach*, vol. 26, pp. 4191–4194, 2006.
- [32] B. Costa, S. Bendinelli, P. Gabelloni et al., "Human glioblastoma multiforme: p53 reactivation by a novel MDM2 inhibitor," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 8, Article ID e72281, 2013.
- [33] S. Daniele, B. Costa, E. Zappelli et al., "Combined inhibition of AKT/mTOR and MDM2 enhances Glioblastoma Multiforme cell apoptosis and differentiation of cancer stem cells," *Scientific Reports*, vol. 5, article 9956, 2015.
- [34] S. R. Datta, H. Dudek, T. Xu et al., "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery," *Cell*, vol. 91, no. 2, pp. 231–241, 1997.
- [35] Z. Duzgun, Z. Eroglu, and C. Biray Avci, "Role of mTOR in glioblastoma," *Gene*, vol. 575, no. 2, pp. 187–190, 2016.
- [36] L. Lisi, E. Laudati, P. Navarra, and C. Dello Russo, "The mTOR kinase inhibitors polarize glioma-activated microglia to express a M1 phenotype," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 11, no. 1, article no. 125, 2014.
- [37] R. Endersby and S. J. Baker, "PTEN signaling in brain: Neuro pathology and tumorigenesis," *Oncogene*, vol. 27, no. 41, pp. 5416–5430, 2008.
- [38] Y. Yang, N. Shao, G. Luo et al., "Mutations of PTEN gene in gliomas correlate to tumor differentiation and short-term survival rate," *Anticancer Reseach*, vol. 30, no. 3, pp. 981–985, 2010.
- [39] B. K. A. Rasheed, T. T. Stenzel, R. E. McLendon et al., "PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas," *Cancer Research*, vol. 57, no. 19, pp. 4187–4190, 1997.
- [40] Y. Yang, N. Shao, G. Luo, L. Li, P. Nilsson-Ehle, and N. Xu, "Relationship between PTEN gene expression and differentiation of human glioma," *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, vol. 66, no. 6, pp. 469–475, 2006.
- [41] D. Koul, "PTEN Signaling pathways in glioblastoma," *Cancer Biology & Therapy*, vol. 7, no. 9, pp. 1321–1325, 2008.
- [42] J.-J. Lee, B. C. Kim, M.-J. Park et al., "PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation," *Cell Death & Differentiation*, vol. 18, no. 4, pp. 666–677, 2011.
- [43] V. K. Hill, J. Kim, C. D. James, T. Waldman, and S. Deb, "Correction of PTEN mutations in glioblastoma cell lines via AAV-mediated gene editing," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 5, Article ID e0176683, 2017.
- [44] D. B. T. Cox, R. J. Platt, and F. Zhang, "Therapeutic genome editing: prospects and challenges," *Nature Medicine*, vol. 21, no. 2, pp. 121–131, 2015.
- [45] S. Chen, H. Sun, K. Miao, and C.-X. Deng, "CRISPR-Cas9: from genome editing to cancer research," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 12, no. 12, pp. 1427–1436, 2016.
- [46] N. D. Perkins, "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, pp. 49–62, 2007.
- [47] M. Hinze and C. Scheidereit, "The IκB kinase complex in NF-κB regulation and beyond," *EMBO Reports*, vol. 15, no. 1, pp. 46–61, 2014.
- [48] M. Chaves, T. Eissing, and F. Allgöwer, "Regulation of apoptosis via the NFκB pathway: modeling and analysis," in *Dynamics on*



- complex networks*, N. Ganguly, A. Deuchst, and A. Mukherjee, Eds., Modeling and Simulation in Science, Engineering and Technology, pp. 19–33, Boston, Mass, USA, 2009.
- [49] P. Korkolopoulou, G. Levidou, A. A. Saetta et al., “Expression of nuclear factor- $\kappa$ B in human astrocytomas: relation to pI $\kappa$ Ba, vascular endothelial growth factor, Cox-2, microvascular characteristics, and survival,” *Human Pathology*, vol. 39, no. 8, pp. 1143–1152, 2008.
- [50] G. P. Atkinson, S. E. Nozell, and E. N. Benveniste, “NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling in glioma: Targets for future therapies,” *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 10, no. 4, pp. 575–586, 2010.
- [51] D. Bai, L. Ueno, and P. K. Vogt, “Akt-mediated regulation of NF $\kappa$ B and the essentialness of NF $\kappa$ B for the oncogenicity of PI3K and Akt,” *International Journal of Cancer*, vol. 125, no. 12, pp. 2863–2870, 2009.
- [52] B. Kaltschmidt, C. Kaltschmidt, T. G. Hofmann, S. P. Hehner, W. Dröge, and M. L. Schmitz, “The pro- or anti-apoptotic function of NF- $\kappa$ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, no. 12, pp. 3828–3835, 2000.
- [53] C.-Y. Wang, M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and A. S. Baldwin Jr., “NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation,” *Science*, vol. 281, no. 5383, pp. 1680–1683, 1998.
- [54] S. Hayashi, M. Yamamoto, Y. Ueno et al., “Expression of nuclear factor- $\kappa$ B, tumor necrosis factor receptor type 1, and c-Myc in human astrocytomas,” *Neurologia Medico-Chirurgica*, vol. 41, no. 4, pp. 187–195, 2001.
- [55] “Bortezomib, temozolomide, and regional radiation therapy in treating patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma,” <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00998010?term=NCT00998010&rank=1>.
- [56] L. G. Tone, “Inhibition of NF- $\kappa$ B by dehydroxymethylpoxiquinomicin suppresses invasion and synergistically potentiates temozolomide and  $\gamma$ -radiation cytotoxicity in glioblastoma cells,” *Chemotherapy Research and Practice*, vol. 2013, Article ID 593020, 16 pages, 2013.
- [57] J. Marie Hardwick and L. Soane, “Multiple functions of BCL-2 family proteins,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 5, no. 2, 2013.
- [58] D. de Jong, F. A. Prins, D. Y. Mason, J. C. Reed, G. B. van Ommen, and P. M. Kluijn, “Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells,” *Cancer Research*, vol. 54, no. 1, pp. 256–260, 1994.
- [59] S. Cory, D. C. S. Huang, and J. M. Adams, “The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis,” *Oncogene*, vol. 22, no. 53, pp. 8590–8607, 2003.
- [60] S. Shimizu, M. Narita, and Y. Tsujimoto, “Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC,” *Nature*, vol. 399, no. 6735, pp. 483–487, 1999.
- [61] B. Qiu, Y. Wang, J. Tao, and Y. Wang, “Expression and correlation of Bcl-2 with pathological grades in human glioma stem cells,” *Oncology Reports*, vol. 28, no. 1, pp. 155–160, 2012.
- [62] H. Strik, M. Deininger, J. Streffer et al., “BCL-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy,” *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, vol. 67, no. 6, pp. 763–768, 1999.
- [63] Z. Jiang, X. Zheng, and K. M. Rich, “Down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 84, no. 2, pp. 273–281, 2003.
- [64] V. Voss, C. Senft, V. Lang et al., “The pan-Bcl-2 inhibitor (–)-gossypol triggers autophagic cell death in malignant glioma,” *Molecular Cancer Research*, vol. 8, no. 7, pp. 1002–1016, 2010.
- [65] T. Tencho, A. Zachariou, R. Wilson, M. Ditzel, and P. Meier, “IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms,” *Nature Cell Biology*, vol. 7, no. 1, pp. 70–77, 2005.
- [66] K. H. Khan, M. Blanco-Codecido, and L. R. Molife, “Cancer therapeutics: targeting the apoptotic pathway,” *Critical Review in Oncology/Hematology*, vol. 90, no. 3, pp. 200–219, 2014.
- [67] R. G. Weber, C. Sommer, F. K. Albert, M. Kiessling, and T. Cremer, “Clinically distinct subgroups of glioblastoma multiforme studied by comparative genomic hybridization,” *Laboratory Investigation*, vol. 74, no. 1, pp. 108–119, 1996.
- [68] W. Yang, M. Cooke, C. S. Duckett, X. Yang, and J. F. Dorsey, “Distinctive effects of the cellular inhibitor of apoptosis protein c-IAP2 through stabilization by XIAP in glioblastoma multiforme cells,” *Cell Cycle*, vol. 13, no. 6, pp. 992–1005, 2014.
- [69] B. Wagenknecht, T. Glaser, U. Naumann et al., “Expression and biological activity of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in human malignant glioma,” *Cell Death & Differentiation*, vol. 6, no. 4, pp. 370–376, 1999.
- [70] P. L. C. Lopez, E. C. Filippi-Chiela, A. O. Silva et al., “Sensitization of glioma cells by X-linked inhibitor of apoptosis protein knockdown,” *Oncology*, vol. 83, no. 2, pp. 75–82, 2012.
- [71] H.-N. Zhen, L.-W. Li, W. Zhang et al., “Short hairpin RNA targeting survivin inhibits growth and angiogenesis of glioma U251 cells,” *International Journal of Oncology*, vol. 31, pp. 1111–1118, 1992.
- [72] T. Sun, N. M. Warrington, J. Luo et al., “Sexually dimorphic RB inactivation underlies mesenchymal glioblastoma prevalence in males,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 124, no. 9, pp. 4123–4133, 2014.
- [73] A. P. Patel, I. Tirosh, J. J. Trombetta et al., “Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma,” *Science*, vol. 344, no. 6190, pp. 1396–1401, 2014.
- [74] M. Greaves and C. C. Maley, “Clonal evolution in cancer,” *Nature*, vol. 481, no. 7381, pp. 306–313, 2012.
- [75] J. N. Rich, “Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity,” *Medicine*, vol. 95, no. 1, pp. S2–S7, 2016.
- [76] A. R. Safa, M. R. Saadatzaheh, A. A. Cohen-Gadol, K. E. Pollok, and K. Bijangi-Vishehsaraei, “Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs,” *Genes & Diseases*, vol. 2, no. 2, pp. 152–163, 2015.
- [77] A. U. Ahmed, B. Auffinger, and M. S. Lesniak, “Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies,” *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 13, no. 5, pp. 545–555, 2013.
- [78] D. V. Brown, G. Filiz, P. M. Daniel et al., “Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intratumor heterogeneity,” *PLoS ONE*, vol. 12, no. 2, Article ID e0172791, 2017.
- [79] B. D. Liebelt, T. Shingu, X. Zhou, J. Ren, S. A. Shin, and J. Hu, “Glioma stem cells: signaling, microenvironment, and therapy,” *Stem Cells International*, vol. 2016, Article ID 7849890, 10 pages, 2016.

- [80] P. Brescia, B. Ortensi, L. Fornasari, D. Levi, G. Broggi, and G. Pelicci, "CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance," *Stem Cells*, vol. 31, no. 5, pp. 857–869, 2013.
- [81] M. Jhanwar-Uniyal, M. Labagnara, M. Friedman, A. Kwasnicki, and R. Murali, "Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets," *Cancers*, vol. 7, no. 2, pp. 538–555, 2015.
- [82] A. Toren, B. Bielora, J. Jacob-Hirsch et al., "CD133-positive hematopoietic stem cell "sternness" genes contain many genes mutated or abnormally expressed in leukemia," *Stem Cells*, vol. 23, no. 8, pp. 1142–1153, 2005.
- [83] W. Hilbe, S. Dirnhofer, F. Oberwasserlechner et al., "CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 57, no. 9, pp. 965–969, 2004.
- [84] I. Shibahara, Y. Sonoda, R. Saito et al., "The expression status of CD133 is associated with the pattern and timing of primary glioblastoma recurrence," *Neuro-Oncology*, vol. 15, no. 9, pp. 1151–1159, 2013.
- [85] H. Ponta, L. Sherman, and P. A. Herrlich, "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4, no. 1, pp. 33–45, 2003.
- [86] E. Olsson, G. Honeth, P.-O. Bendahl et al., "CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers," *BMC Cancer*, vol. 11, article 418, 2011.
- [87] L. Du, H. Wang, L. He et al., "CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 21, pp. 6751–6760, 2008.
- [88] Z. Gadhroum, M.-P. Leibovitch, J. Oi et al., "CD44: a new means to inhibit acute myeloid leukemia cell proliferation via p27Kip1," *Blood*, vol. 103, no. 3, pp. 1059–1068, 2004.
- [89] A. Pietras, A. M. Katz, E. J. Ekström et al., "Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth," *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 357–369, 2014.
- [90] K. C. Wei, C. Y. Huang, P. Y. Chen et al., "Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme," *Anticancer Research*, vol. 30, pp. 253–259, 2010.
- [91] P. Mao, K. Joshi, J. Li et al., "Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 21, pp. 8644–8649, 2013.
- [92] D. V. Brown, P. M. Daniel, G. M. D'Abaco et al., "Coexpression analysis of CD133 and CD44 identifies Proneural and Mesenchymal subtypes of glioblastoma multiforme," *Oncotarget*, vol. 6, no. 8, pp. 6267–6280, 2015.
- [93] A. Dubrovska, J. Elliott, R. J. Salamone et al., "Combination therapy targeting both tumor-initiating and differentiated cell populations in prostate carcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 23, pp. 5692–5702, 2010.
- [94] Y. Hu, R. Guo, J. Wei et al., "Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on overcoming drug resistance and eliminating cancer stem cells in human breast cancer cells," *Cell Death & Disease*, vol. 6, no. 12, article no e2020, 2015.
- [95] M. M. Sherry, A. Reeves, J. K. Wu, and B. H. Cochran, "STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells," *Stem Cells*, vol. 27, no. 10, pp. 2383–2392, 2009.
- [96] L. G-H, H. Wei, L. S-Q, H. Ji, and D-L. Wang, "Knockdown of STAT3 expression by RNAi suppresses growth and induces apoptosis and differentiation in glioblastoma stem cells," *International Journal of Oncology*, vol. 37, pp. 103–110, 2010.
- [97] T. Ashizawa, H. Miyata, A. Iizuka et al., "Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma," *International Journal of Oncology*, vol. 43, no. 1, pp. 219–227, 2013.
- [98] N. Wu, J. Liu, X. Zhao et al., "Cardamonin induces apoptosis by suppressing STAT3 signaling pathway in glioblastoma stem cells," *Tumor Biology*, vol. 36, no. 12, pp. 9667–9676, 2015.
- [99] M. M. Lino, A. Merlo, and J.-L. Boulay, "Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target?" *BMC Medicine*, vol. 8, article no. 72, 2010.
- [100] X. Fan, L. Khaki, T. S. Zhu et al., "NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts," *Stem Cells*, vol. 28, no. 1, pp. 5–16, 2010.
- [101] J. Kim, J. J. Lee, J. Kim, D. Gardner, and P. A. Beachy, "Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 30, pp. 13432–13437, 2010.
- [102] E. M. Beauchamp, L. Ringer, G. Bulut et al., "Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, no. 1, pp. 148–160, 2011.
- [103] D. Ding, K. S. Lim, and C. G. Eberhart, "Arsenic trioxide inhibits Hedgehog, Notch and stem cell properties in glioblastoma neurospheres," *Acta Neuropathologica Communications*, vol. 2, no. 1, article no. 31, 2014.
- [104] L. Shi, S. Zhang, K. Feng et al., "MicroRNA-125b-2 confers human glioblastoma stem cells resistance to temozolomide through the mitochondrial pathway of apoptosis," *International Journal of Oncology*, vol. 40, no. 1, pp. 119–129, 2012.
- [105] J. Chen, X. Fu, Y. Wan, Z. Wang, D. Jiang, and L. Shi, "miR-125b inhibitor enhance the chemosensitivity of glioblastoma stem cells to temozolomide by targeting Bak1," *Tumor Biology*, vol. 35, no. 7, pp. 6293–6302, 2014.
- [106] M. Zhou, Z. Liu, Y. Zhao et al., "MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 28, pp. 21496–21507, 2010.
- [107] C. Shang, Y. Guo, Y. Hong, Y. Liu, and Y. Xue, "MiR-21 up-regulation mediates glioblastoma cancer stem cells apoptosis and proliferation by targeting FASLG," *Molecular Biology Reports*, vol. 42, no. 3, pp. 721–727, 2015.
- [108] D. H. Floyd, Y. Zhang, B. K. Dey et al., "Novel anti-apoptotic microRNAs 582-5p and 363 promote human glioblastoma stem cell survival via direct inhibition of caspase 3, caspase 9, and Bim," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, Article ID e96239, 2014.
- [109] S. S. Rathod, S. B. Rani, M. Khan, D. Muzumdar, and A. Shiras, "Tumor suppressive miRNA-34a suppresses cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signaling pathways," *FEBS Open Bio*, vol. 4, pp. 485–495, 2014.
- [110] Z. Xi, P. Wang, Y. Xue et al., "Overexpression of miR-29a reduces the oncogenic properties of glioblastoma stem cells by downregulating Quaking gene isoform 6," *Oncotarget*, vol. 8, pp. 24949–24963, 2017.

- [111] N. A. Little, N. D. Hastie, and R. C. Davies, "Identification of WTAP, a novel Wilms' tumour 1-associating protein," *Human Molecular Genetics*, vol. 9, no. 15, pp. 2231–2239, 2000.
- [112] C. Englert, X. Hou, S. Maheswaran et al., "WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis," *EMBO Journal*, vol. 14, no. 19, pp. 4662–4675, 1995.

## Review Article

# Autotaxin-Lysophosphatidic Acid: From Inflammation to Cancer Development

**Silvia Anahi Valdés-Rives and Aliesha González-Arenas**

*Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico*

Correspondence should be addressed to Aliesha González-Arenas; [alieshagonzalez@gmail.com](mailto:alieshagonzalez@gmail.com)

Received 8 September 2017; Accepted 22 November 2017; Published 21 December 2017

Academic Editor: Santiago Partida-Sanchez

Copyright © 2017 Silvia Anahi Valdés-Rives and Aliesha González-Arenas. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lysophosphatidic acid (LPA) is a ubiquitous lysophospholipid and one of the main membrane-derived lipid signaling molecules. LPA acts as an autocrine/paracrine messenger through at least six G protein-coupled receptors (GPCRs), known as LPA<sub>1-6</sub>, to induce various cellular processes including wound healing, differentiation, proliferation, migration, and survival. LPA receptors and autotaxin (ATX), a secreted phosphodiesterase that produces this phospholipid, are overexpressed in many cancers and impact several features of the disease, including cancer-related inflammation, development, and progression. Many ongoing studies aim to understand ATX-LPA axis signaling in cancer and its potential as a therapeutic target. In this review, we discuss the evidence linking LPA signaling to cancer-related inflammation and its impact on cancer progression.

## 1. Introduction

Lysophosphatidic acid (LPA) consists of an acyl chain at the sn-1 (or sn-2) position of a glycerol backbone and a phosphate head group. It is the smallest (molecular weight: 430–480 Da) and the simplest bioactive glycerophospholipid derived from membrane phospholipids [1, 2]. Nevertheless, it is involved in a wide range of activities, from phospholipid synthesis to a number of physiological responses as a lipid mediator [3]. LPA activates at least six G-coupled protein receptors (LPA<sub>1-6</sub>) stimulating different signaling pathways through heterotrimeric G proteins such as G<sub>i/o</sub>, G<sub>12/13</sub>, G<sub>q/11</sub>, and G<sub>s</sub>. The outcome of LPA signaling is dependent on cellular context and impacts on biological processes such as wound healing, differentiation, neurogenesis, and survival, to name a few [4]. Due to its small structure, LPA is water soluble and concentrations > 5 μM have been reported in serum; concentrations < 1 μM have been found in other biofluids such as plasma, saliva, follicular fluid, cerebrospinal fluid, and malignant effusions [5–7]. It is known that ATX-LPA signaling increases during wound healing, and both are produced and detected in blister

fluids, where they mediate platelet aggregation and skin reepithelization [8]. During this process, ATX-LPA signaling induces production of proinflammatory cytokines. Therefore, aberrant activation of this axis promotes an inappropriate immune response that leads to a proinflammatory state in pathologies like cancer [9].

## 2. Lysophosphatidic Acid Synthesis and Metabolism

LPA is a membrane-derived lysophospholipid from phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), and phosphatidylethanolamine (PE) [7]. Therefore, several species can be found, differing only in the length and saturation of the acyl or alkyl fatty acid chain [7, 10]. The most abundant plasma LPA species are 18:2 > 18:1 ≥ 18:0 > 16:0 > 20:4 with an acyl group [11, 12]. Although acyl-LPA 18:2 is the most numerous species, acyl-LPA 18:1 is the most frequently used in current research [13].

There are two major pathways for LPA production (Figure 1(a)). The main pathway is the cleavage of membrane phospholipids into lysophospholipids by the removal of a

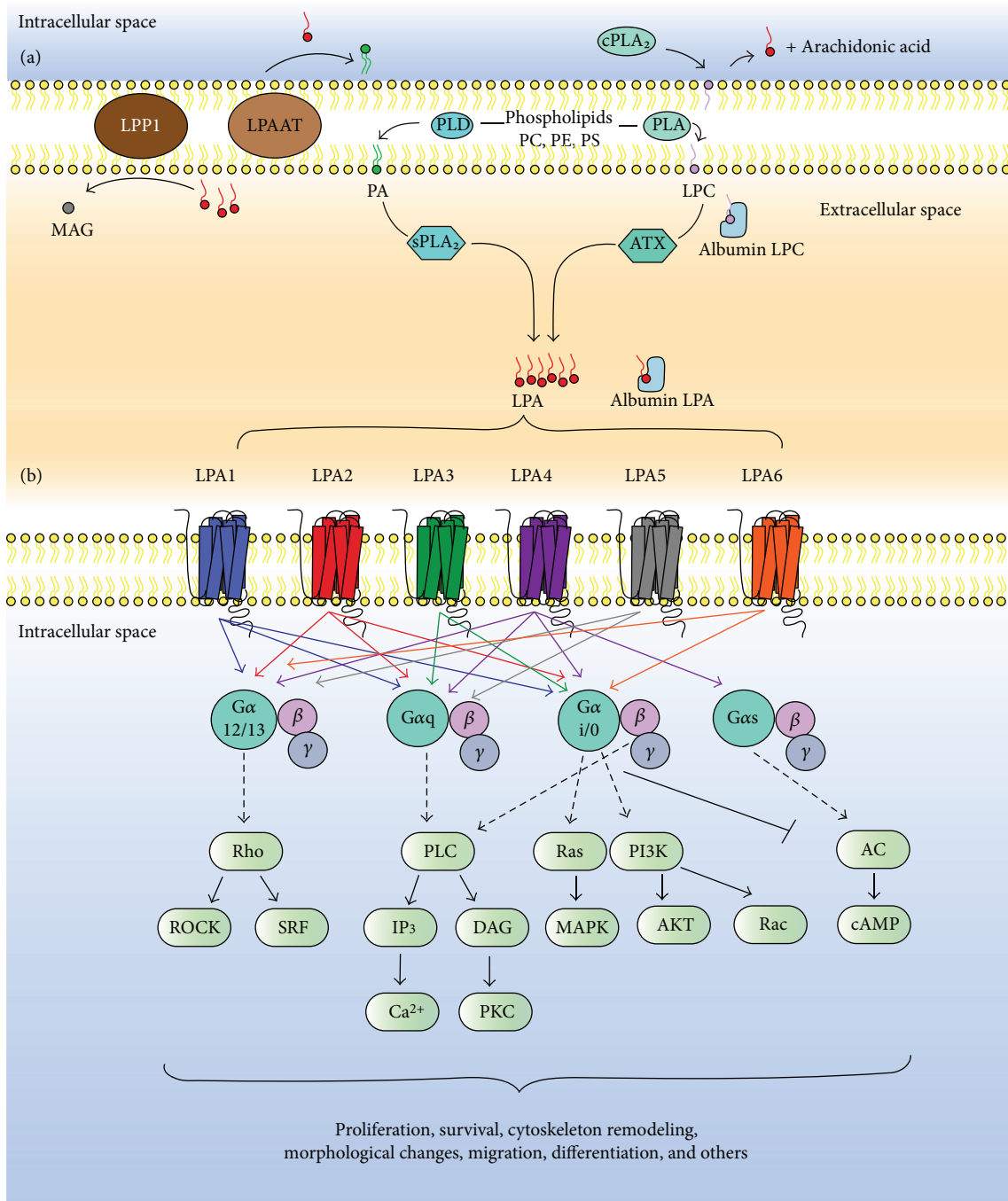


FIGURE 1: LPA production, metabolism, and signaling. (a) LPA species are derived from membrane phospholipids. PLA removes a fatty acid chain from PC, PE, or PS converting them into lysophospholipids. Afterwards, ATX removes the head group from LPC < LPE < LPS and produces LPA. LPC can derive from cell membrane or circulating LPC bound to albumin. LPA can also be produced intracellularly by cPLA<sub>2</sub> from LPC producing LPA and arachidonic acid. On the other hand, PLD can remove the head group from membrane phospholipids and produce PA. Then, sPLA<sub>2</sub> removes a fatty acid chain producing LPA. Two enzymes metabolize LPA, LPP1 in the outer leaflet of the membrane hydrolyzes LPA into MAG, and LPAAT transfers an acyl chain to LPA in the inner leaflet of the membrane producing PA. (b) LPA signals through at least six GPCRS (LPA<sub>1-6</sub>) that couple to different Gα proteins to elicit activation of Rho, PLC, Ras, PI3K, and adenylyl cyclase (AC) and mediate diverse processes that are cell and context dependent. This figure is reproduced from Blaho and Hla [29] (under the Creative Commons Attribution License/public domain).

fatty acid chain by phospholipase A (PLA1 or PLA2). Subsequently, ATX cleaves the head group (choline, ethanolamine, or serine) on the lysophospholipids and turns them into LPA [14]. ATX (also known as ENPP2) is a 125 kDa-secreted

enzyme from the family of ectonucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (reviewed by [15]) located on Chr8q24 [16]. Among the seven members of this family, ATX is a unique enzyme that shows lysophospholipase D activity



[17, 18]. This enzyme produces most of the extracellular LPA. *Enpp2*<sup>+/-</sup> mice and inhibitors targeting ATX decrease LPA plasma concentration by >50% [19–22]. ATX generates LPA from plasma membrane phospholipids and from circulating lysophosphatidylcholine (LPC) bound to albumin [23]. ATX is essential for development since *Enpp2*<sup>-/-</sup> is lethal at embryonic day 9.5–10.5, with marked vascular and neural tube defects [20, 21]. ATX is also important in adipogenesis since it is upregulated during preadipocyte differentiation to adipocytes and secreted into circulation by the adipose tissue [24].

A second, less common, route of LPA production is the cleavage of phospholipids into phosphatidic acid (PA) by phospholipase D (PLD) at the cell surface. PA is then hydrolyzed in the outer leaflet of the plasma membrane by secreted PLA2 (sPLA2) releasing LPA to the microenvironment [15].

LPA turns over with a half-life of about 3 min in the circulation [25]. Therefore, its main effects are autocrine and paracrine when bound to albumin [10]. LPA turnover is regulated by ATX activity and LPA degradation by lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) which hydrolyze LPA into monoacylglycerol (MAG) in the outer leaflet of the cell membrane [26, 27] and LPA-acyltransferase (LPAAT), which transfer an acyl chain to LPA converting it into PA in the inner leaflet of the cell membrane [10]. Recently, a negative feedback loop has been described for the ATX-LPA axis [28]; in this mechanism, LPA signaling through its receptor LPA<sub>1/3</sub> induces downregulation of ATX mRNA. Similarly, low levels of circulating LPA increase ATX mRNA, particularly in the adipose tissue of female Balb/c mice [28].

### 3. LPA Receptors

As previously mentioned, LPA signals through at least six G protein-coupled receptors LPA<sub>1-6</sub> (Figure 1(b)): gene names are *LPAR1-LPAR6* (human) and *Lpar1-Lpar6* (mouse) [30, 31]. All LPA receptors are rhodopsin-like, with seven transmembrane domain receptors that range from 39 to 42 kDa and differ in their tissue distribution and downstream effectors [7]. According to their homology, there are two LPA receptor families: the endothelial differentiation gene (EDG) family and the non-EDG family [32, 33]. In addition to homology, they differ in their activation by different LPA species (Figure 2). Although acyl-LPA 18:2 is the most abundant species, the EDG family is more potently stimulated by acyl-LPA (LPA<sub>1/2</sub>), and LPA<sub>3</sub> preferentially binds to 2-acyl-LPA. The non-EDG family member LPA<sub>5</sub> is more potently stimulated by alkyl-LPA and LPA<sub>6</sub> by 2-acyl-LPA, specifically [33]. These differences show that a wide range of physiological effects is modulated through these receptors and LPA species in a context and cell type-dependent manner.

**3.1. Endothelial Differentiation Gene Family.** In 1996, LPA<sub>1</sub> was the first receptor to be identified and it is the best studied to date. Hecht et al. [35] described a neuroblast cell line overexpressing the ventricular zone gene-1 receptor (Vgz-1), to which LPA binds specifically to induce cell rounding and activation of G<sub>αi</sub>. Also known as EDG-2, Vgz-1 was later

renamed LPA<sub>1</sub>. Right after its discovery, two other orphan receptors, LPA<sub>2</sub> and LPA<sub>3</sub>, were identified based on their homology to LPA<sub>1</sub> [36–38].

LPA<sub>1</sub> is a 41 kDa protein of 364 amino acids located in Chr9q31.3 and consists of at least 5 exons [30, 31]. This receptor couples with and activates 3 types of G protein, G<sub>αi/0</sub>, G<sub>αq/11</sub>, and G<sub>α12/13</sub>, which initiate downstream signaling through PI3K/AKT, Rho, MAPK, and PLC (Figure 1(b)). These pathways are involved in several cellular processes, including cell proliferation and survival, adhesion, migration, AC inhibition, and Ca<sup>2+</sup> mobilization [31, 39]. It is widely expressed in most tissues such as brain, uterus, testis, lung, small intestine, heart, stomach, kidney, spleen, thymus, and skeletal muscle at different developmental stages with a variable expression, particularly in the central nervous system (CNS) [36, 39], where, during development, LPA<sub>1</sub> is found in the ventricular zone, superficial marginal zone, and meninges. After birth, LPA<sub>1</sub> expression is reduced in the aforementioned areas and continues in oligodendrocytes, particularly during myelination, as well as in astrocytes, where it elicits a wide range of processes (reviewed by [40]). Targeted deletion of *Lpar1*<sup>-/-</sup> showed a 50% of perinatal lethality related to an impaired suckling behavior probably due to defective olfaction. Surviving mice showed craniofacial malformations and reduced body size [41]. Additionally, LPA<sub>1</sub> has been closely related to the induction of neuropathic pain due to nerve injury via LPA<sub>1</sub>/RhoA/rock-mediated demyelination with a subsequent loss of the structural and functional integrity of neurons, as discussed elsewhere [42].

LPA<sub>2</sub> receptor (EDG-4) has a ~50–60% homology to LPA<sub>1</sub>, with an estimated mass of 39 kDa and 348 amino acids [36]. Located on Chr19p12, it consists of 3 exons in both humans and mice [30, 39]. LPA<sub>2</sub> couples to the same G proteins as LPA<sub>1</sub> (Figure 1(b)): G<sub>αi/0</sub>, G<sub>αq/11</sub>, and G<sub>α12/13</sub> [36, 39]; therefore, it can similarly activate downstream signaling but, unlike LPA<sub>1</sub>, can also promote migration through the focal adhesion molecule TRIP6 [43, 44]. LPA<sub>2</sub> activation is associated with survival and migration. Compared with LPA<sub>1</sub>, its expression is more diffuse during development, more restricted in adults, and with high expression in leukocytes and testis in humans and in kidney, uterus, and testis in mice [36, 39, 45]. LPA<sub>2</sub> knockout mice are mostly normal, suggesting a possible functional redundancy in relation to LPA<sub>1</sub>. A *Lpar1*<sup>-/-</sup> and *Lpar2*<sup>-/-</sup> model has also been evaluated [46]. In this model, *Lpar1*<sup>-/-</sup> phenotype predominated with 50% perinatal lethality, cranial malformations, and reduced body size, but it also exhibited frontal hematomas [46].

LPA<sub>3</sub> receptor (EDG-7) contains 3 exons, has 353 amino acids, and a 40 kDa-estimated mass [37, 38]. This receptor has 52% and 48% homology with LPA<sub>1</sub> and LPA<sub>2</sub>, respectively, and is located on Chr1p22.3-p31.1 [30, 38, 39]. LPA<sub>3</sub> couples to G proteins, G<sub>αi/0</sub> and G<sub>α11/q</sub> (Figure 1(b)), and therefore mediates downstream activation of MAPK, PLC, and inactivation of AC [47]. It has been reported that this receptor is more potently activated by 2-acyl-LPA with unsaturated fatty acids [2]. In humans, LPA<sub>3</sub> is expressed in heart, lung, pancreas, prostate, testis, ovaries, and brain [37]. In mice, it is expressed in testis, kidney, lung,

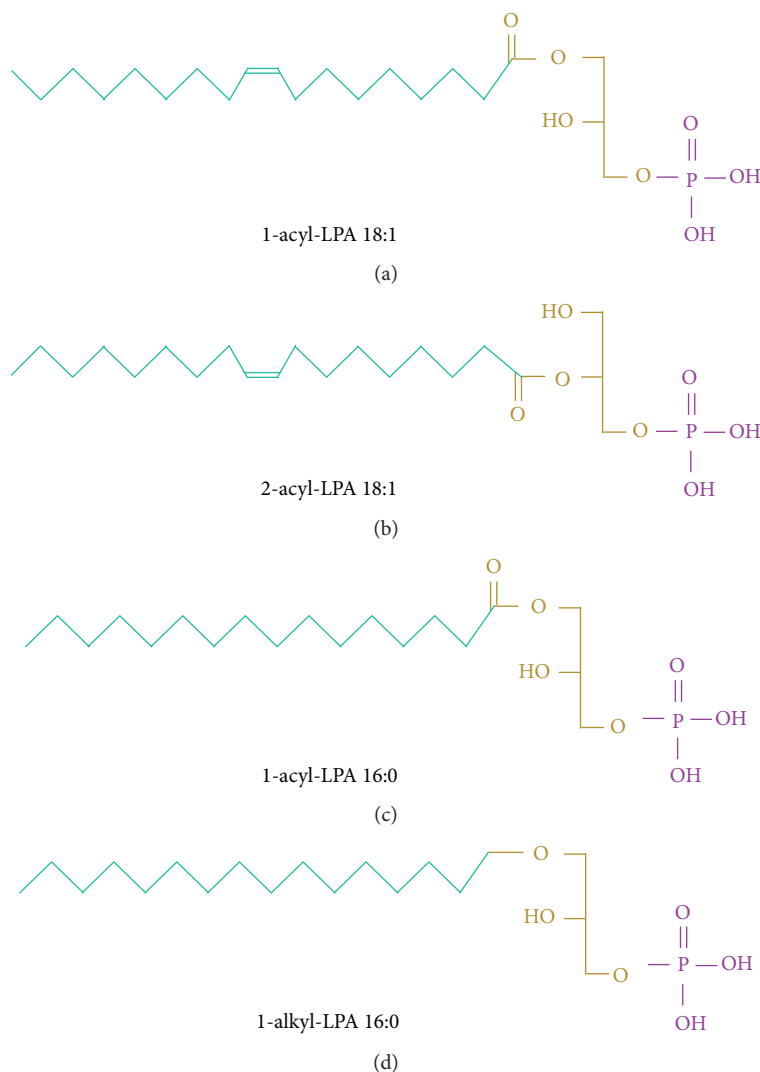


FIGURE 2: LPA species. LPA is derived from phospholipids with different lengths and saturations. (a) 18 carbon LPA species with an acyl group in sn-1 position and one saturation are the most potent activator of the LPA<sub>1</sub> and LPA<sub>2</sub> receptors [7]. (b) Acyl LPA with 18 carbons, one saturation, and the fatty acid chain in sn-2 position are the most potent activator of LPA<sub>3</sub> and LPA<sub>6</sub> [2, 34]. (c) An alkyl-LPA species with 16 carbons and no saturation are the most potent activator of LPA<sub>5</sub> receptor [33].

intestine, and moderately, small intestine [39]. Functional deletion of LPA<sub>3</sub> in female mice showed delayed and defective embryo implantation through the downregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and reduced levels of prostaglandins, which are essential for this process [48]. In deficient LPA<sub>1-3</sub> male mice, an independent of testosterone signaling reduced sperm count and mating activity was found [49]. This evidence suggests the role of LPA<sub>3</sub> in reproductive functions.

**3.2. Nonendothelial Differentiation Gene Family.** In 2003, the first LPA receptors structurally distant from the EDG receptor family were described [50]. The orphan GPCR P2Y9/GPR23 has only 20–24% homology with LPA<sub>1-3</sub>, but it specifically binds to LPA. Its signaling promotes an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and adenylyl cyclase activity in “LPA receptor-null” cells exogenously expressing P2Y9 [50]. Soon, LPA<sub>5</sub> and LPA<sub>6</sub> description followed [51–55].

LPA<sub>4</sub> (P2Y9/GPR23) is encoded by 1 exon containing 370 amino acids with a 42 kDa mass [30, 50, 56]. Located on ChrXq21.1, it was the first to be described that couples to four G proteins: G<sub>α<sub>10</sub></sub>, G<sub>α<sub>11/q</sub></sub>, G<sub>α<sub>12/13</sub></sub>, and G<sub>α<sub>s</sub></sub> (Figure 1(b)) [57]. LPA<sub>4</sub> signaling promotes Rho-mediated neurite retraction and stresses fiber formation, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and regulation of cAMP concentration [57]. In humans, LPA<sub>4</sub> expression is high in ovaries, moderated in thymus and pancreas, and low in brain, heart, small intestine, testis, prostate, colon, and spleen [13, 50]. In mice, it is expressed in heart, ovaries, thymus, skin, and developing brain [57, 58]. *Lpar4*<sup>-/-</sup> mice showed no apparent abnormality, but there was a 30% lethality, probably due to blood vessel defects during embryogenesis [58, 59].

LPA<sub>5</sub> (GPR92) is a 41 kDa protein consisting of 372 amino acids coded in an intronless open reading frame [51, 52]. This receptor is located on Chr12p13.31 and has a 35% homology with LPA<sub>4</sub> [51, 52]. LPA<sub>5</sub> couples

to G proteins,  $G\alpha_{11/q}$  and  $G\alpha_{12/13}$  (Figure 1(b)), by which  $Ca^{2+}$  mobilization, inositol phosphate production, neurite retraction, and stress fiber formation are mediated [51, 52]. It has been reported that LPA<sub>5</sub> preferentially binds to alkyl-LPA (16:0), rather than acyl-LPA (18:1) [33]. LPA<sub>5</sub> is found in heart, placenta, spleen, brain, lung, and gut in humans [51]. It is also highly expressed in the lymphocyte compartment of the gastrointestinal tract and platelets [51, 60]. In mice, it is found in the brain, heart, kidney, liver, lung, muscle, skin, spleen, stomach, small intestine, testis, and thymus [52]. *Lpar5*<sup>-/-</sup> mice have no apparent phenotypic defects but show a reduced pain sensitivity, faster recovery from inflammation, and reduction in social exploration [61, 62]. They also exhibit nocturnal hyperactivity and anxiety compared to *Lpar5*<sup>+/+</sup> mice [61]. Null mice were also protected from developing neuropathic pain by a mechanism different from LPA<sub>1</sub> [62].

LPA<sub>6</sub> (P2Y5) is the most recently identified LPA receptor and the last accepted by the IUPHAR Nomenclature Committee in 2010 [31, 53, 54]. It is a 344-amino acid protein with an estimated mass of 39 kDa [30]. Regarding homology with LPA<sub>4</sub> [50], it is the closest receptor and is located on Chr13q14 [30, 55]. LPA<sub>6</sub> couples to  $G\alpha_{i/0}$  and  $G\alpha_{12/13}$  (Figure 1(b)), by which a decrease in cAMP, Rho-dependent morphological changes,  $Ca^{2+}$  mobilization, and MAPK activation are mediated [53, 54]. It has also been reported that LPA<sub>6</sub> is preferentially activated by 2-acyl-LPA, rather than 1-acyl-LPA [53]. This receptor has been found in rats' brain, heart, lung, kidney, pancreas, liver, stomach, and small and large intestine [54]. In humans, it has been related to hair growth since a mutation of *LPAR6* was found in patients with hypotrichosis simplex, an alopecia-causing disorder [55].

**3.3. EDG and Non-EDG Receptor Effects in Cancer.** Extensive evidence demonstrate that the receptors from the EDG family promote tumor progression in a wide variety of cancers by enhancing proliferation, survival, migration, and invasion [7]. Conversely, evidence shows that members from the non-EDG family have the opposite effect.

Reconstitution of *Lpar4* in mouse embryonic fibroblasts derived from *Lpar4*<sup>-/-</sup> mice reduces cell motility due to an LPA-induced decrease in Rac activation [58]. Also, LPA<sub>4</sub> expression in colon cancer cells (DLD1 and HTC116) suppresses cell migration and invasion compared to null-LPA<sub>4</sub> cells [58, 63]. Similarly, in rat sarcoma cells, overexpression of *Lpar5* significantly reduced motility and suppressed MMP2 activation. On the other hand, *Lpar5* knockdown induced the opposite effect [64]. In B16F10 mice melanoma cells, LPA<sub>5</sub> reduced migration through a cAMP/PKA-dependent pathway and induced chemorepulsion instead of attraction via LPA [65]. Additionally, in colon cancer cells, lines DLD1, and HCT116, LPA<sub>6</sub> expression significantly reduced cell growth and motility [63].

In rat lung adenocarcinoma, loss of LPA<sub>3</sub> due to methylation of the promoter enhances tumor progression by increasing invasion, suggesting a protective role of LPA<sub>3</sub> in this neoplasia [66]. By contrast, in human fibrosarcoma, LPA<sub>4</sub> was shown to increase cAMP levels and subsequently

activate Rac1 to induce invadopodia, a process directly correlated with invasion and metastasis [67]. Additionally, in rat lung carcinoma, LPA<sub>5</sub> is highly expressed due to unmethylation of the promoter, and cells expressing only LPA<sub>5</sub> showed enhanced proliferation, migration, and invasion [68]. Moreover, hepatocellular carcinoma (HCC) cells overexpressing LPA<sub>6</sub> sustain an increase in tumor growth, migration, and invasion. Moreover, LPA<sub>6</sub> expression was associated with a worse clinical outcome in these patients [69].

In brief, LPA receptors can have homologous and antagonistic effects depending on the tumor. Therefore, they should be studied in a cancer-specific context to better evaluate their role in tumor development and progression, as well as their potential therapeutic value.

#### 4. Autotaxin-LPA Axis in Cancer-Related Inflammation

Since the 19th century, an association between inflammation and cancer was proposed [70]. Inflammatory components are often present in most types of cancer, such as white blood cells, tumor-associated macrophages, and proinflammatory ILs [70, 71]. In several cases, inflammation can predispose individuals to certain types of cancer, including cervical, gastric, colon, hepatic, breast, lung, ovarian, prostate, and thyroid cancer [72–81]. There is also evidence that the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs can reduce the risk of developing colon and breast cancer and reduce the related mortality, as discussed elsewhere [82, 83].

In general, two mechanisms have been proposed to link inflammation and cancer. In the intrinsic pathway, genetic events promoting development initiate the expression of inflammation-related circuits leading to an inflammatory microenvironment. Conversely, in the extrinsic pathway, inflammatory conditions facilitate cancer development. In both cases, a cancer-related inflammation (CRI) is induced and it is proposed as a tumor-enabling characteristic and the seventh hallmark of cancer [71]. CRI enables unlimited replicative potential, independence of growth factors, resistance to growth inhibition, escape of cell death, enhanced angiogenesis, tumor extravasation, and metastasis [84]. Therefore, understanding key components of inflammation is important for better therapeutics in cancer and other diseases.

The ATX-LPA axis is involved in wound healing response, where it induces platelet aggregation, lymphocyte homing, cytokine production, keratinocyte migration, proliferation, and differentiation under physiological conditions [85]. When acute inflammation becomes chronic in unpaired homeostasis, ATX-LPA signaling induces an augmented cytokine production and lymphocyte infiltration, aggravating the inflammation in conditions such as asthma, pulmonary fibrosis, and rheumatoid arthritis, to name a few [86]. In a cancer context, it also promotes cell survival, proliferation, migration, invasion, and angiogenesis, enhancing its progression in a state similar to a “wound that never heals” [84, 87].

**4.1. Lung.** ATX-LPA axis has been studied in airway inflammation where protein kinase C  $\delta$  (PKC $\delta$ ) mediates



LPA-induced NF $\kappa$ B transcription and IL-8 secretion in human bronchial epithelial cells (HBEPs) [88]; LPA activation of PKC $\delta$ /NF $\kappa$ B and IL-8 production were inhibited by rottlerin (a nonspecific PKC $\delta$  inhibitor) and by an overexpression of dominant-negative PKC $\delta$ . *In vivo* LPA administration in mice leads to increased levels of a murine homolog of IL-8 and of neutrophils in the bronchoalveolar fluid [88]. Moreover, LPA signaling induces EGFR transactivation via Lyn kinase, from Src kinase family, to promote matrix metalloproteinase (MMP) secretion as well as IL-8 [89]. Additionally, activation of the signal transducers and activators of the transcription 3 (STAT3) in alveolar epithelial cells during host defense promotes inflammation and spontaneous lung cancer [90]. Through these signaling cascades, a chronic inflammation is pursued and could lead to malignant transformation. In lung cancer, inhibition of ATX-LPA axis reduced cell migration, invasion, and vascularization in a 3-D lung cancer xenograft model [91]. There is evidence that ATX is highly expressed in poorer differentiated lung carcinomas, particularly in tumor-adjacent B lymphocytes [92] and that LPA<sub>5</sub> may play a key role in the progression of these carcinomas [68], while LPA<sub>3</sub> could have a protective role [66]. Furthermore, LPA and other phospholipid levels are upregulated as a side effect of chemo- and radiotherapy, inducing a prometastatic microenvironment in lung cancer [93]. Interestingly, LPA did not induce proliferation nor survival in these cells, but rather an increase in motility, adhesion to bone marrow stroma, and enhanced secretion of ATP, another potent chemokinetic factor, from stroma cells [93]. Together, evidence suggests a significant role of ATX-LPA axis in inflammation and lung cancer through the increase of proinflammatory cytokines.

**4.2. Breast.** In breast cancer (BCa), the ATX-LPA axis induces inflammation and tumor formation in the mammary gland through LPA<sub>1-3</sub> and high ATX expression, which is produced in the adjacent mammary adipose tissue rather than actual cancer cells [94, 95]. Individual overexpression of each of the EDG family receptors, but especially of LPA<sub>2</sub>, induced a high frequency of late-onset, estrogen receptor (ER) positive, and invasive and metastatic mammary cancer [94]. Moreover, bone metastases are frequent in BCa; ATX expression in these tumors can control the progression of osteolytic bone metastases *in vivo* through the procoagulant activity of BCa cells that induce platelet-derived LPA [96].

ATX-LPA axis is a strong inducer of inflammatory mediators like IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , and growth factors such as the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) [95]. Some molecules (IL-8 and VEGF) were detected earlier than tumorigenesis *in vivo* [94]. Inhibition of ATX induced a two-fold reduction in at least 20 of these inflammatory mediators in the tumor-adjacent mammary adipose tissue-reducing inflammation and tumorigenesis [95]. Additionally, expression of LPA<sub>1-3</sub> increased phosphorylation of STAT3, STAT5, NF $\kappa$ B and ATF2, and master inflammatory transcription factors, in mouse mammary carcinomas [94]. Furthermore, cytokines produced in the microenvironment (i.e., IL-6) can activate STAT3 through its receptors inducing an

inflammatory loop [97]. Adipose tissue adjacent to breast tumors stimulates autotaxin (ATX) secretion, which increases tumor growth and metastasis [19]. Interestingly, radiotherapy in adipose tissue of rats and humans increased mRNA expression of ATX, multiple inflammatory mediators, and LPA<sub>1-2</sub>. Such effect could promote LPA signaling and further inflammatory signaling, which in turn could potentially protect cancer cells from subsequent radiation therapy [98]. ATX inhibition reduced the leukocyte infiltration and tumor growth *in vivo* [95]. All these evidence suggest that chronic inflammation contributes to tumor development in BCa. Controlling inflammation and cancer progression could be achieved by targeting the ATX-LPA axis.

**4.3. Ovary.** In ovarian cancer (OC), ATX is highly expressed and secreted by cancer cells [99]. Therefore, LPA is present at high concentrations in the ascites fluid of OC patients compared to benign and healthy controls and has been proposed as a potential biomarker [100–102]. LPA acts as a growth factor and prevents apoptosis in OC cells by signaling through redox-dependent activation of ERK, AKT, and NF $\kappa$ B signaling pathways. Inhibiting ROS production blocked LPA/NF $\kappa$ B signaling and cell proliferation [103]. Additionally, LPA has been shown to upregulate the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and telomerase activity in OC cell lines, through a PI3K and HIF-1 $\alpha$ -dependent mechanism, enabling replicative immortality [104]. On the other hand, OC cell lines, SKOV-3, and OVCAR3 that expressed increased LPA<sub>1-3</sub> receptors showed more invasiveness compared to knockdowns. Moreover, via LPA<sub>2-3</sub>, OC cells promote production of IL-6, IL-8, and VEGF *in vitro* [105] and induced urokinase plasminogen activator (uPA) secretion in a MAPK- (p38) and PI3K-dependent mechanism that required Src kinase for optimal MAPK phosphorylation, enhancing OC invasion [106].

**4.4. Liver.** Liver cirrhosis, a terminal stage of chronic inflammatory and fibrotic liver diseases, and chronic hepatitis C are distinct risk factors for hepatocellular carcinoma (HCC) [107, 108]. Increased serum ATX activity and plasma LPA levels have been found in patients with chronic hepatitis C in association with a histological stage of liver fibrosis [108]. Furthermore, in HCC, ATX is expressed in 89% of tumor tissues, especially in those with cirrhosis or hepatitis C, compared to 20% in normal hepatocytes [109]. Additionally, in HCC cell lines, TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ B pathway, known to contribute to inflammation-associated cancer, was shown to upregulate ATX expression and LPA production. The latter resulted in an increased cellular invasion [109]. Similarly, LPA modulates tumor microenvironment by inducing transdifferentiation of peritumoral fibroblasts to a CAF-like myofibroblastic phenotype which enhances proliferation, migration, and invasion in HCC [110]. Additionally, LPA<sub>6</sub> mediates tumor growth and tumorigenicity by upregulating Pim-3 protooncogene through a STAT3-dependent mechanism [69]. Recently, human cirrhosis regulatory gene modules were identified through a transcriptome meta-analysis [107]. This analysis provides an overview of a molecular dysregulation common to a wide range of liver disease

TABLE 1: Targeting the ATX-LPA axis in cancer and inflammation.

Name	Target	Mechanism of action	Phase	Indication/model	Reference
HA130	ATX	It binds to the active site of ATX (T210). IC <sub>50</sub> = 28 nM <i>in vitro</i>	Preclinical	Melanoma	[25]
PF-8380	ATX	Direct binding to ATX. Inhibits lysoPLD activity. IC <sub>50</sub> = 2.8 nM isolated ATX IC <sub>50</sub> = 101 nM <i>in vivo</i>	Preclinical	(i) Inflammation (ii) Glioblastoma	[133–135]
ONO-8430506	ATX	Direct binding to ATX. Inhibits lysoPLD activity. IC <sub>50</sub> = 4.5 nM isolated ATX IC <sub>50</sub> = 4.1–11.6 nM <i>in vivo</i>	Preclinical	(i) Breast cancer (ii) BCa metastasis (iii) Thyroid cancer	[19, 28, 121, 136]
GLPG1690	ATX	Binding to the hydrophobic pocket and hydrophobic channel of the protein. IC <sub>50</sub> = 131 nM <i>in vitro</i>	Phase II	Idiopathic pulmonary fibrosis	[137, 138]
BMS-986020	LPA <sub>1</sub>	Inhibits signaling by LPA <sub>1</sub>	Phase II	Idiopathic pulmonary fibrosis	[139, 140]
SAR100842	LPA <sub>1</sub>	LPA <sub>1</sub> antagonist	Phase II	Systemic sclerosis	[141]
BrP-LPA	ATX LPA <sub>1</sub> LPA <sub>2</sub> LPA <sub>3</sub> LPA <sub>4</sub> LPA <sub>5</sub>	Direct binding to ATX. Inhibits lysoPLD activity. IC <sub>50</sub> : 600 nM <i>ex vivo</i> Direct binding and inhibition of LPA <sub>1–5</sub>	Preclinical	(i) Rheumatoid arthritis (ii) Breast cancer (iii) Pancreatic cancer (iv) Glioma	[142–145]

etiologies in which the ATX-LPA axis is a central regulator [107]. This study marks a great breakthrough in the area and provides a promising target for HCC chemoprevention through this axis; mainly due to the compounds of ongoing clinical trials on idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis (Table 1). If approved, they could be tested as preventive therapy in cirrhosis patients and as adjuvant therapy in HCC [107, 111].

**4.5. Colon.** In human colorectal cancer (CC), expression of LPA<sub>1</sub> and LPA<sub>2</sub> is increased compared to normal mucosa. Conversely, LPA<sub>3</sub> has a low expression in malignant tissues [112]. Evidence suggests a probable role of LPA<sub>1/2</sub> receptors in CC. Furthermore, LPA-stimulated proliferation through the MAPK pathway, as well as migration through Rho kinase, and chemoresistance through the PI3K/AKT pathway [113]. Inflammation is an established risk for developing CC. Interestingly, in a colitis-associated mice cancer model, *Lpar*<sub>2</sub><sup>-/-</sup> showed a decrease in tumor incidence and in progression to colon adenocarcinomas by reducing proliferation and proinflammatory factors such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) [114]. The latter affected the infiltration of macrophages to the tumor microenvironment [114]. Moreover, although LPA increased tumor incidence in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice predisposed to adenomas, in *Lpar*<sub>2</sub><sup>-/-</sup> *Apc*<sup>Min/+</sup>, tumor incidence was reduced by 50% [114, 115]. In addition, the expression levels of KLF5, cyclin D1, c-Myc, and HIF-1 $\alpha$  were lower compared to *Apc*<sup>Min/+</sup> mice, while  $\beta$ -catenin was primarily cytoplasmic in *Lpar*<sub>2</sub><sup>-/-</sup> *Apc*<sup>Min/+</sup> mice compared to its nuclear localization in *Apc*<sup>Min/+</sup> mice [115]. This evidence suggests an important role of ATX-LPA axis in tumorigenesis derived from colon chronic inflammation.

**4.6. Others.** Along with cancers previously described, ATX-LPA axis and its signaling pathways have been studied in several other carcinomas such as melanoma, where LPA signaling suppresses antigen receptor signaling, cell activation, and proliferation in CD8 T cells that express LPA<sub>5</sub>, inhibiting immune response [116] and promoting tumorigenesis. In pancreatic cancer, LPA<sub>1</sub> and LPA<sub>3</sub> promote proliferation, invasion through MMP2 secretion, and activation of focal adhesion kinase (FAK) and Paxillin, as well as drug resistance [117, 118]. In glioblastoma multiforme (GBM), an increased ATX-LPA axis has been described to promote cell proliferation and migration through LPA<sub>1</sub> [119]. GBM is also characterized by high levels of inflammatory mediators and activation of AKT and NF $\kappa$ B signaling pathways, although the link between ATX-LPA and inflammation remains to be studied [120]. In thyroid cancer, ATX is highly expressed in papillary thyroid carcinomas compared with benign neoplasm [121]. ATX-LPA axis induces at least 16 inflammatory mediators, including IL1- $\beta$ , IL6, IL8, G-CSF, and TNF- $\alpha$  *in vivo*; at the same time, these mediators induce ATX expression and increase LPA levels. Blocking the ATX-LPA axis induced a reduction of inflammatory mediators, tumor volume, and angiogenesis [121]. In renal cell carcinoma, ATX-LPA axis is associated to chemoresistance through LPA<sub>1</sub>. Coadministration of Ki16425, an LPA<sub>1/3</sub> antagonist, with sunitinib, a tyrosine kinase inhibitor, prolonged the responsiveness of renal cell carcinoma to sunitinib in xenograft models [122].

So far, the evidence shows that ATX-LPA signaling in cancer is more complex than previously thought. In addition to promoting proliferation, aggressiveness, and metastasis, it induces an enabling inflammatory setting (Figure 3) and contributes to the differentiation of CAFs [123],

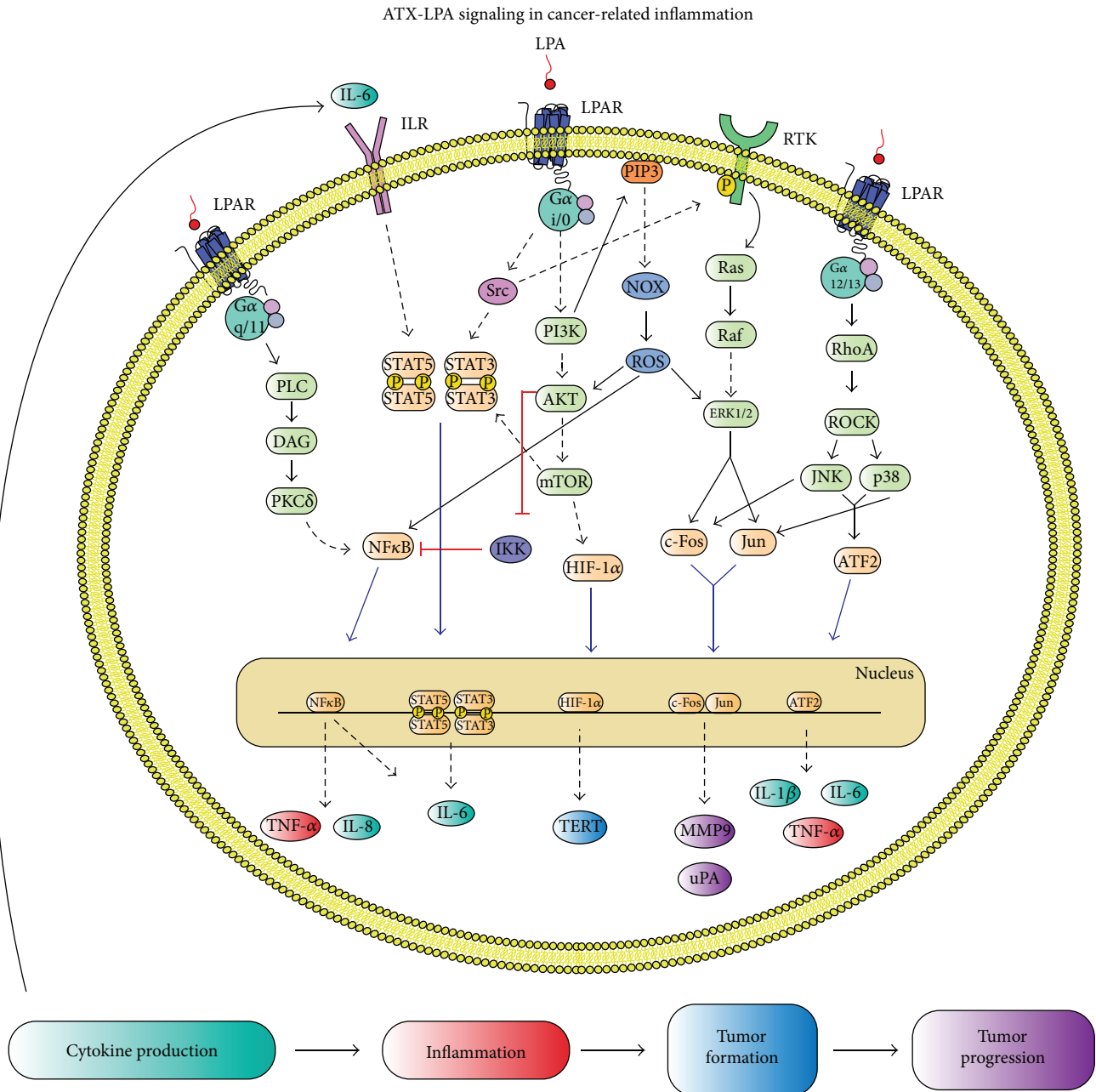


FIGURE 3: ATX-LPA axis promotes cancer-related inflammation. In CRI, LPA acts on its receptors via  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{i/o}$ , and  $G\alpha_{12/13}$ .  $G\alpha_{q/11}$  induces  $NF\kappa B$  activation through  $PKC\delta$  promoting  $TNF-\alpha$ ,  $IL-8$ , and  $IL-6$  production.  $G\alpha_{i/o}$  induces the  $PI3K/AKT/mTOR$  pathway culminating in  $NF\kappa B$  and  $HIF-1\alpha$  translocation to the nucleus.  $HIF-1\alpha$  induces the transcription of  $TERT$  enabling replicative immortality.  $G\alpha_{i/o}$  can also transactivate  $Src$  kinase and crosstalk with  $EGFR$ , to induce extracellular matrix degrading proteins, and  $STAT-3$  signaling pathway to further induce cytokine production.  $PI3K$  signaling promotes  $ROS$  production and activation of  $AKT$ ,  $ERK1/2$ , and  $NF\kappa B$ . On the other hand,  $G\alpha_{12/13}/RhoA/ROCK$  signaling causes activation of transcription factor  $ATF2$  to induce further proinflammatory mediator production. Finally, cytokine production, particularly  $IL-6$ , can interact with their  $IL$  receptors and promote  $STAT5$  and  $STAT3$  activation. In all, these pathways maintain a proinflammatory environment that leads to malignant transformation. Dashed lines denote that other proteins participate in the pathways and were omitted to summarize information. This figure is reproduced from Liu et al. [124] (under the Creative Commons Attribution License/public domain).

leukocyte infiltration [92, 116], angiogenesis [123], and stem cell maintenance [99]; all of them are important components of tumor microenvironment (Figure 4). Thus, the ATX-LPA axis represents a crucial target to reduce CRI and cancer progression.

## 5. Targeting Autotaxin-LPA Axis for Cancer Therapy

LPA signaling is regulated by ATX activity, LPA receptors, and LPA degradation by  $LPP1$  and  $LPAAT$  [125, 126]. In

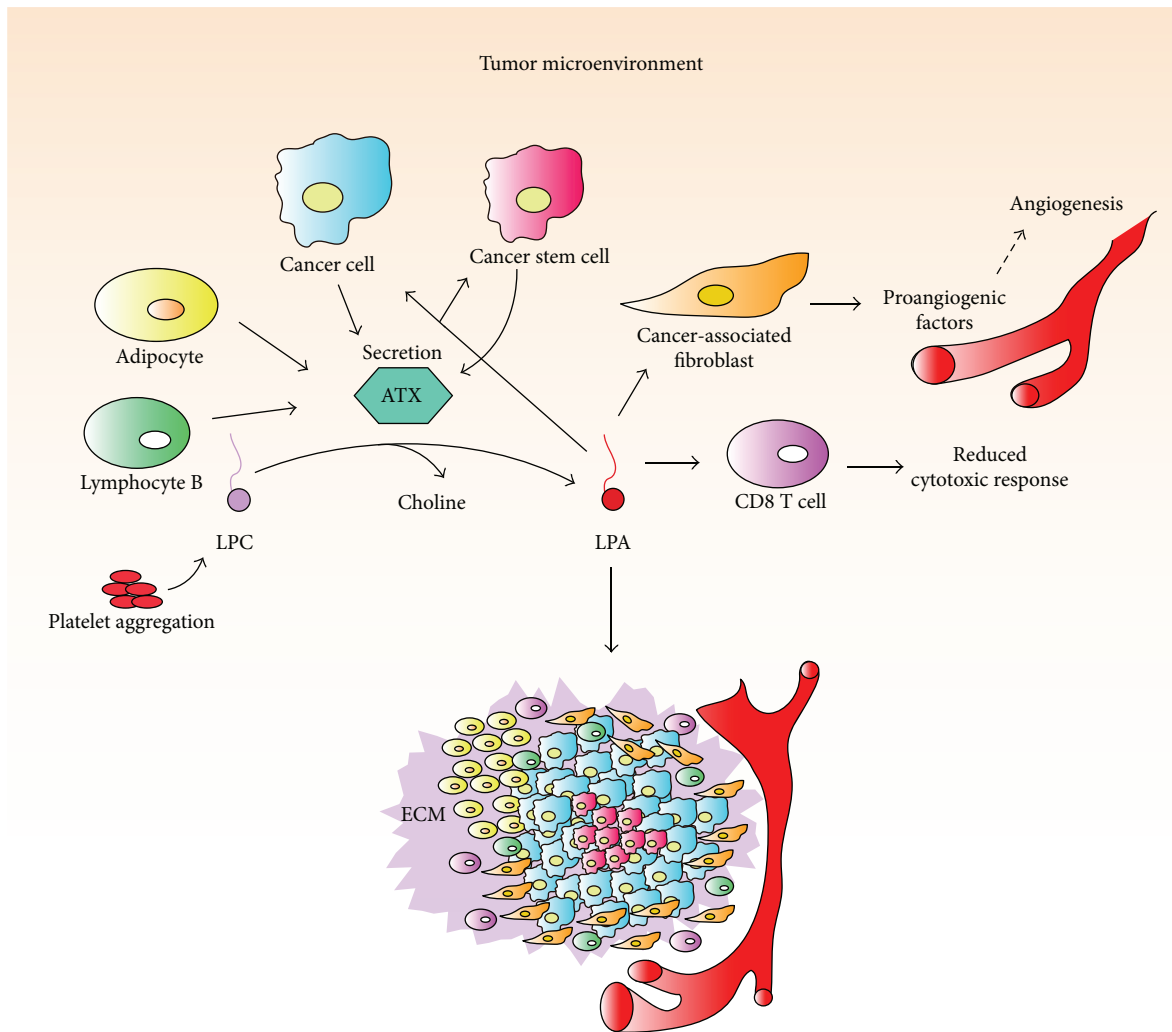


FIGURE 4: ATX-LPA signaling in tumor microenvironment. ATX hydrolyzes LPC to produce LPA from circulating LPC and platelet-derived LPC. ATX is mainly released into the tumor microenvironment by tumor-adjacent adipocytes and B lymphocytes but cancer cells and cancer stem cells also secrete this enzyme. LPA signals through its receptors to induce proliferation and invasion in cancer cells and cancer stem cells. LPA signaling induces angiogenesis through the recruitment of CAFs; it also reduces cytotoxic immune response via CD8 T cells. ECM (extracellular matrix).

numerous cancers, ATX protein is overexpressed, leading to increased LPA levels in the tumor microenvironment and peripheral blood [99, 101, 127]. Cancer cells have a higher LPA receptor content on their cell surface compared to normal and benign cells and a downregulated expression of LPPs [128]. Therefore, targeting LPA signaling through these components is currently under study and constantly reviewed [4, 127, 129–132]. In this section, we summarize some of the drugs studied regarding ATX inhibition and LPA receptor antagonism (Table 1).

ATX-LPA axis has been shown to induce chemoresistance by upregulating antioxidant genes, multidrug-resistant transporters (ABCC1, ABCG2, ABCC2, and ABCC3), aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1), and stem cell maintenance [99, 136]. Additionally, ATX is among the top 40 most upregulated genes in metastatic cancer [146]. Therefore,

inhibition of the axis has shown great results as adjuvant therapy to enhance both chemo- and radiotherapy *in vitro* and *in vivo*, as well as tumor growth reduction. Additionally, as we described, CRI is an enabling setting for tumor development. We suggest that a strategy to be considered regarding the ATX-LPA axis in CRI should be a multitarget approach, where both proinflammatory cytokines and ATX-LPA are taken into consideration for better outcomes.

Currently, drugs of ongoing clinical trials are for non-cancer diseases; nevertheless, once approved, they could be tested in various cancers. Meanwhile, improvement of physiological and pathological knowledge regarding signal transduction by this axis will lead to the development of more specific therapeutic drugs to better target this signaling cascade.



## 6. Conclusions

The ATX-LPA signaling pathway is physiologically relevant during development and adulthood. Dysregulation of this axis is linked to several pathologies, including inflammation-related conditions such as rheumatoid arthritis, fibrosis, neuropathic pain, and cancer. In cancer, it has a major involvement in key components of the microenvironment, including leukocyte infiltration, angiogenesis, and decreased immune response. Interestingly, this axis has been shown to mediate cancer-related inflammation through diverse signaling pathways, crosstalk, and positive loops. Therefore, it enhances a proinflammatory microenvironment and, at the same time, ATX-LPA signaling augments. Breaking the inflammatory cycle and blocking LPA signaling and production should provide an innovative treatment for cancer by decreasing CRI, tumor growth, metastasis, and resistance to cancer treatments. Recent evidence in cirrhosis patients point to this axis as a key regulator in HCC tumorigenesis, providing a very interesting potential target for cancer prevention.

As we wait for ATX-LPA inhibitors to move from preclinical into clinical trials, further investigation is needed regarding this complex signaling pathway to achieve more efficient therapeutics in cancer and other ATX-LPA axis-related pathologies.

## Abbreviations

LPA:	Lysophosphatidic acid
GPCR:	G protein-coupled receptor
ATX:	Autotaxin
PC:	Phosphatidylcholine
PS:	Phosphatidylserine
PE:	Phosphatidylethanolamine
PLA1:	Phospholipase A1
PLA2:	Phospholipase A2
LPC:	Lysophosphatidylcholine
PA:	Phosphatidic acid
PLD:	Phospholipase D
sPLA2:	Secreted phospholipase A2
LPP1:	Lipid phosphate phosphohydrolase type 1
MAG:	Monoacylglycerol
LPAAT:	Lysophosphatidic acid acyltransferase
LPE:	Lysophosphatidylethanolamine
LPS:	Lysophosphatidylserine
cPLA2:	Cytosolic phospholipase A2
AC:	Adenylyl cyclase
EDG family:	Endothelial differentiation gene family
Vgz-1:	Ventricular zone gene-1
CNS:	Central nervous system
COX-2:	Cyclooxygenase-2
HCC:	Hepatocellular carcinoma
CRI:	Cancer-related inflammation
PKC:	Protein kinase C
HBEpCs:	Human bronchial epithelial cells
MMP:	Matrix metalloprotease
Stat:	Signal transducers and activators of the transcription

BCa:	Breast cancer
ER:	Estrogen receptor
IL:	Interleukin
TNF- $\alpha$ :	Tumor necrosis factor $\alpha$
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
G-CSF:	Granulocyte colony-stimulating factor
NF $\kappa$ B:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ATF2:	Activating transcription factor 2
OC:	Ovarian cancer
ROS:	Reactive oxygen species
hTERT:	Human telomerase reverse transcriptase
HIF-1 $\alpha$ :	Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$
uPA:	Urokinase plasminogen activator
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein-1
MIF:	Macrophage migration inhibitory factor
KLF5:	Krüppel-like factor 5
FAK:	Focal adhesion kinase
GBM:	Glioblastoma multiforme
CAF:	Cancer-associated fibroblast
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
ECM:	Extracellular matrix
ALDH1:	Aldehyde dehydrogenase 1.

## Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This work was supported by UNAM-PAPIIT IA200718. Silvia Anahi Valdés-Rives is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received Fellowship 582548 from CONACYT.

## References

- [1] W. H. Moolenaar, "Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 905, pp. 1–10, 2000.
- [2] K. Bandoh, J. Aoki, A. Taira, M. Tsujimoto, H. Arai, and K. Inoue, "Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species," *FEBS Letters*, vol. 478, no. 1-2, pp. 159–165, 2000.
- [3] W. H. Moolenaar, L. A. van Meeteren, and B. N. G. Geppmans, "The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling," *BioEssays*, vol. 26, no. 8, pp. 870–881, 2004.
- [4] I. Gonzalez-Gil, D. Zian, H. Vazquez-Villa, S. Ortega-Gutierrez, and M. L. Lopez-Rodriguez, "The status of the lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA<sub>1</sub>R)," *MedChemComm*, vol. 6, no. 1, pp. 13–23, 2015.
- [5] G. B. Mills and W. H. Moolenaar, "The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 8, pp. 582–591, 2003.
- [6] J. W. Choi and J. Chun, "Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1831, no. 1, pp. 20–32, 2013.

- [7] Y. C. Yung, N. C. Stoddard, and J. Chun, "LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology," *Journal of Lipid Research*, vol. 55, no. 7, pp. 1192–1214, 2014.
- [8] J. Mazereeuw-Hautier, S. Gres, M. Fanguin et al., "Production of lysophosphatidic acid in blister fluid: involvement of a lysophospholipase D activity," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 125, no. 3, pp. 421–427, 2005.
- [9] L. A. van Meeteren and W. H. Moolenaar, "Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis," *Progress in Lipid Research*, vol. 46, no. 2, pp. 145–160, 2007.
- [10] C. Pagès, M.-F. Simon, P. Valet, and J. S. Saulnier-Blache, "Lysophosphatidic acid synthesis and release," *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, vol. 64, no. 1–4, pp. 1–10, 2001.
- [11] T. Sano, D. Baker, T. Virag et al., "Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 24, pp. 21197–21206, 2002.
- [12] D. L. Baker, D. M. Desiderio, D. D. Miller, B. Tolley, and G. J. Tigyi, "Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry," *Analytical Biochemistry*, vol. 292, no. 2, pp. 287–295, 2001.
- [13] J. W. Choi, D. R. Herr, K. Noguchi et al., "LPA receptors: subtypes and biological actions," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 50, no. 1, pp. 157–186, 2010.
- [14] J. Aoki, A. Inoue, and S. Okudaira, "Two pathways for lysophosphatidic acid production," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1781, no. 9, pp. 513–518, 2008.
- [15] A. Perrakis and W. H. Moolenaar, "Autotaxin: structure-function and signaling," *Journal of Lipid Research*, vol. 55, no. 6, pp. 1010–1018, 2014.
- [16] H. Kawagoe, O. Soma, J. Goji et al., "Molecular cloning and chromosomal assignment of the human brain-type phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase gene (PDNP2)," *Genomics*, vol. 30, no. 2, pp. 380–384, 1995.
- [17] A. Tokumura, E. Majima, Y. Kariya et al., "Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 42, pp. 39436–39442, 2002.
- [18] M. Umezū-Goto, Y. Kishi, A. Taira et al., "Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production," *The Journal of Cell Biology*, vol. 158, no. 2, pp. 227–233, 2002.
- [19] M. G. K. Benesch, X. Tang, T. Maeda et al., "Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice," *The FASEB Journal*, vol. 28, no. 6, pp. 2655–2666, 2014.
- [20] L. A. Van Meeteren, P. Ruurs, C. Stortelers et al., "Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 13, pp. 5015–5022, 2006.
- [21] M. Tanaka, S. Okudaira, Y. Kishi et al., "Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 35, pp. 25822–25830, 2006.
- [22] R. Dusaulcy, C. Rancoule, S. Grès et al., "Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid," *Journal of Lipid Research*, vol. 52, no. 6, pp. 1247–1255, 2011.
- [23] M. G. K. Benesch, Y. M. Ko, T. P. W. McMullen, and D. N. Brindley, "Autotaxin in the crosshairs: taking aim at cancer and other inflammatory conditions," *FEBS Letters*, vol. 588, no. 16, pp. 2712–2727, 2014.
- [24] G. Ferry, E. Tellier, A. Try et al., "Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 20, pp. 18162–18169, 2003.
- [25] H. M. H. G. Albers, A. Dong, L. A. van Meeteren et al., "Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 16, pp. 7257–7262, 2010.
- [26] J. L. Tomsig, A. H. Snyder, E. V. Berdyshev et al., "Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo," *Biochemical Journal*, vol. 419, no. 3, pp. 611–618, 2009.
- [27] X. Tang, M. G. K. Benesch, and D. N. Brindley, "Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology," *Journal of Lipid Research*, vol. 56, no. 11, pp. 2048–2060, 2015.
- [28] M. G. K. Benesch, Y. Y. Zhao, J. M. Curtis, T. P. W. McMullen, and D. N. Brindley, "Regulation of autotaxin expression and secretion by lysophosphatidate and sphingosine 1-phosphate," *Journal of Lipid Research*, vol. 56, no. 6, pp. 1134–1144, 2015.
- [29] V. A. Blaho and T. Hla, "Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors," *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 10, pp. 6299–6320, 2011.
- [30] Y. Kihara, M. Maceyka, S. Spiegel, and J. Chun, "Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR review 8," *British Journal of Pharmacology*, vol. 171, no. 15, pp. 3575–3594, 2014.
- [31] J. Chun, T. Hla, K. R. Lynch, S. Spiegel, and W. H. Moolenaar, "International union of basic and clinical pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature," *Pharmacological Reviews*, vol. 62, no. 4, pp. 579–587, 2010.
- [32] Y. Takuwa, N. Takuwa, and N. Sugimoto, "The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities," *The Journal of Biochemistry*, vol. 131, no. 6, pp. 767–771, 2002.
- [33] K. Yanagida, Y. Kurikawa, T. Shimizu, and S. Ishii, "Current progress in non-Edg family LPA receptor research," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1831, no. 1, pp. 33–41, 2013.
- [34] J. R. Williams, A. L. Khandoga, P. Goyal et al., "Unique ligand selectivity of the GPR92/LPA<sub>5</sub> lysophosphatidate receptor indicates role in human platelet activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 25, pp. 17304–17319, 2009.
- [35] J. H. Hecht, J. A. Weiner, S. R. Post, and J. Chun, "Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex," *The Journal of Cell Biology*, vol. 135, no. 4, pp. 1071–1083, 1996.
- [36] S. An, T. Bleu, O. G. Hallmark, and E. J. Goetzl, "Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled

- receptor for lysophosphatidic acid," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 14, pp. 7906–7910, 1998.
- [37] K. Bandoh, J. Aoki, H. Hosono et al., "Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 39, pp. 27776–27785, 1999.
- [38] D. S. Im, C. E. Heise, M. A. Harding et al., "Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate," *Molecular Pharmacology*, vol. 57, no. 4, pp. 753–759, 2000.
- [39] J. J. Contos, I. Ishii, and J. Chun, "Lysophosphatidic acid receptors," *Molecular Pharmacology*, vol. 58, no. 6, pp. 1188–1196, 2000.
- [40] Y. C. Yung, N. C. Stoddard, H. Mirendil, and J. Chun, "Lysophosphatidic acid signaling in the nervous system," *Neuron*, vol. 85, no. 4, pp. 669–682, 2015.
- [41] J. J. A. Contos, N. Fukushima, J. A. Weiner, D. Kaushal, and J. Chun, "Requirement for the  $lp_{A1}$  lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 24, pp. 13384–13389, 2000.
- [42] H. Ueda, H. Matsunaga, O. I. Olaposi, and J. Nagai, "Lysophosphatidic acid: chemical signature of neuropathic pain," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1831, no. 1, pp. 61–73, 2013.
- [43] Y.-J. Lai, C.-S. Chen, W.-C. Lin, and F.-T. Lin, "C-Src-mediated phosphorylation of TRIP6 regulates its function in lysophosphatidic acid-induced cell migration," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 25, no. 14, pp. 5859–5868, 2005.
- [44] Y.-J. Lai, W.-C. Lin, and F.-T. Lin, "PTPL1/FAP-1 negatively regulates TRIP6 function in lysophosphatidic acid-induced cell migration," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 33, pp. 24381–24387, 2007.
- [45] H. Ohuchi, A. Hamada, H. Matsuda et al., "Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development," *Developmental Dynamics*, vol. 237, no. 11, pp. 3280–3294, 2008.
- [46] J. J. A. Contos, I. Ishii, N. Fukushima et al., "Characterization of  $lp_{A2}$  (*Edg4*) and  $lp_{A1}/lp_{A2}$  (*Edg2/Edg4*) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to  $lp_{A2}$ ," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, no. 19, pp. 6921–6929, 2002.
- [47] I. Ishii, J. J. Contos, N. Fukushima, and J. Chun, "Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors,  $LP_{A1}/VZG-1/EDG-2$ ,  $LP_{A2}/EDG-4$ , and  $LP_{A3}/EDG-7$  in neuronal cell lines using a retrovirus expression system," *Molecular Pharmacology*, vol. 58, no. 5, pp. 895–902, 2000.
- [48] X. Ye, K. Hama, J. J. A. Contos et al., "LPA<sub>3</sub>-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing," *Nature*, vol. 435, no. 7038, pp. 104–108, 2005.
- [49] X. Ye, M. K. Skinner, G. Kennedy, and J. Chun, "Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling," *Biology of Reproduction*, vol. 79, no. 2, pp. 328–336, 2008.
- [50] K. Noguchi, S. Ishii, and T. Shimizu, "Identification of p2y<sub>9</sub>/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 28, pp. 25600–25606, 2003.
- [51] K. Kotarsky, Å. Boketoft, J. Bristulf et al., "Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 318, no. 2, pp. 619–628, 2006.
- [52] C.-W. Lee, R. Rivera, S. Gardell, A. E. Dubin, and J. Chun, "GPR92 as a new G12/13- and G<sub>q</sub>-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA<sub>5</sub>," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 33, pp. 23589–23597, 2006.
- [53] K. Yanagida, K. Masago, H. Nakanishi et al., "Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA<sub>6</sub>," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 26, pp. 17731–17741, 2009.
- [54] M. Lee, S. Choi, G. Halldén, S. J. Yo, D. Schichnes, and G. W. Aponte, "P2Y5 is a G<sub>αi</sub>, G<sub>α12/13</sub> G protein-coupled receptor activated by lysophosphatidic acid that reduces intestinal cell adhesion," *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 297, no. 4, pp. G641–G654, 2009.
- [55] S. M. Pasternack, I. von Kügelgen, K. Al Aboud et al., "G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth," *Nature Genetics*, vol. 40, no. 3, pp. 329–334, 2008.
- [56] R. Janssens, J. M. Boeynaems, M. Godart, and D. Communi, "Cloning of a human heptahelical receptor closely related to the P2Y<sub>5</sub> receptor," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 236, no. 1, pp. 106–112, 1997.
- [57] C.-W. Lee, R. Rivera, A. E. Dubin, and J. Chun, "LPA<sub>4</sub>/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G<sub>s</sub>-, G<sub>q</sub>/G<sub>i</sub>-mediated calcium signaling and G12/13-mediated rho activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 7, pp. 4310–4317, 2007.
- [58] Z. Lee, C.-T. Cheng, H. Zhang et al., "Role of LPA<sub>4</sub>/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 19, no. 12, pp. 5435–5445, 2008.
- [59] H. Sumida, K. Noguchi, Y. Kihara et al., "LPA<sub>4</sub> regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis," *Blood*, vol. 116, no. 23, pp. 5060–5070, 2010.
- [60] S. Amisten, O. O. Braun, A. Bengtsson, and D. Erlinge, "Gene expression profiling for the identification of G-protein coupled receptors in human platelets," *Thrombosis Research*, vol. 122, no. 1, pp. 47–57, 2008.
- [61] Z. Callaerts-Vegh, S. Leo, B. Vermaercke, T. Meert, and R. D'Hooge, "LPA5 receptor plays a role in pain sensitivity, emotional exploration and reversal learning," *Genes, Brain and Behavior*, vol. 11, pp. 1009–1019, 2012.
- [62] M.-E. Lin, R. R. Rivera, and J. Chun, "Targeted deletion of LPA<sub>5</sub> identifies novel roles for lysophosphatidic acid signaling in development of neuropathic pain," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 21, pp. 17608–17617, 2012.
- [63] K. Takahashi, K. Fukushima, Y. Onishi et al., "Lysophosphatidic acid (LPA) signaling via LPA<sub>4</sub> and LPA<sub>6</sub> negatively regulates cell motile activities of colon cancer cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 483, no. 1, pp. 652–657, 2017.
- [64] M. Araki, M. Kitayoshi, Y. Dong et al., "Inhibitory effects of lysophosphatidic acid receptor-5 on cellular functions of sarcoma cells," *Growth Factors*, vol. 32, no. 3-4, pp. 117–122, 2014.
- [65] M. Jongsma, E. Matas-Rico, A. Rzadkowski, K. Jalink, and W. H. Moolenaar, "LPA is a chemorepellent for B16 melanoma cells: action through the cAMP-elevating LPA<sub>5</sub> receptor," *PLoS One*, vol. 6, no. 12, article e29260, 2011.



- [66] M. Hayashi, K. Okabe, Y. Yamawaki et al., "Loss of lysophosphatidic acid receptor-3 enhances cell migration in rat lung tumor cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 405, no. 3, pp. 450–454, 2011.
- [67] K. Harper, D. Arsenault, S. Boulay-Jean, A. Lauzier, F. Lucien, and C. M. Dubois, "Autotaxin promotes cancer invasion via the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation," *Cancer Research*, vol. 70, no. 11, pp. 4634–4643, 2010.
- [68] K. Okabe, M. Hayashi, Y. Yamawaki et al., "Possible involvement of lysophosphatidic acid receptor-5 gene in the acquisition of growth advantage of rat tumor cells," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 50, no. 8, pp. 635–642, 2011.
- [69] A. Mazzocca, F. Dituri, F. De Santis et al., "Lysophosphatidic acid receptor LPAR6 supports the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma," *Cancer Research*, vol. 75, no. 3, pp. 532–543, 2015.
- [70] F. Balkwill and A. Mantovani, "Inflammation and cancer: back to Virchow?," *The Lancet*, vol. 357, no. 9255, pp. 539–545, 2001.
- [71] F. Colotta, P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, and A. Mantovani, "Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 7, pp. 1073–1081, 2009.
- [72] S. Deivendran, K. H. Marzook, and M. Radhakrishna Pillai, "The role of inflammation in cervical cancer," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 816, pp. 377–399, 2014.
- [73] J. G. Fox and T. C. Wang, "Inflammation, atrophy, and gastric cancer," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 1, pp. 60–69, 2007.
- [74] H. Barash, E. R. Gross, Y. Edrei et al., "Accelerated carcinogenesis following liver regeneration is associated with chronic inflammation-induced double-strand DNA breaks," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 5, pp. 2207–2212, 2010.
- [75] D. G. DeNardo and L. M. Coussens, "Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression," *Breast Cancer Research*, vol. 9, no. 4, p. 212, 2007.
- [76] A. M. Al Murri, J. M. S. Bartlett, P. A. Canney, J. C. Doughty, C. Wilson, and D. C. McMillan, "Evaluation of an inflammation-based prognostic score (GPS) in patients with metastatic breast cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 94, no. 2, pp. 227–230, 2006.
- [77] N. Azad, Y. Rojanasakul, and V. Vallyathan, "Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species," *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, 2008.
- [78] K. S. Sfanos and A. M. De Marzo, "Prostate cancer and inflammation: the evidence," *Histopathology*, vol. 60, no. 1, pp. 199–215, 2012.
- [79] A. Macciò and C. Madeddu, "Inflammation and ovarian cancer," *Cytokine*, vol. 58, no. 2, pp. 133–147, 2012.
- [80] V. Guarino, M. D. Castellone, E. Avilla, and R. M. Melillo, "Thyroid cancer and inflammation," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 321, no. 1, pp. 94–102, 2010.
- [81] J. Liang, M. Nagahashi, E. Y. Kim et al., "Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer," *Cancer Cell*, vol. 23, no. 1, pp. 107–120, 2013.
- [82] E. R. Rayburn, S. J. Ezell, and R. Zhang, "Anti-inflammatory agents for cancer therapy," *Molecular and Cellular Pharmacology*, vol. 1, no. 1, pp. 29–43, 2009.
- [83] C. M. Ulrich, J. Bigler, and J. D. Potter, "Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 2, pp. 130–140, 2006.
- [84] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [85] Z. Bai, L. Cai, E. Umemoto et al., "Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the Autotaxin/lysophosphatidic acid Axis," *The Journal of Immunology*, vol. 190, no. 5, pp. 2036–2048, 2013.
- [86] S. Knowlden and S. N. Georas, "The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation," *The Journal of Immunology*, vol. 192, no. 3, pp. 851–857, 2014.
- [87] D. N. Brindley, M. G. K. Benesch, and M. M. Murph, "Autotaxin—an enzymatic augmentor of malignant progression linked to inflammation," in *Melanoma - Current Clinical Management and Future Therapeutics*, M. Murph, Ed., p. 12, InTech, Rijeka, 2015.
- [88] R. Cummings, Y. Zhao, D. Jacoby et al., "Protein kinase C $\delta$  mediates lysophosphatidic acid-induced NF- $\kappa$ B activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 39, pp. 41085–41094, 2004.
- [89] Y. Zhao, D. He, B. Saatian et al., "Regulation of lysophosphatidic acid-induced epidermal growth factor receptor transactivation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells by protein kinase C $\delta$ , Lyn kinase, and matrix metalloproteinases," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 28, pp. 19501–19511, 2006.
- [90] Y. Li, H. Du, Y. Qin, J. Roberts, O. W. Cummings, and C. Yan, "Activation of the signal transducers and activators of the transcription 3 pathway in alveolar epithelial cells induces inflammation and adenocarcinomas in mouse lung," *Cancer Research*, vol. 67, no. 18, pp. 8494–8503, 2007.
- [91] X. Xu and G. D. Prestwich, "Inhibition of tumor growth and angiogenesis by a lysophosphatidic acid antagonist in an engineered three-dimensional lung cancer xenograft model," *Cancer*, vol. 116, no. 7, pp. 1739–1750, 2010.
- [92] Y. Yang, L. Mou, N. Liu, and M. S. Tsao, "Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 21, no. 2, pp. 216–222, 1999.
- [93] G. Schneider, Z. P. Sellers, K. Bujko, S. S. Kakar, M. Kucia, and M. Z. Ratajczak, "Novel pleiotropic effects of bioactive phospholipids in human lung cancer metastasis," *Oncotarget*, vol. 8, no. 35, pp. 58247–58263, 2017.
- [94] S. Liu, M. Umezu-Goto, M. Murph et al., "Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases," *Cancer Cell*, vol. 15, no. 6, pp. 539–550, 2009.
- [95] M. G. K. Benesch, X. Tang, J. Dewald et al., "Tumor-induced inflammation in mammary adipose tissue stimulates a vicious cycle of autotaxin expression and breast cancer



- progression," *The FASEB Journal*, vol. 29, no. 9, pp. 3990–4000, 2015.
- [96] M. David, E. Wannecq, F. Descotes et al., "Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts," *PLoS One*, vol. 5, no. 3, article e9741, 2010.
- [97] H. Yu, D. Pardoll, and R. Jove, "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3," *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 11, pp. 798–809, 2009.
- [98] G. Meng, X. Tang, Z. Yang et al., "Implications for breast cancer treatment from increased autotaxin production in adipose tissue after radiotherapy," *The FASEB Journal*, vol. 31, no. 9, pp. 4064–4077, 2017.
- [99] E. J. Seo, Y. W. Kwon, I. H. Jang et al., "Autotaxin regulates maintenance of ovarian cancer stem cells through lysophosphatidic acid-mediated autocrine mechanism," *Stem Cells*, vol. 34, no. 3, pp. 551–564, 2016.
- [100] Y. Xu, Z. Shen, D. W. Wiper et al., "Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers," *JAMA*, vol. 280, no. 8, pp. 719–723, 1998.
- [101] Y.-Y. Li, W.-C. Zhang, J.-L. Zhang et al., "Plasma levels of lysophosphatidic acid in ovarian cancer versus controls: a meta-analysis," *Lipids in Health and Disease*, vol. 14, no. 1, p. 72, 2015.
- [102] S.-Y. Zhang, W. Shi, P. Cheng, and M. J. Zaworotko, "A mixed-crystal lanthanide zeolite-like metal-organic framework as a fluorescent indicator for lysophosphatidic acid, a cancer biomarker," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 137, no. 38, pp. 12203–12206, 2015.
- [103] J. A. Saunders, L. C. Rogers, C. Klomsiri, L. B. Poole, and L. W. Daniel, "Reactive oxygen species mediate lysophosphatidic acid induced signaling in ovarian cancer cells," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 49, no. 12, pp. 2058–2067, 2010.
- [104] K. Yang, D. Zheng, X. Deng, L. Bai, Y. Xu, and Y.-S. Cong, "Lysophosphatidic acid activates telomerase in ovarian cancer cells through hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and the PI3K pathway," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 105, no. 5, pp. 1194–1201, 2008.
- [105] S. Yu, M. M. Murph, Y. Lu et al., "Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 100, no. 22, pp. 1630–1642, 2008.
- [106] V. C. Estrella, A. M. Eder, S. Liu et al., "Lysophosphatidic acid induction of urokinase plasminogen activator secretion requires activation of the p38MAPK pathway," *International Journal of Oncology*, vol. 31, no. 2, pp. 441–449, 2007.
- [107] S. Nakagawa, L. Wei, W. M. Song et al., "Molecular liver cancer prevention in cirrhosis by organ transcriptome analysis and lysophosphatidic acid pathway inhibition," *Cancer Cell*, vol. 30, pp. 879–890, 2017.
- [108] N. Watanabe, H. Ikeda, K. Nakamura et al., "Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C," *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 41, no. 6, pp. 616–623, 2007.
- [109] J.-M. Wu, Y. Xu, N. J. Skill et al., "Autotaxin expression and its connection with the TNF- $\alpha$ -NF- $\kappa$ B axis in human hepatocellular carcinoma," *Molecular Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 71, 2010.
- [110] A. Mazzocca, F. Dituri, L. Lupo, M. Quaranta, S. Antonaci, and G. Giannelli, "Tumor-secreted lysophosphatidic acid accelerates hepatocellular carcinoma progression by promoting differentiation of peritumoral fibroblasts in myofibroblasts," *Hepatology*, vol. 54, no. 3, pp. 920–930, 2011.
- [111] D. J. Erstad, A. M. Tager, Y. Hoshida, and B. C. Fuchs, "The autotaxin-lysophosphatidic acid pathway emerges as a therapeutic target to prevent liver cancer," *Molecular & Cellular Oncology*, vol. 4, no. 3, article e1311827, 2017.
- [112] D. Shida, T. Watanabe, J. Aoki et al., "Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer," *Laboratory Investigation*, vol. 84, no. 10, pp. 1352–1362, 2004.
- [113] H. Sun, J. Ren, Q. Zhu, F.-Z. Kong, L. Wu, and B.-R. Pan, "Effects of lysophosphatidic acid on human colon cancer cells and its mechanisms of action," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 15, no. 36, pp. 4547–4555, 2009.
- [114] S. Lin, D. Wang, S. Iyer et al., "The absence of LPA<sub>2</sub> attenuates tumor formation in an experimental model of colitis-associated cancer," *Gastroenterology*, vol. 136, no. 5, pp. 1711–1720, 2009.
- [115] S. Lin, S.-J. Lee, H. Shim, J. Chun, and C. C. Yun, "The absence of LPA receptor 2 reduces the tumorigenesis by APC<sup>Min</sup> mutation in the intestine," *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 299, no. 5, pp. G1128–G1138, 2010.
- [116] S. K. Oda, P. Strauch, Y. Fujiwara et al., "Lysophosphatidic acid inhibits CD8 T-cell activation and control of tumor progression," *Cancer Immunology Research*, vol. 1, no. 4, pp. 245–255, 2013.
- [117] Y. Liao, G. Mu, L. Zhang, W. Zhou, J. Zhang, and H. Yu, "Lysophosphatidic acid stimulates activation of focal adhesion kinase and paxillin and promotes cell motility, via LPA1–3, in human pancreatic cancer," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 58, no. 12, pp. 3524–3533, 2013.
- [118] K. Fukushima, K. Takahashi, E. Yamasaki et al., "Lysophosphatidic acid signaling via LPA<sub>1</sub> and LPA<sub>3</sub> regulates cellular functions during tumor progression in pancreatic cancer cells," *Experimental Cell Research*, vol. 352, no. 1, pp. 139–145, 2017.
- [119] Y. Kishi, S. Okudaira, M. Tanaka et al., "Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 25, pp. 17492–17500, 2006.
- [120] H. Wang, H. Wang, W. Zhang, H. J. Huang, W. S. L. Liao, and G. N. Fuller, "Analysis of the activation status of Akt, NF $\kappa$ B, and Stat3 in human diffuse gliomas," *Laboratory Investigation*, vol. 84, no. 8, pp. 941–951, 2004.
- [121] M. G. K. Benesch, Y. M. Ko, X. Tang et al., "Autotaxin is an inflammatory mediator and therapeutic target in thyroid cancer," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 22, no. 4, pp. 593–607, 2015.
- [122] S.-C. Su, X. Hu, P. A. Kenney et al., "Autotaxin-lysophosphatidic acid signaling axis mediates tumorigenesis and development of acquired resistance to sunitinib in renal cell carcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 23, pp. 6461–6472, 2013.
- [123] E. S. Jeon, S. C. Heo, I. H. Lee et al., "Ovarian cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates secretion of VEGF and stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  from human mesenchymal stem cells," *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 42, no. 4, pp. 280–293, 2010.

- [124] S. Liu, M. Murph, N. Panupinthu, and G. B. Mills, "ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 22, pp. 3695–3701, 2009.
- [125] D. N. Brindley, F.-T. Lin, and G. J. Tigyi, "Role of the autotaxin-lysophosphatidate axis in cancer resistance to chemotherapy and radiotherapy," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1831, no. 1, pp. 74–85, 2013.
- [126] B. P. C. Kok, G. Venkatraman, D. Capatos, and D. N. Brindley, "Unlike two peas in a pod: lipid phosphate phosphatases and phosphatidate phosphatases," *Chemical Reviews*, vol. 112, no. 10, pp. 5121–5146, 2012.
- [127] M. G. K. Benesch, X. Tang, G. Venkatraman, R. T. Bekele, and D. N. Brindley, "Recent advances in targeting the autotaxin-lysophosphatidate-lipid phosphate phosphatase axis *in vivo*," *The Journal of Biomedical Research*, vol. 30, no. 4, pp. 272–284, 2016.
- [128] N. Samadi, R. Bekele, D. Capatos, G. Venkatraman, M. Sariahmetoglu, and D. N. Brindley, "Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance," *Biochimie*, vol. 93, no. 1, pp. 61–70, 2011.
- [129] Y. Kihara, H. Mizuno, and J. Chun, "Lysophospholipid receptors in drug discovery," *Experimental Cell Research*, vol. 333, no. 2, pp. 171–177, 2015.
- [130] D. Castagna, D. C. Budd, S. J. F. MacDonald, C. Jamieson, and A. J. B. Watson, "Development of autotaxin inhibitors: an overview of the patent and primary literature," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 59, no. 12, pp. 5604–5621, 2016.
- [131] S. Llona-Minguez, A. Ghassemian, and T. Helleday, "Lysophosphatidic acid receptor (LPA) modulators: the current pharmacological toolbox," *Progress in Lipid Research*, vol. 58, pp. 51–75, 2015.
- [132] J. L. Tanyi, Y. Hasegawa, R. Lapushin et al., "Role of decreased levels of lipid phosphate phosphatase-1 in accumulation of lysophosphatidic acid in ovarian cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 10, Part 1, pp. 3534–3545, 2003.
- [133] J. Gierse, A. Thorarensen, K. Beltey et al., "A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 334, no. 1, pp. 310–317, 2010.
- [134] S. R. Bhave, D. Y. A. Dadey, R. M. Karvas et al., "Autotaxin inhibition with PF-8380 enhances the radiosensitivity of human and murine glioblastoma cell lines," *Frontiers in Oncology*, vol. 3, p. 236, 2013.
- [135] P.-D. St-Coeur, D. Ferguson, P. J. Morin, and M. Touaibia, "PF-8380 and closely related analogs: synthesis and structure-activity relationship towards autotaxin inhibition and glioma cell viability," *Archiv der Pharmazie*, vol. 346, no. 2, pp. 91–97, 2013.
- [136] G. Venkatraman, M. G. K. Benesch, X. Tang, J. Dewald, T. P. W. McMullen, and D. N. Brindley, "Lysophosphatidate signaling stabilizes Nrf2 and increases the expression of genes involved in drug resistance and oxidative stress responses: implications for cancer treatment," *The FASEB Journal*, vol. 29, no. 3, pp. 772–785, 2015.
- [137] N. Desroy, C. Housseman, X. Bock et al., "Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidino-1-yl)-2-oxoethyl]piperazino-1-yl]-8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]methylamino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a first-in-class Autotaxin inhibitor undergoing clinical evaluation," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 60, no. 9, pp. 3580–3590, 2017.
- [138] *Study to Assess Safety, Tolerability, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of GLPG1690*, 2017, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02738801?term=GLPG1690&rank=2>.
- [139] *Safety and Efficacy of a Lysophosphatidic Acid Receptor Antagonist in Idiopathic Pulmonary Fibrosis*, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01766817>.
- [140] *BMS-986020*, <http://bcic.biocentury.com/products/am152>.
- [141] *Proof of Biological Activity of SAR100842 in Systemic Sclerosis*, 2016, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01651143?term=SAR100842&rank=1>.
- [142] I. Nikitopoulou, E. Kaffe, I. Sevastou et al., "A metabolically-stabilized phosphonate analog of lysophosphatidic acid attenuates collagen-induced arthritis," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, article e70941, 2013.
- [143] H. Zhang, X. Xu, J. Gajewiak et al., "Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration *in vitro* and causes tumor regression *in vivo*," *Cancer Research*, vol. 69, no. 13, pp. 5441–5449, 2009.
- [144] M. Komachi, K. Sato, M. Tobo et al., "Orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis *in vivo*," *Cancer Science*, vol. 103, no. 6, pp. 1099–1104, 2012.
- [145] S. M. Schleicher, D. K. Thotala, A. G. Linkous et al., "Autotaxin and LPA receptors represent potential molecular targets for the radiosensitization of murine glioma through effects on tumor vasculature," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, article e22182, 2011.
- [146] N. Euer, M. Schwirzke, V. Evtimova et al., "Identification of genes associated with metastasis of mammary carcinoma in metastatic versus non-metastatic cell lines," *Anticancer Research*, vol. 22, no. 2A, pp. 733–740, 2002.