



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**EL PROTEOMA ASOCIADO A LA DISTINTA RESPUESTA A LA  
INHIBICIÓN DE LA SEÑAL ONCOGÉNICA EN UN PANEL DE  
CÉLULAS DE CÁNCER PANCREÁTICO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

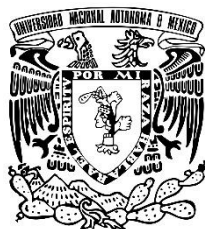
**LICENCIADO EN BIOQUIMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A :**

**ADRIÁN ABRAHAM VÁZQUEZ RODRÍGUEZ**

Director de tesis  
**DR. JUAN FRANCISCO MARTÍNEZ AGUILAR**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2022



**UNAM  
CUAUTILÁN**



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

Gracias a mis padres por su apoyo, paciencia y comprensión, que me ayudaron a acabar mis estudios y me apoyaron en todo.

Agradezco a mis amigos Jonathan, Armando, Elías y Joaquin que me soportaron la mayor parte de la carrera y me ayudaron en momentos complicados

Agradezco especialmente a mi asesor Juan Francisco por su apoyo y su paciencia fundamentales para la realización de este trabajo

Este trabajo se realizó en la Red de Apoyo a la Investigación de la UNAM

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo financiero a través del proyecto de Ciencia Básica 2017-2018 A1-S-15577

Agradezco al BQD. César Alain Aguilar Valdés por su asistencia para el cultivo de las células necesarias para poder llevar a cabo el trabajo experimental de esta tesis, así como las pruebas de viabilidad previas. Agradezco también a la Mtra. Hilda Sánchez Vidal por su asistencia técnica para el análisis proteómico por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas.

## Índice

	Página
<b>Resumen</b> .....	1
<b>1.Introducción</b> .....	2
1.1. Cáncer de páncreas.....	2
1.2. Mutación en la oncoproteína Kras.....	3
1.3. Vía Raf/MEK/ERK.....	4
1.4. Vía PI3K/Akt.....	5
1.5. Inhibición de las vías PI3K/ Akt y Raf/MEK/ERK.....	6
1.6. Proteómica.....	7
1.6.1. Proteómica del cáncer.....	7
1.6.2. Cuantificación de proteína total.....	9
1.6.3. Espectrometría de masas.....	10
1.6.4. Western blot.....	11
<b>2.Objetivos</b> .....	14
3.1. Objetivo general .....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
<b>3.Justificación</b> .....	15
<b>4.Metodología</b> .....	16
4.1. Líneas celulares.....	16
4.2. Lisis celulares.....	16
4.3. Cuantificación de proteína total.....	16
4.4. Reducción, alquilación y digestión proteolítica.....	16
4.5 Purificación de péptidos.....	17
4.6. Fraccionamiento por intercambio aniónico .....	17
4.7- Fraccionamiento en fase reversa a pH básico.....	17
4.8. Cromatografía de líquidos- Espectrometría de masas .....	18
4.9. Identificación y cuantificación relativa de proteínas.....	19
4.10. Western blot.....	21
<b>5.Resultados</b> .....	23
5.1. Comparación de los proteomas celulares mediante espectrometría de masas.....	23
de alta resolución	
5.2. Inhibición de la señalización de MEK y PI3K por los inhibidores AZD6244 y.....	30
GDC-0941	
<b>6.Análisis de resultados</b> .....	33
6.1. Inhibición de las vías de señalización Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt .....	33
6.2. El proteoma asociado a la resistencia natural.....	34
6.2.1. Nestina.....	35
6.2.2. IGF2BP2.....	36
6.2.3. LDHB.....	37
6.2.4. SLC7A5 (LAT-1).....	37
6.2.5. TIMM 50.....	38
6.2.6. Radixina.....	39
6.2.7. PAK4.....	39
6.2.8. Importina 7.....	41

6.2.9. G6PD.....	42
6.2.10. FADS2.....	43
6.2.11. Akt2.....	43
6.2.12. PDCD4 .....	44
6.2.13. Bax.....	45
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>48</b>
<b>8. Perspectivas.....</b>	<b>49</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>50</b>

## Resumen

El cáncer de páncreas es una de las enfermedades más letales, tiene una tasa de supervivencia a 5 años de solamente 3-15% y ocupa el octavo lugar con respecto a mortalidad por cáncer en México. El tratamiento de esta neoplasia consiste primordialmente en la utilización de fármacos citotóxicos entre los que gemcitabina ofrece una supervivencia media de 5.65 meses y FOLFIRINOX de 11.1 meses. Actualmente se investiga a la terapia molecular dirigida, aprovechando las bases moleculares de la enfermedad, como alternativa al uso de los agentes de quimioterapia. Las vías de señalización Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt son de especial interés en este ámbito dada su estrecha relación con la oncoproteína KRas, así como con el desarrollo y progresión de este cáncer.

En este trabajo estudiamos el proteoma asociado a la distinta respuesta a la inhibición de MEK y/o PI3K en un panel de células de cáncer pancreático. Comprobamos mediante Western blot que los fármacos AZD6244 y GDC-0941 son capaces de inhibir dichas vías de señalización en las células y averiguamos cuáles podrían ser las claves moleculares de la resistencia natural a esta inhibición de la señal oncogénica. Para ello, llevamos a cabo un análisis proteómico basado en espectrometría de masas de alta resolución con adquisición independiente de datos. Las proteínas extraídas de las células fueron sometidas a digestión proteolítica y los péptidos fueron fraccionados empleando cromatografía de fase reversa a pH básico y cromatografía de intercambio iónico, para simplificar el proteoma e identificar proteínas menos abundantes. Se cuantificaron relativamente 4 438 proteínas y se encontraron 91 proteínas diferencialmente expresadas entre las células sensibles y resistentes.

Se realizó una búsqueda exhaustiva en literatura científica para describir las probables funciones biológicas y mecanismos relacionados con la expresión de diversas proteínas, particularmente de aquellas previamente vinculadas con el cáncer de páncreas. Encontramos que el proteoma de las células resistentes posee distintas funciones que de forma general favorecen la proliferación celular y el mantenimiento de la señal oncogénica. Entre las proteínas que proponemos como posibles blancos terapéuticos se encuentran Bax por su relación con la apoptosis, FADS2 como un mediador de la plasticidad de la membrana celular, nestina y PAK4 por su asociación con la resistencia a fármacos.

## **1. Introducción**

### **1.1. Cáncer de páncreas**

El adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) representa el tumor maligno más frecuente de este órgano, seguido por tumores endocrinos [1]. Los pacientes con esta enfermedad presentan una tasa de supervivencia a 5 años muy baja, entre 3-15 % [2]. El desarrollo de ADP inicia con lesiones localizadas en los ductos pancreáticos denominadas neoplasias intraepiteliales pancreáticas, que transforman el tejido epitelial normal a invasivo mediante la evolución de dichas lesiones [3]. Este cáncer afecta principalmente a personas mayores de 50 años y existen factores de riesgo como pancreatitis crónica y hereditaria, tabaquismo y diabetes [1, 4]. Además, existen algunos desordenes hereditarios que también representan factores de riesgo, como el síndrome Peutz-Jeghers. [5]

El cáncer de páncreas es el doceavo cáncer más frecuente en el mundo ya que hubo 495 773 nuevos casos estimados en el año 2020 según el reporte más reciente de GLOBOCAN. En México se estimaron 4 985 nuevos casos en ese mismo año, ubicando a este cáncer como el treceavo más frecuente. Además, se encuentra en el séptimo lugar a nivel global con respecto al número estimado de muertes por cáncer y en México ocupa el octavo lugar debido a 4 720 muertes estimadas en 2020. La prevalencia a cinco años en México es de 4 014 casos [7]. Actualmente el único tratamiento efectivo para este cáncer es la resección quirúrgica; sin embargo, la mayoría de casos son diagnosticados en etapas avanzadas y solo el 20% de todos los casos son elegibles para cirugía, y de este grupo el 80% tiene reincidencia [5]. En el caso de los pacientes que no son elegibles para la resección se utiliza tratamiento de quimioterapia, siendo el fármaco más utilizado la gemcitabina, un análogo de ácidos nucleicos. Este ofrece una supervivencia media de 5.65 meses y se puede utilizar en conjunto con otros fármacos como erlotinib o capecitabina, que han demostrado aumentar la supervivencia a 6.24 meses y 7.1 meses, respectivamente. Recientemente se ha propuesto una mezcla de fármacos denominada FOLFIRINOX, que puede incrementar la supervivencia a 11.1 meses [8].

La baja supervivencia observada con los tratamientos actuales destaca la necesidad de buscar alternativas terapéuticas como la terapia molecular dirigida, que busca aprovechar el perfil genómico o proteómico específicos de cada cáncer para interferir con procesos como la proliferación celular, invasividad y quimiorresistencia [9]. Las vías de señalización PI3K/Akt



(*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*, 3-cinasa de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato/*protein kinase B*, cinasa B de proteínas) y de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*, cinasa de proteínas activada por mitógenos) Raf/MEK/ERK (*rapidly accelerated fibrosarcoma*, fibrosarcoma acelerado rápidamente/*mitogen-activated protein kinase kinase*, cinasa de MAPK/*extracellular signal-regulated kinase*, cinasa regulada por señales extracelulares) se encuentran estrechamente relacionadas con el desarrollo del cáncer de páncreas [10, 11] y su modulación puede constituir un enfoque terapéutico alternativo (Figura 1).

## **1.2. Mutación en la oncoproteína KRas**

Las mutaciones en la familia de proteínas RAS (*rat sarcoma virus*, virus de sarcoma de rata) representan la mayoría de las mutaciones en cáncer, con 27% de incidencia [12]. Existen tres isoformas, HRAS, NRAS y KRAS, siendo esta última la isoforma presente en la gran mayoría de los casos de cáncer pancreático (> 95 %) [13, 14]. La mutación de mayor frecuencia ocurre en el aminoácido glicina, posición 12 en la proteína, al ser sustituida por ácido aspártico o valina [6, 13]. Normalmente, cuando KRas recibe señales mitogénicas de receptores de tirosina-cinasa (RTKs, *receptor tyrosine kinases*) pasa a su forma activa unida a GTP (*guanosine triphosphate*, guanosín trifosfato), RAS-GTP, intercambiando el GDP (*guanosine diphosphate*, guanosín difosfato) por GTP mediante los factores de intercambio de nucleótidos de guanina, GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), que disminuyen la afinidad por GDP. Una vez en su estado activo, KRas interactúa con sus proteínas efectoras que regulan funciones mitogénicas y de supervivencia en la célula [15]. En principio, KRas pasa a su estado inactivo unido a GDP, RAS-GDP, por acción de las proteínas activadoras de GTPasas, GAPs (*GTPase-activating proteins*), que catalizan la hidrólisis de GTP. Sin embargo, la proteína KRas mutante permanece constitutivamente activa, unida a GTP, alterando entonces las vías de señalización celular (Figura 1) [12, 14].

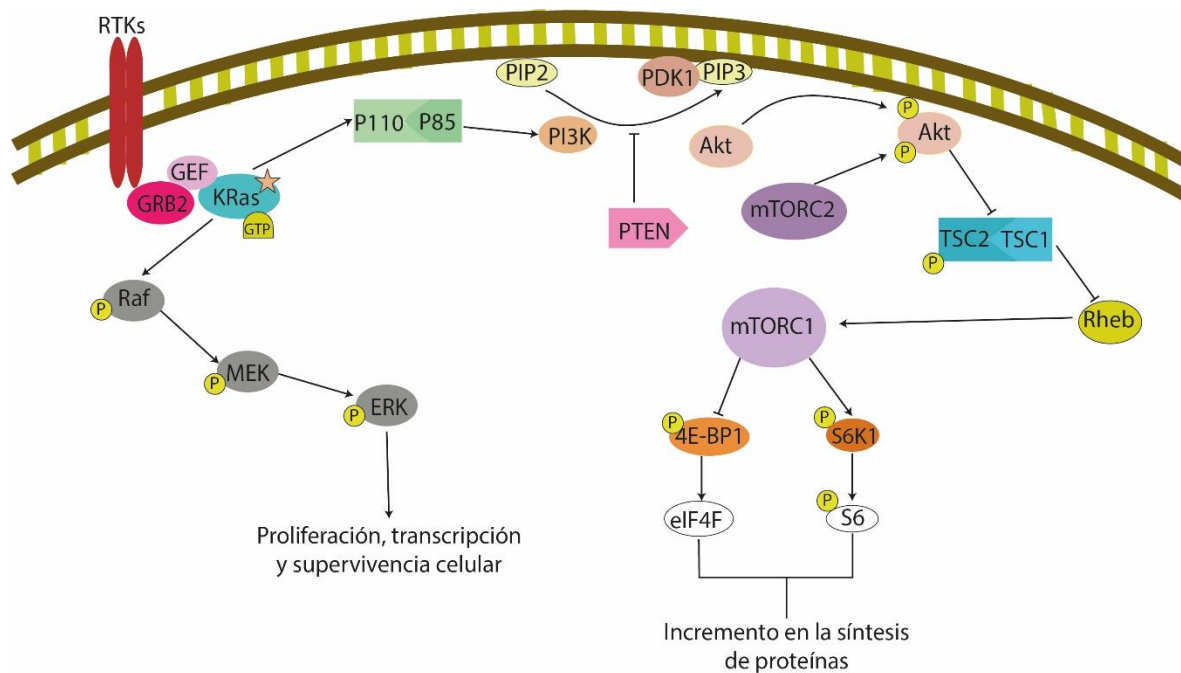


Figura 1. Vías de señalización asociadas a KRas (PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK) y sus efectos celulares.

### 1.3. Vía Raf/MEK/ERK

Otra ruta importante estimulada por KRas es la de MAPK Raf/MEK/ERK. KRas recluta a las Raf cinasas, mismas que fosforilan y activan a las cinasas MEK y estas a su vez activan a las cinasas ERK. Estas últimas tienen funciones como proliferación, diferenciación y supervivencia celular [16]. ERK puede fosforilar a Bad, lo que conlleva al secuestro de este último por proteínas 14-3-3, la formación de los heterodímeros Bcl-XL—Bax y la inhibición de la activación de Bax por regulación alostérica a través de los complejos Bad—Bcl-XL, produciendo un efecto antiapoptótico [17, 18]. También se ha observado la fosforilación de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 (*myeloid cell leukemia 1*, leucemia de célula mieloide 1) y proapoptóticas como Bim. Bim fosforilado se separa de Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1, permitiéndoles unirse a Bax u otras proteínas activadoras como Bid para prevenir sus efectos apoptóticos. ERK también fosforila a la caspasa 9 e inhibe su actividad proapoptótica [19-21].

Otra función asociada a ERK es la inducción de las ciclinas D1 y D2 a través de factores de transcripción de la familia AP-1 como c-FOS, c-Jun y Atf-2. Otros factores de transcripción activados por ERK son de la familia ETS (*E26 transformation-specific*, específica de transformación E26) y el factor de transcripción c-Myc [14, 22].

Las vías Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt presentan regulación cruzada a través de diversas proteínas [23]. Tienen un activador en común que es Ras y existe una regulación negativa de Raf por parte de Akt ya que este último puede fosforilar la región conservada CR2 del dominio regulador N-terminal de Raf e inhibir su actividad [11, 24]. Asimismo, se ha observado que ERK tiene la capacidad de fosforilar a TSC2 de manera similar a Akt [25]. Otro punto de intercomunicación entre estas vías son proteínas diana en común como Bad, procaspasa 9 y GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*, cinasa de sintasa de glucógeno 3) [19]. También se ha observado que al inhibir MEK se puede inducir la activación de Akt a través de la proteína Gab1, y de manera similar si se inhibe Akt esta ya no puede inhibir la fosforilación de Raf [26].

Al existir esta regulación entre las vías, la inhibición de una de ellas puede ser compensada mediante la activación de la otra, por lo que es importante tomar en cuenta a ambas rutas de señalización en el diseño de terapias moleculares dirigidas.

#### **1.4. Vía PI3K/Akt**

KRas puede activar la subunidad catalítica p110 de PI3K. Esta contiene dominios de unión a Ras, característicos de las proteínas efectoras de dicha proteína. Esta subunidad, en conjunto con la subunidad p85 que regula las funciones de p110, facilita la unión de PI3K con la membrana celular y cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Este proceso está regulado por la proteína supresora de tumores PTEN (*phosphatase and tensin homolog*, homólogo de fosfatasa y tensina) [27].

Akt se une a PIP3 en conjunto con PDK1 (*3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1*, cinasa 1 de proteína dependiente de 3-fosfoinosítidos). Esta cinasa fosforila y activa a Akt en el sitio T308; además, el complejo mTORC2 (*mechanistic target of rapamycin complex 2*, complejo 2 del blanco mecánico de la rapamicina) fosforila a Akt en el sitio S473 y también induce su activación [14, 28]. Akt tiene actividad sobre diversas proteínas efectoras asociadas con la regulación del ciclo celular, apoptosis y crecimiento de la célula [28]. Regula el ciclo celular mediante la inactivación de los

inhibidores de CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*, cinasa 2 dependiente de ciclina) p21 y p27. p21 es fosforilada por Akt, lo que impide su unión a CDK2 y a PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*, antígeno nuclear de células en proliferación), que incrementa la capacidad de las polimerasas en la replicación del ADN. p27 se acumula en el citoplasma al ser fosforilada y favorece la activación del complejo CDK2-Ciclina E, que promueve el avance del ciclo celular y la replicación de ADN. Akt también fosforila e inactiva a GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 beta*, cinasa de sintasa de glucógeno 3 $\beta$ ), un inhibidor de la ciclina D1 que participa en el progreso del ciclo celular. Los factores de transcripción FOXO (*forkhead box O*, caja de horquilla O) son otras proteínas diana de Akt y su inhibición incrementa la expresión de las ciclinas D1 y D2 [14].

Akt también regula la supervivencia celular mediante la inactivación factores proapoptóticos como BAD (*Bcl2-associated agonist of cell death-inductor* de muerte asociado a Bcl-2), procaspasa-9 y FOXO1 [28]. Puede además inhibir a p53, una proteína reguladora del ciclo celular, mediante la activación de su inhibidor, MDM2 [28]. Akt fosforila a TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*, complejo 2 de esclerosis tuberosa) una subunidad del complejo TSC1-TSC2, que activa a la proteína Rheb (*RAS homologue enriched in brain*, homólogo de Ras enriquecido en el cerebro), que a su vez funciona como activadora del complejo mTORC1 cuyos sustratos son S6K1 (*S6 protein kinase 1*, cinasa 1 de la proteína S6) y 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1*, proteína de unión al factor de iniciación eucariótico 4E) [29].

4E-BP1 al ser fosforilado libera al factor de inicio de la traducción eIF4E, mismo que forma parte del complejo eIF4F, importante para el proceso de traducción de ARN mensajero y por tanto de la síntesis proteica [30, 31]. S6K1 fosforila principalmente a S6, pero también a otros blancos como eIF4B, eEF2K, SKAR y PDCD4, que participan en el crecimiento, supervivencia y estructuración celular, además de tener un papel importante en la síntesis de proteínas [32, 33]. Akt también se asocia al transportador de glucosa GLUT4 (*Glucose transporter type 4*, transportador de glucosa tipo 4), lo que incrementa la entrada de nutrientes del exterior y aumenta el metabolismo celular [28].

### **1.5. Inhibición de las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK**

Existe evidencia experimental de que la regulación e interacción entre ambas vías tiene como consecuencia que su inhibición conjunta ofrece mejores resultados que los obtenidos por la inhibición de una sola de ellas [34-36]. Dos fármacos desarrollados para inhibir la señalización de

MEK y PI3K son AZD6244 y GDC-0941, respectivamente. GDC-0941 bloquea a la subunidad p110, previniendo su interacción con KRas, mientras que AZD6244 es un inhibidor ATP competitivo de MEK [35, 37]. En un estudio de fase I se observó que AZD6244 disminuyó la fosforilación de ERK en un 80% en biopsias de tumores [35].

Estudios en ratones modificados para expresar KRas mutante han demostrado un incremento en la supervivencia media utilizando un tratamiento combinado de gemcitabina e inhibidores de MEK (GDC-0973) y PI3K (GDC-0941). Adicionalmente, mediante imagenología no invasiva se observó que este tratamiento disminuyó el crecimiento tumoral temporalmente [10]. Estos resultados concuerdan con los de otros experimentos con modelos murinos utilizando los inhibidores AZD6244 (MEK) y BKM120/GDC-0941 (PI3K), donde se encontró que su administración conjunta incrementó la supervivencia media a 131.5 días con respecto a 71 días del grupo control. En este estudio se observó una disminución transitoria del crecimiento tumoral mediante resonancia magnética [36].

Un trabajo reciente demostró que las células de cáncer de páncreas PANC-1 presentan resistencia natural al tratamiento conjunto con los inhibidores AZD6244 y GDC-0941 manteniendo una viabilidad cercana al 50% en comparación con la línea celular MIA PaCa-2, que presenta una disminución de viabilidad dependiente de la concentración. Mediante un análisis proteómico se identificó al complejo PP2A (*protein phosphatase 2A*, fosfatasa 2A de proteínas) y proteínas de la cadena de transporte de electrones como potenciales blancos alternativos para inhibir la viabilidad de las células PANC-1 [34]. Con base en los estudios mencionados, podemos decir que, aunque la inhibición conjunta de las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK representa una estrategia terapéutica atractiva, existen limitaciones relacionadas con la resistencia intrínseca o adquirida de las células cancerosas, por lo que es necesario buscar nuevas dianas terapéuticas.

## **1.6. Proteómica**

### **1.6.1. Proteómica del cáncer**

Las proteínas son macromoléculas cuyas funciones en la célula incluyen transporte, almacenamiento, catálisis, recepción y transmisión de señales, algunas tienen un rol estructural y otras como los anticuerpos participan en la respuesta inmunitaria [38]. El proteoma es el conjunto total de proteínas presentes en una determinada célula o grupo de células en un momento dado, y su estudio nos puede ayudar a comprender mejor los procesos moleculares implicados en

enfermedades como el cáncer. El proteoma difiere entre tipos celulares, etapas de desarrollo, así como estímulos externos, por lo que estados biológicos distintos presentan proteomas diferentes [39]. El proteoma humano está comprendido por aproximadamente 20 000 proteínas no modificadas (canónicas), pero tomando en cuenta la existencia de eventos moleculares como el empalme alternativo, polimorfismos y modificaciones postraduccionales, el número total de proteínas crece exponencialmente [40].

El análisis proteómico basado en espectrometría de masas puede aportar información relevante para el estudio del cáncer. El conocimiento del proteoma permite, por ejemplo, caracterizar y clasificar los distintos tipos de cáncer con base en alteraciones moleculares, descubrir nuevos biomarcadores para una mejor detección temprana y monitorear los actuales tratamientos e identificar proteínas implicadas en la resistencia a fármacos [41].

La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO, *American Society of Clinical Oncology*) ha publicado recomendaciones de tratamientos para cada etapa en cáncer de páncreas, mismos que incluyen a gemcitabina y FOLFIRINOX. Sin embargo, como se mencionó en el punto 1.1, es necesario buscar alternativas terapéuticas que incrementen la supervivencia ya que, como se muestra en la Tabla 1, la gran mayoría de los resultados subrayan la ineficacia de los tratamientos combinados con gemcitabina, el agente de quimioterapia actual [42].

Tabla 1. Ensayos clínicos de terapias dirigidas en cáncer de páncreas. Tomado de [42].

Proteína diana	Terapia	No. de pacientes	Supervivencia (meses) Terapia vs quimioterapia
ErbB2	Trastuzumab	44	4.6 vs 5.4
Gastrina	Gastrazol + 5-FU	98	3.6 vs 4.2
mTOR	Gemcitabina + Everolimus	29	4.5 vs 6.5
PI3K/PLK	Gemcitabina + Rigosertib	106	6.1 vs 6.4
Sonic Hedgehog	Gemcitabina + Vismodegib	106	6.9 vs 6.1
Notch3	Gemcitabina + IPI-929	122	No tolerada
IGF1-R	Gemcitabina + Ganitumab	800	7.0 vs 7.2
MMP	Gemcitabina + Matrimastat	239	5.4 vs 5.4
JAK/STAT	Ruxolitinib + Capecitabin	127	4.5 vs 4.2
MEK1/ERK1/2	Selumetinib vs Capecitabina	38	5.3 vs 4.9

La terapia molecular dirigida ofrece oportunidades de encontrar nuevas estrategias terapéuticas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, algunas células de cáncer de páncreas son

intrínsecamente resistentes a la inhibición de la señal oncogénica mediante la inhibición de MEK o PI3K. El análisis proteómico puede facilitar el descubrimiento de nuevas dianas o blancos terapéuticos [42]. Un ejemplo de ello es el trabajo de Aguilar-Valdés *et al.*, que descubrieron proteínas asociadas a la resistencia natural a la inhibición conjunta de MEK y PI3K mediante la aplicación de espectrometría de masas con adquisición de datos en modo independiente de información y libre de marcación (*label-free*) [34]. En otro estudio se investigó el mecanismo de interacción de las células PANC-1 a un tratamiento combinado de birinapant y paclitaxel, empleando espectrometría de masas para conocer el proteoma asociado [43].

### **1.6.2 Cuantificación de proteína total**

La cuantificación de proteína total es necesaria para trabajar con una cantidad conocida y comparable de proteínas entre muestras de extractos celulares. Los métodos más comúnmente utilizados para esta determinación son colorimétricos, basados en la absorción de luz visible después de hacer reaccionar a las proteínas con diversos compuestos y comparar la absorbancia con la de un estándar de concentración conocida [44, 45]. El método de Bradford, por ejemplo, consiste en el uso del colorante azul brillante de Coomassie G-250, que se une en condiciones ácidas a residuos de arginina, histidina, fenilalanina, triptófano y tirosina; esta unión genera un cambio metacromático en su espectro visible de 465 a 595 nm al estabilizarse en su forma aniónica [46]. Este ensayo tiene limitaciones como el no poder unirse a proteínas con masa menor a 3000 Da y unirse primordialmente a arginina, con la posibilidad de errores en muestras con altos porcentajes de este aminoácido [45]. Otro método colorimétrico es el de Lowry, basado en la formación de complejos iónicos de cobre al reducirlo en medio básico seguido de la reducción del complejo Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungsteno), que es entonces visible dentro del intervalo de 500-700 nm. Este método presenta interferencias en presencia de detergentes, carbohidratos, glicerol, tricina, EDTA, Tris, complejos de potasio y azufre, ácido úrico, magnesio y calcio [44]. El método del ácido bicinónico (BCA, *bicinchoninic acid*) es similar al método de Lowry ya que también depende de la reducción de cobre, pero posee la ventaja de que el BCA es estable en medio alcalino, lo que permite realizar esta reacción en un único paso [47]; en este caso el BCA sustituye al complejo Folin-Ciocalteu [44]. El BCA en conjunto con el cobre forman complejos con cisteína, cistina, triptófano y tirosina que son visibles en la longitud de onda de 562nm [44, 45]. A pesar de seguir existiendo interferencias con sustancias como el EDTA y la composición de aminoácidos de

las proteínas, es preferible el uso de esta técnica sobre la de Lowry ya que el número de sustancias que interfieren con la reacción es menor, tiene mayor sensibilidad, sus reactivos son menos tóxicos y presenta menor interferencia por parte de detergentes [45].

### **1.6.3. Espectrometría de masas**

Una de las herramientas más útiles para el estudio del proteoma es la espectrometría de masas. Esta es una técnica que mide la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los péptidos mediante su ionización y paso por un analizador de masas, generando espectros con información sobre la abundancia de cada ion así como valores  $m/z$  de iones fragmento, que después son analizados para la identificación de proteínas y su cuantificación [39].

Los métodos de análisis proteómico basado en espectrometría de masas pueden funcionar de dos maneras: de forma dependiente de datos (IDA, *information dependent acquisition*) o independiente de datos (SWATH, *Sequential Window Acquisition of all Theoretical fragment ion spectra*, adquisición de ventanas secuenciales de todos los espectros teóricos de iones fragmento). En la adquisición de tipo IDA, se lee la relación  $m/z$  de los iones precursores (espectro MS) y a partir de estos se seleccionan los más abundantes para su fragmentación; los espectros de masas MS/MS generados muestran la intensidad y valor  $m/z$  de cada ion fragmento. En este tipo de adquisición, los espectros MS/MS se utilizan para llevar a cabo la asignación de identidad de los iones precursores, es decir, de los péptidos y por tanto de las proteínas [41, 48].

En la adquisición de tipo SWATH los iones precursores son leídos en ventanas de  $m/z$  variable, lo que teóricamente asegura la inclusión de todos los iones en un intervalo  $m/z$  determinado. Posteriormente, estos iones son fragmentados y se registran las áreas de pico cromatográficas de los iones fragmento. Sin embargo, para poder conocer la identidad de los picos es necesario recurrir a una biblioteca espectral preparada mediante adquisición de tipo IDA. Es decir, se correlacionan los valores  $m/z$  de los iones fragmento con los que aparecen en tal biblioteca, además de tomar en cuenta los tiempos de retención ( $t_r$ ). La coincidencia entre los valores  $m/z$  y  $t_r$  de la biblioteca y los experimentales obtenidos mediante SWATH resulta en la identificación de los péptidos, mientras que las áreas de los picos cromatográficos se utilizan para el análisis cuantitativo relativo de las proteínas [41, 48] (ver Figura 2).



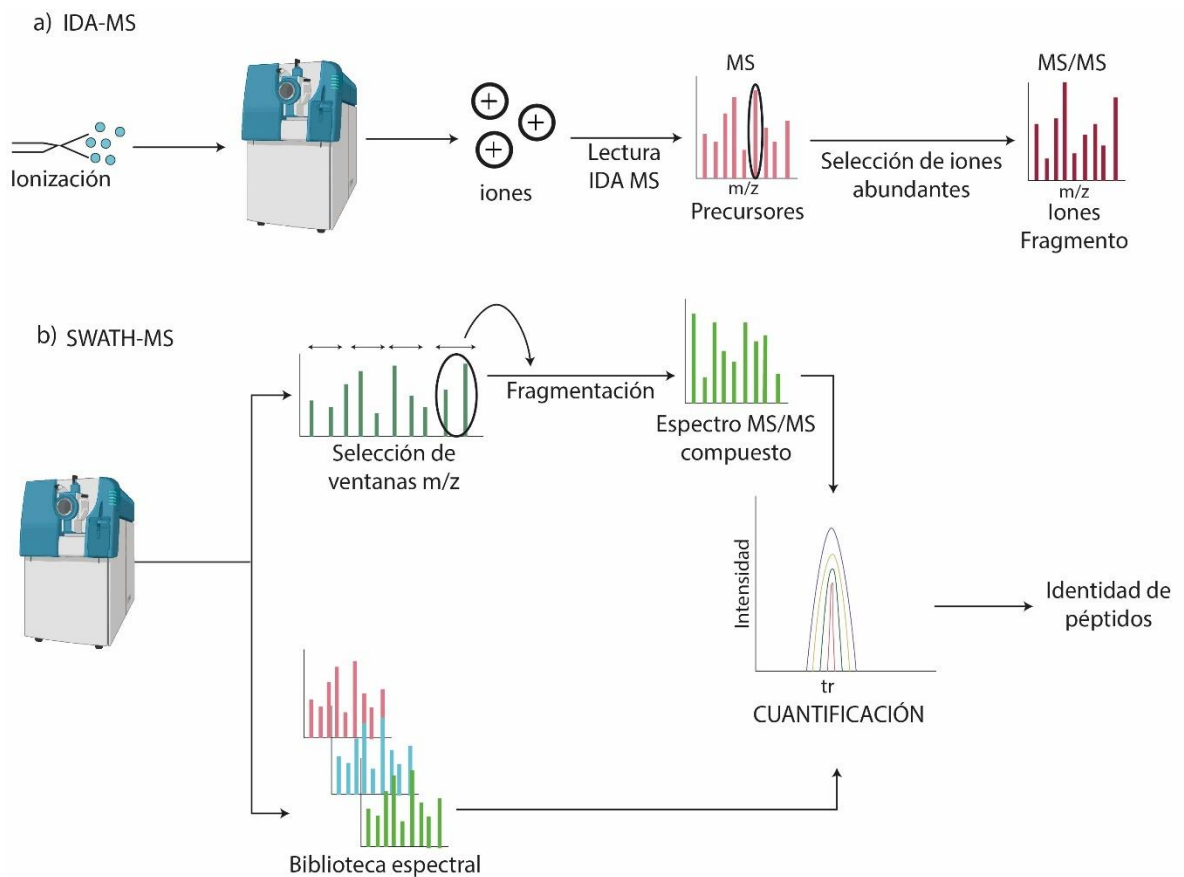


Figura 2. Metodología SWATH

- a) Mediante la ionización de las muestras utilizando adquisición tipo IDA se seleccionan los iones más abundantes y se generan espectros MS/MS a partir de iones precursoros individuales
- b) El método SWATH utiliza ventanas m/z para generar un espectro MS/MS compuesto, que en conjunto con una biblioteca espectral y las áreas de pico cromatográficas sirven para identificación y cuantificación relativa de proteínas

#### 1.6.4. Western blot

El Western blot es una técnica semi-cuantitativa que permite detectar proteínas y modificaciones post-traduccionales por inmunofinidad [49]. El procedimiento inicia con la extracción de proteínas de una muestra biológica, que debe llevarse a cabo con cuidado para conservar la integridad de las mismas y evitar la introducción de interferencias [50, 51]. En el siguiente paso se realiza la separación por electroforesis, generalmente empleando geles de poliacrilamida y un buffer de carga

con dodecilsulfato de sodio; aquí es importante conocer la cantidad de proteína que se va a separar por cuantificación previa de proteína total [50]. Una vez que las proteínas han sido separadas en el gel por su tamaño es necesario transferirlas a un soporte fijo, que puede ser una membrana de nitrocelulosa o de polifluoruro de vinilideno; cada tipo de material requiere de un tratamiento particular y permite transferir cierta cantidad de proteína [52]. La transferencia ocurre por aplicación de un campo eléctrico y se puede realizar de dos formas: húmeda, donde un casete con dos soportes, dos piezas de papel filtro, la membrana y el gel, es sumergido totalmente en buffer de transferencia; la otra opción es simplemente empapar el papel filtro, membrana y gel con el buffer, lo que se denomina transferencia semi-seca. El método, buffer, composición del gel, voltaje utilizado y tiempo de transferencia varían según las necesidades por el tipo y diferentes tamaños de las proteínas [52]. El siguiente paso es el bloqueo de la membrana, comúnmente con albúmina sérica bovina o leche descremada, para prevenir la unión de los anticuerpos primarios de forma inespecífica a la membrana [51]. Tras el bloqueo la membrana se incuba con anticuerpos contra las proteínas de interés (anticuerpos “primarios”) y aquellos que se han unido a tales proteínas son detectados empleando un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario) que se une al anticuerpo primario y está conjugado con una enzima capaz de generar una señal de quimioluminiscencia por reacción con un sustrato como luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) y un agente oxidante; la enzima de mayor uso es la peroxidasa de rábano (ver Figura 3) [53, 54].

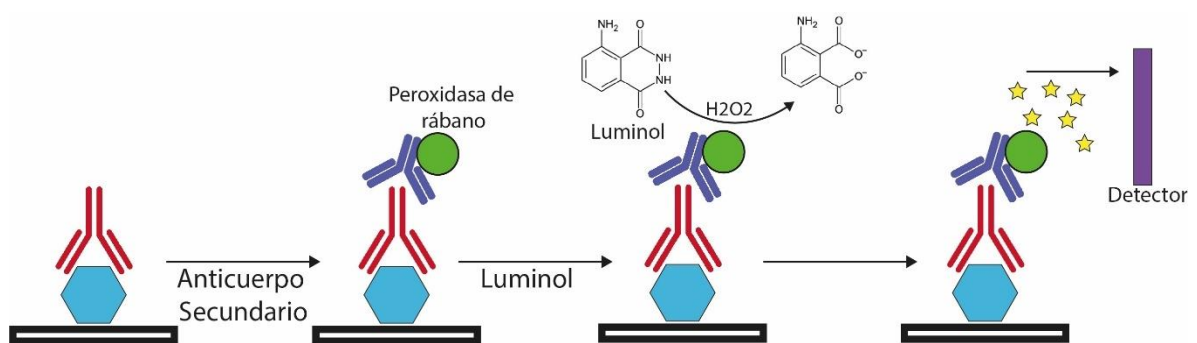


Figura 3. Un anticuerpo primario se une a la proteína de interés en la membrana. Después, un anticuerpo secundario que lleva la enzima peroxidasa de rábano se une al anticuerpo primario y por reacción con luminol y peróxido de hidrógeno se producen fotones que son finalmente detectados

Otra forma de detección es mediante fluorescencia, utilizando anticuerpos secundarios conjugados con compuestos fluoróforos, que pasan a un estado electrónico excitado por absorción de luz y emiten fotones en cierta longitud de onda al regresar al estado basal; dentro de los fluoróforos más comunes se encuentran el isotiocianato de fluoresceína y derivados de rodamina [55]. La detección por fluorescencia permite ensayos multiplexados y posee un intervalo dinámico amplio. La relativa facilidad y robustez del Western blot han favorecido su amplia aplicación y lo han convertido en una herramienta importante para el análisis de proteínas [50].

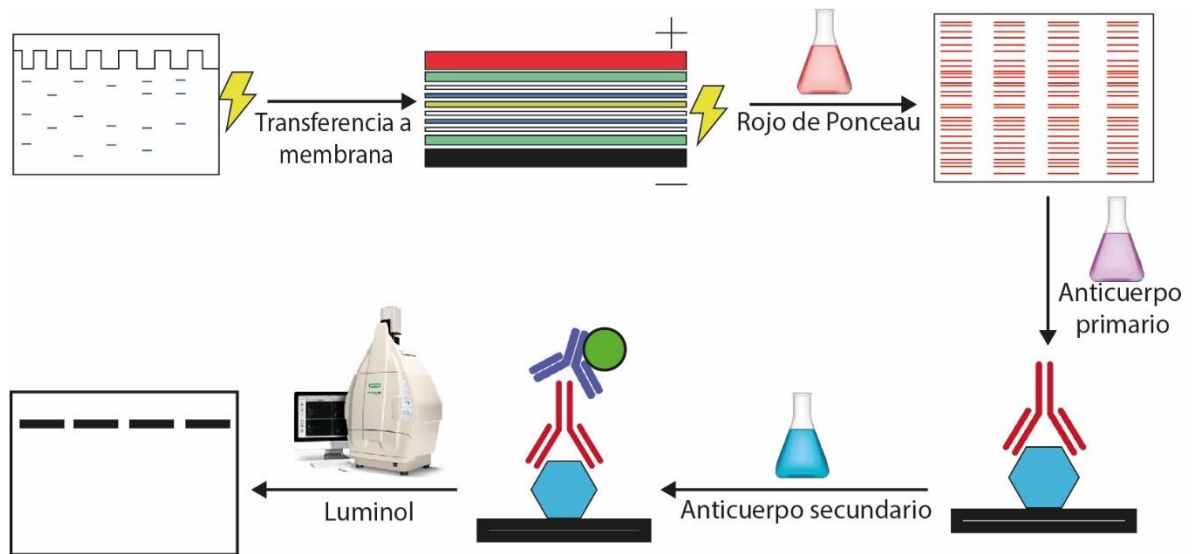


Figura 4. Metodología de Western Blot

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Conocer las diferencias en el proteoma de un panel de células de cáncer de páncreas sensibles y resistentes a la inhibición de la señal oncogénica

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Investigar la composición de los proteomas de células de cáncer de páncreas naturalmente sensibles (MIA PaCa-2, Panc 05.04 y AsPC-1) y resistentes (PANC-1 y Su 86.86) a la inhibición de MEK y/o PI3K mediante espectrometría de masas de alta resolución
2. Verificar la inhibición de la señalización de las cinasas MEK y/o PI3K por los inhibidores AZD6244 y GDC-0941
3. Analizar las diferencias de expresión de proteínas entre las células sensibles y resistentes a la inhibición de MEK y/o PI3K con base en los resultados obtenidos en el objetivo 1
4. Plantear los posibles mecanismos moleculares y proteínas diana asociados a la resistencia natural a la inhibición de la señal oncogénica en células de cáncer de páncreas

### **3. Justificación**

El cáncer de páncreas es actualmente el séptimo tipo de cáncer con mayor mortalidad en el mundo y posee una tasa de supervivencia a 5 años muy baja. Su principal alteración molecular oncogénica consiste en mutaciones activadoras en la proteína KRas, que se encuentra estrechamente relacionada con las vías de señalización Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt, promotoras de la proliferación y supervivencia celular y por consecuencia del crecimiento y desarrollo de esta neoplasia.

La inhibición de dichas vías de señalización representa una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad. Ciertamente, el tratamiento con fármacos inhibidores de las cinasas MEK (AZD6244) y PI3K (GDC-0941) ha demostrado un efecto antiproliferativo en modelos murinos y algunas líneas celulares de cáncer de páncreas. Sin embargo, existen células naturalmente resistentes a esta terapia dirigida. El estudio del proteoma de un panel de células de cáncer pancreático permitirá aportar información sobre los mecanismos generales involucrados en la resistencia e identificar nuevas posibles proteínas diana para mejorar el tratamiento de este cáncer.

## **4. Metodología**

### **4.1. Líneas celulares**

Se analizaron las líneas celulares MIA PaCa-2, AsPC-1, Panc 05.04, Su 86.86 y PANC-1, previamente cultivadas y recolectadas. Se sabe que las células MIA PaCa-2, Panc 05.04 y AsPC-1 son sensibles a la inhibición de MEK y las células PANC-1 y Su 86.86 son resistentes a dicho tratamiento. Las células PANC-1 son además resistentes a la inhibición de PI3K [34, 56, 57].

### **4.2. Lisis celular**

Las células fueron resuspendidas en buffer de desoxicolato de sodio al 1% y bicarbonato de trietilamonio 100 mM, con ayuda de calentamiento durante 5 min a 95°C y agitación con vórtex cada 2.5 min. Posteriormente se añadieron aproximadamente 0.5 µl de benzonasa 10 kU y se mantuvieron con este tratamiento durante una hora o hasta eliminar la viscosidad. El lisado celular se centrifugó a 15 000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante (ver Figura 5).

### **4.3. Cuantificación de proteína total**

El contenido de proteína total se determinó mediante el método del ácido bicinonínico utilizando el kit comercial *Pierce BCA Protein assay kit* de ThermoFisher. Para ello se preparó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones de 0.125 mg/mL a 2 mg/mL. Los estándares de albúmina y las muestras de los extractos de proteínas se diluyeron y colocaron en una microplaca de 96 pozos y se adicionaron 200 µl de una disolución de reactivo A (bicarbonato y carbonato de sodio, ácido bicinonínico, tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1M) y reactivo B (sulfato de cobre 4% p/v) en proporción 50:1 de A:B. Las diluciones de los estándares y de las muestras se colocaron por triplicado en la microplaca y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 562 nm. Se prepararon alícuotas de las muestras y se guardaron a -80°C hasta su uso.

### **4.4. Reducción, alquilación y digestión proteolítica**

Los extractos de proteína se trataron con ditioneitol (DTT) 10 mM por 30 minutos a 60°C, posteriormente se añadió iodoacetamida (IAA) 25 mM para incubar por 30 minutos en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo se empleó nuevamente DTT 10 mM durante 20 minutos a

temperatura ambiente y finalmente se añadió tripsina grado secuenciación en proporción 1:50  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  y la digestión se realizó durante la noche (aproximadamente 16 h) a 37°C (ver Figura 5).

#### **4.5. Purificación de péptidos**

La muestra se acidificó con ácido fórmico (AF) 1% v/v, se centrifugó a 15 000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante. Este se diluyó con una disolución de 2% acetonitrilo (ACN)/1% AF v/v. Para la purificación de los péptidos se preparó una microcolumna con microdiscos Empore 3M C18, acondicionada con las siguientes disoluciones en el orden indicado: 70  $\mu\text{l}$  metanol, 70  $\mu\text{l}$  80% ACN/1% AF v/v, 70  $\mu\text{l}$  2% ACN/1% AF v/v. La muestra se cargó en la microcolumna y se hizo pasar de nueva cuenta la disolución 2% ACN/1% AF antes de eluir los péptidos con 70  $\mu\text{l}$  de una disolución 65% ACN/1% AF v/v en un microtubo. Las muestras se secaron con vacío en una centrifuga SpeedVac y se almacenaron -80°C hasta su uso.

#### **4.6. Fraccionamiento por intercambio aniónico**

Se combinaron alícuotas de las distintas líneas celulares para obtener una muestra representativa general. Los péptidos de esta muestra fueron purificados y secados. Se preparó una microcolumna con 15 microdiscos Empore 3M de intercambio aniónico, que fue acondicionada con 100  $\mu\text{l}$  de metanol, 100  $\mu\text{l}$  NaOH 1M y 100  $\mu\text{l}$  de buffer pH 11. La muestra fue resuspendida en buffer universal Britton & Robinson a pH 11, se cargó en la microcolumna y se recolectaron seis fracciones correspondientes a la elución con buffer de pH 11, 8, 6, 5, 4 y 3, respectivamente. Cada fracción fue purificada en microcolumna con discos C18, secada en vacío y guardada a -80 °C hasta su análisis.

#### **4.7. Fraccionamiento en fase reversa a pH básico**

Se utilizó el kit comercial *Pierce high pH reversed-phase peptide fractionation kit* de ThermoFisher, siguiendo las especificaciones del fabricante. La microcolumna fue lavada dos veces con 300  $\mu\text{l}$  de ACN y dos veces con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% v/v. Se cargó una segunda muestra representativa como la del punto 4.5, resuspendida en 300  $\mu\text{l}$  de TFA 0.1% v/v, se realizó un lavado con 300  $\mu\text{l}$  de agua y se procedió al fraccionamiento por adición de 300  $\mu\text{l}$  de cada una de las disoluciones indicadas en la Tabla 2. Las fracciones fueron secadas y guardadas a -80 °C hasta su análisis.

Tabla 2. Composición del eluyente para cada fracción empleando microcolumna de fase reversa

N° fracción	ACN/ $\mu$ l	Trietilamina/ $\mu$ l
1	50	950
2	75	925
3	100	900
4	125	875
5	150	850
6	175	825
7	200	800
8	500	500

#### 4.8. Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas

Las muestras se resuspendieron en disolución 2% ACN/0.1% TFA v/v y se inyectaron en un cromatógrafo de líquidos Eksigent nanoLC 425 utilizando un sistema de gradiente binario compuesto por disolvente A (0.1% AF/2% ACN/97.9% agua) y B (99.9% ACN/0.1% AF). Los péptidos fueron primero cargados en una precolumna ChromXP C18CL 300  $\mu$ m id x 10 mm x 5  $\mu$ m con velocidad de flujo de 10  $\mu$ l/min durante 3 min utilizando disolvente A, y después se separaron con una columna ChromXP C18 0.3 mm id x 150 mm x 3  $\mu$ m con velocidad de flujo de 5  $\mu$ l/min, siguiendo el gradiente mostrado en la Tabla 3:

Tabla 3. Gradiente cromatográfico para la separación de péptidos

Tiempo (min)	% A	% B
0	97	3
68	75	25
73	65	35
75	20	80

El cromatógrafo de líquidos estaba acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución AB Sciex TripleTOF 5600+, con fuente de ionización por electrospray.

Las fracciones obtenidas según lo mencionado en los puntos 4.5 y 4.6 se analizaron por espectrometría de masas para identificar las proteínas y construir una biblioteca espectral (ver punto 1.6.3). En este caso la adquisición de datos se realizó mediante análisis de tipo IDA (Figura 2-a), con los siguientes parámetros:



Ion precursor (TOF MS): Intervalo de m/z: 350-1250, tiempo de acumulación: 250 ms

Fragmentación (*product ion*): Intervalo de m/z: 100-1500 m/z, tiempo de acumulación: 50 ms

Modo: Alta sensibilidad

Adquisición de iones: intervalo de m/z: 350-1250, carga: 2+a 5+, cps mínimo: 150, tolerancia: 100 ppm, número de iones por ciclo:30, tiempo de exclusión: 15s, energía de colisión dependiente de m/z: activado

Tres réplicas biológicas de las muestras preparadas siguiendo los puntos 4.3 y 4.4 se analizaron por espectrometría de masas empleando adquisición de tipo SWATH (Figura 2-b y Figura 5), con el propósito de contar con datos cuantitativos. El sistema cromatográfico fue el mismo que en el caso de adquisición IDA, y los datos se obtuvieron en 100 ventanas de m/z variable con un intervalo de 100-1500 m/z para MS/MS.

#### **4.9. Identificación y cuantificación relativa de proteínas**

Los resultados obtenidos mediante adquisición IDA fueron procesados con el software ProteinPilot 5.0.1 para construir la biblioteca espectral. La identificación de proteínas se realizó con ayuda de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot correspondiente al proteoma de *Homo sapiens*, considerando péptidos modificados por carbamidometilación de cisteína y restringiendo los resultados a aquellas proteínas con nivel de confianza mayor a 95% (*unused score* mayor a 1.3). Por otra parte, los datos provenientes de la adquisición en modo SWATH (Figura 5) fueron procesados con el software *SWATH acquisition microapp* en PeakView 2.1. La asignación de identidad de los picos se llevó a cabo con un nivel de confianza mínimo de 99%, proporción de falsos positivos <1% y los siguientes parámetros de procesamiento:

Tolerancia: 75 ppm

Ventana de tiempo de retención: 10 min

Exclusión de péptidos modificados excepto carbamidometilación

Exclusión de péptidos compartidos

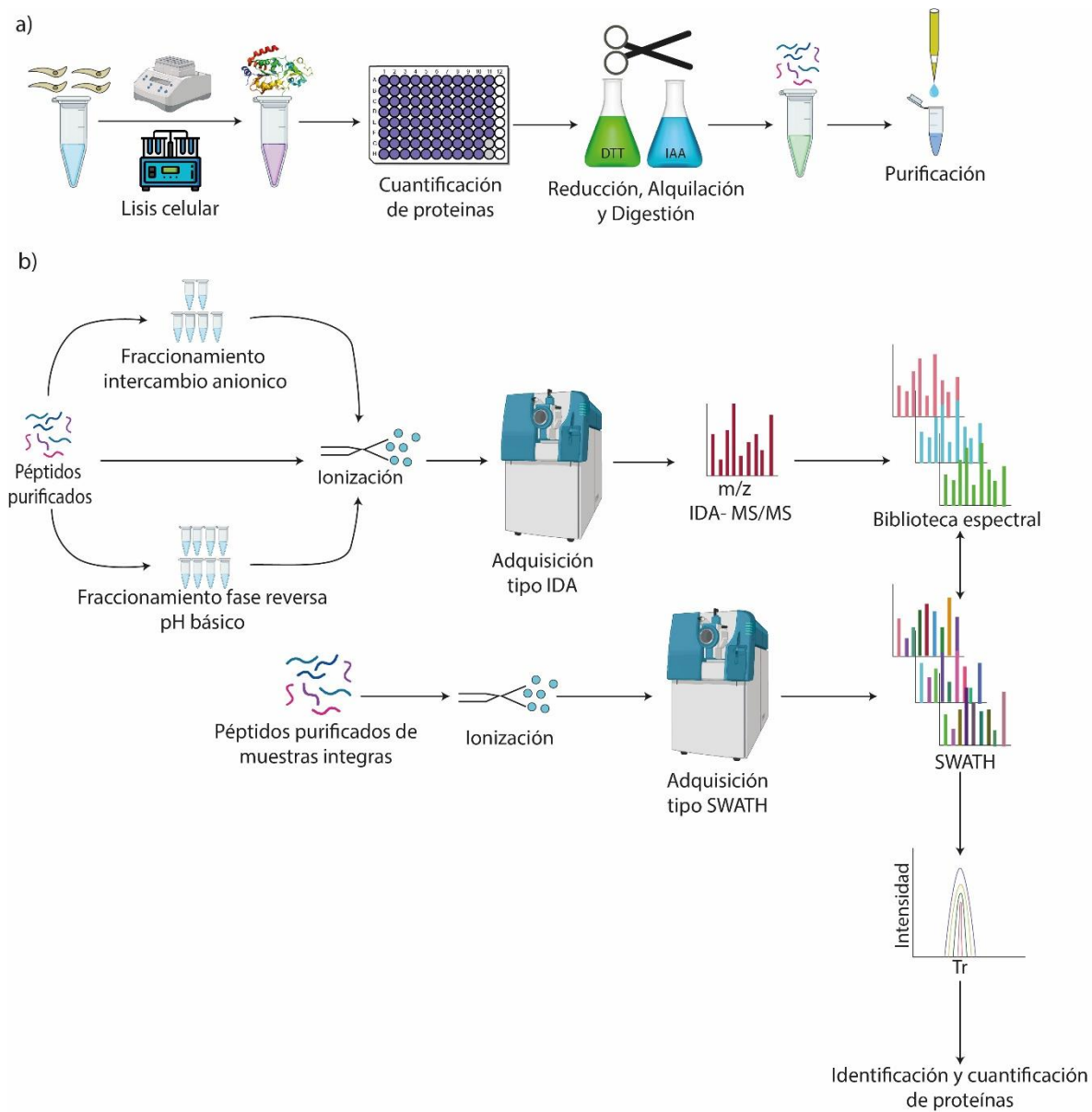


Figura 5. Metodología experimental para el análisis proteómico por espectrometría de masas

a) Procesamiento de la muestra para la obtención de péptidos purificados

b) Preparación de la biblioteca espectral mediante adquisición en modo IDA, identificación y cuantificación de péptidos mediante análisis SWATH

Las áreas de pico correspondientes a los péptidos fueron consolidadas para la lista total de proteínas cuantificadas e importadas al software Perseus 1.6.1.3. Los valores de área fueron transformados con el logaritmo base 2 y normalizados por sustracción de la mediana. La identificación de las proteínas diferencialmente expresadas se realizó mediante una prueba t de Student de dos lados complementada con prueba de permutaciones guiada por tasa de falsos positivos máxima de 5% ( $q < 0.05$ ). Se consideraron solo proteínas con dos o más péptidos cuantificados y un cambio de abundancia relativa  $-1 \geq \log_2(\text{diferencia de abundancia}) \geq 1$ .

#### **4.10. Western blot**

Para evaluar la inhibición de la señalización de MEK/PI3K por los inhibidores AZD6244 y GDC-0941, las células sensibles AsPC-1 y resistentes PANC-1 fueron sometidas a tratamiento con concentraciones correspondientes a la concentración inhibitoria media (CI50) de cada fármaco de forma individual y en combinación [34] antes de proceder a la lisis celular y cuantificación de proteína total (ver puntos 4.1 y 4.2). A una alícuota de 20 µg de proteína se le adicionó DTT 50 mM y se calentó a 70°C por 10 min. Después se mezcló con buffer de carga (dodecilsulfato de litio, NuPAGE LDS) y agua para tener un volumen total de 15 µl. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida Bolt Bis-Tris 4-12% dispuesto en una cámara de electroforesis con buffer NuPAGE MOPS. La separación se llevó a cabo a 200 V durante 30 minutos hasta que el frente de corrida alcanzó la parte final del gel. Entonces las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Bio-Rad de 0.45 µm de tamaño de poro utilizando buffer de transferencia (Tris 20 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v, pH 8.3), durante 1 h a 10 V.

La membrana se tiñó con rojo de Ponceau durante 5 minutos en agitación para verificar la correcta transferencia e igualdad de carga de proteínas por carril. El rojo de Ponceau se eliminó lavando la membrana tres veces con buffer Tris salino (TBS, *Tris-buffered saline*) durante 5 minutos en agitación y se prosiguió al bloqueo con BSA al 4% p/v a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se realizaron tres lavados con TBS conteniendo 0.1% de Tween 20 (TBST) durante 5 min en agitación. La membrana se incubó durante la noche a 4° C con anticuerpos primarios de conejo del fabricante *Cell Signaling Technology*, diluidos en TBST de acuerdo con la Tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos usados en Western blot.  
Fosfoproteínas indicadas con el prefijo “p” y proteína total  
con “t”.

No. de catalogo	Antígeno reconocido	Dilución
4060	p-Akt (Ser473)	1:1400
4691	t-Akt	1:1400
9101	p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	1:1400
4695	t-ERK	1:2800
9451	p-4E-BP1 (Ser65)	1:1400
9644	t-4E-BP1	1:2000
4856	P-S6 (Ser235/Ser236)	1:2000
2217	t-S6	1:2000
7074	Anticuerpo conjugado con HRP, anti-IgG de conejo	1:20000

Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados con TBST durante 5 min en agitación para mantener la membrana con el anticuerpo secundario en TBST durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados con TBST durante 5 min en agitación y un último lavado con TBS por 5 min. Para la detección de las proteínas se añadió una disolución 1:1 de luminol y peróxido del kit *Clarity Western ECL Substrate* de Bio-Rad. La lectura de quimioluminiscencia se realizó con el equipo ChemiDoc de Bio-Rad.

## 5. Resultados

### 5.1. Comparación de los proteomas celulares mediante espectrometría de masas de alta resolución

El procesamiento de las cinco líneas celulares y sus fracciones mediante el método SWATH permitió la creación de una biblioteca espectral compuesta por 5 466 proteínas. Utilizando esta biblioteca se cuantificaron relativamente 4 438 proteínas, considerando una razón de cambio mayor o igual a dos,  $q < 0.05$  y proteínas con al menos dos péptidos cuantificados.

Se encontraron 91 proteínas diferencialmente expresadas, de las cuales 37 estuvieron subexpresadas y 54 sobreexpresadas en las células naturalmente resistentes a la inhibición de MEK y/o PI3K, con respecto a las células sensibles. En la Tabla 5 se listan las proteínas ordenadas de acuerdo con la diferencia en abundancia relativa, iniciando con las proteínas con mayor expresión.

Tabla 5. Lista de proteínas diferencialmente expresadas

No. Acceso Uniprot	Nombre de proteína	Gen	q (-log10)	Diferencia (Resistentes – Sensibles)
P80723	Brain acid soluble protein 1	BASP1	2.06E-03	4.49
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	9.41E-04	3.71
Q3ZCQ8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIMM50	TIMM50	0.00E+00	2.95
Q9C002	Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	NMES1	1.54E-02	2.83
O95864	Acyl-CoA 6-desaturase	FADS2	0.00E+00	2.78
P48681	Nestin	NES	0.00E+00	2.72
P46821	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	0.00E+00	2.56
Q5PRF9	Protein Smaug homolog 2	SAMD4B	1.52E-03	2.5
Q9NP81	Serine--tRNA ligase, mitochondrial	SARS2	1.39E-03	2.48
P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	1.98E-02	2.31
Q14527	Helicase-like transcription factor	HLTF	9.23E-04	2.16
Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	SLC7A5	4.51E-02	2.1
Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B	FNDC3B	2.00E-02	2.01
P35241	Radixin	RDX	1.98E-02	1.93
P35080	Profilin-2	PFN2	4.16E-02	1.93
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1	8.89E-04	1.91
P17812	CTP synthase 1	CTPS1	2.74E-02	1.89
Q03518	Antigen peptide transporter 1	TAP1	8.00E-03	1.82
O96013	Serine/threonine-protein kinase PAK 4	PAK4	1.00E-03	1.82
O15230	Laminin subunit alpha-5	LAMA5	8.13E-03	1.76
Q16625	Occludin	OCLN	2.00E-02	1.74

O00267	Transcription elongation factor SPT5	SUPT5H	1.09E-03	1.71
Q12913	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	PTPRJ	2.58E-02	1.71
P31751	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	AKT2	3.61E-02	1.67
Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	IGF2BP2	6.49E-03	1.61
Q13636	Ras-related protein Rab-31	RAB31	4.26E-02	1.59
Q99426	Tubulin-folding cofactor B	TBCB	3.93E-02	1.58
P02649	Apolipoprotein E	APOE	2.99E-02	1.56
Q92734	Protein TFG	TFG	2.63E-03	1.46
Q7Z4H8	Protein O-glucosyltransferase 3	POGLUT3	9.02E-03	1.44
Q9UBM7	7-dehydrocholesterol reductase	DHCR7	1.66E-03	1.4
Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13	HM13	5.83E-03	1.37
Q9UHD1	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	CHORDC1	1.90E-02	1.34
P11047	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	6.72E-03	1.33
Q96959	Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial	GFM2	0.00E+00	1.33
Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1	0.00E+00	1.32
Q9UBX3	Mitochondrial dicarboxylate carrier	SLC25A10	9.25E-03	1.3
P48163	NADP-dependent malic enzyme	ME1	1.35E-02	1.29
P46939	Utrophin	UTRN	1.43E-02	1.27
P78344	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	EIF4G2	8.57E-04	1.25
O95373	Importin-7	IPO7	3.04E-02	1.25
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog	SEC63	1.20E-03	1.24
Q9NPL8	Complex I assembly factor TIMMDC1, mitochondrial	TIMMDC1	4.32E-02	1.15
O43491	Band 4.1-like protein 2	EPB41L2	3.54E-03	1.13
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	IGF2R	3.80E-03	1.12
P22087	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	FBL	1.73E-03	1.12
Q9Y320	Thioredoxin-related transmembrane protein 2	TMX2	3.47E-02	1.11
P29144	Tripeptidyl-peptidase 2	TPP2	4.98E-02	1.09
Q6UB35	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	MTHFD1L	4.03E-02	1.09
Q10471	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	GALNT2	2.71E-02	1.09
P33897	ATP-binding cassette sub-family D member 1	ABCD1	1.98E-02	1.08
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	RAB1B	4.31E-02	1.05
O43663	Protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	3.53E-03	1.01
Q15437	Protein transport protein Sec23B	SEC23B	6.46E-03	1.01
Q8IZ83	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	ALDH16A1	3.42E-02	-1.06
O43504	Ragulator complex protein LAMTOR5	LAMTOR5	3.59E-03	-1.08
P25325	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	MPST	8.89E-04	-1.1
P18615	Negative elongation factor E	NELFE	3.15E-02	-1.16
Q7Z434	Mitochondrial antiviral-signaling protein	MAVS	1.38E-02	-1.17
P56134	ATP synthase subunit f, mitochondrial	ATP5MF	3.62E-02	-1.17
Q14011	Cold-inducible RNA-binding protein	CIRBP	2.95E-02	-1.19
P05067	Amyloid-beta precursor protein	APP	1.37E-02	-1.2
Q9BRK5	45 kDa calcium-binding protein	SDF4	2.32E-02	-1.24
Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HADH	0.00E+00	-1.24
O43681	ATPase GET3	GET3	1.99E-02	-1.24
P31949	Protein S100-A11	S100A11	1.80E-02	-1.24
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	VDAC3	8.20E-03	-1.28
P30626	Sorcin	SRI	4.26E-02	-1.3
Q8NFV4	Protein ABHD11	ABHD11	4.27E-02	-1.32
P38117	Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB	1.26E-03	-1.34
O43688	Phospholipid phosphatase 2	PLPP2	3.87E-02	-1.37

P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	ACAA2	1.54E-03	-1.38
Q6IAN0	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	DHRS7B	1.21E-02	-1.4
P21953	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	BCKDHB	1.97E-02	-1.4
P12694	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	BCKDHA	2.02E-02	-1.43
Q07812	Apoptosis regulator BAX	BAX	1.28E-03	-1.44
O95336	6-phosphogluconolactonase	PGLS	2.17E-02	-1.46
Q9HD20	Endoplasmic reticulum transmembrane helix translocase	ATP13A1	2.26E-02	-1.56
Q92876	Kallikrein-6	KLK6	4.77E-02	-1.65
Q7Z4W1	L-xylulose reductase	DCXR	1.38E-02	-1.66
P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2	2.53E-02	-1.68
O94903	Pyridoxal phosphate homeostasis protein	PLPBP	2.50E-02	-1.73
Q53EL6	Programmed cell death protein 4	PDCD4	4.37E-03	-1.78
Q6WKZ4	Rab11 family-interacting protein 1	RAB11FIP1	1.01E-02	-1.86
Q92614	Unconventional myosin-XVIIIa	MYO18A	5.04E-03	-1.9
Q16774	Guanylate kinase	GUK1	2.74E-02	-1.93
P51648	Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2	ALDH3A2	1.76E-02	-2.06
Q9BXS4	Transmembrane protein 59	TMEM59	7.64E-03	-2.28
P50453	Serpin B9	SERPINB9	8.34E-03	-2.34
Q08174	Protocadherin-1	PCDH1	1.45E-03	-2.39
O95571	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	ETHE1	3.49E-02	-2.74

De manera complementaria, se analizaron las redes de interacción existentes entre las proteínas diferencialmente expresadas mediante la aplicación STRING del programa Cytoscape 3.8.2 (ver Figura 6), indicando con gradiente de intensidad de color anaranjado a las proteínas sobreexpresadas y con color azul a las proteínas de menor expresión en las células resistentes.

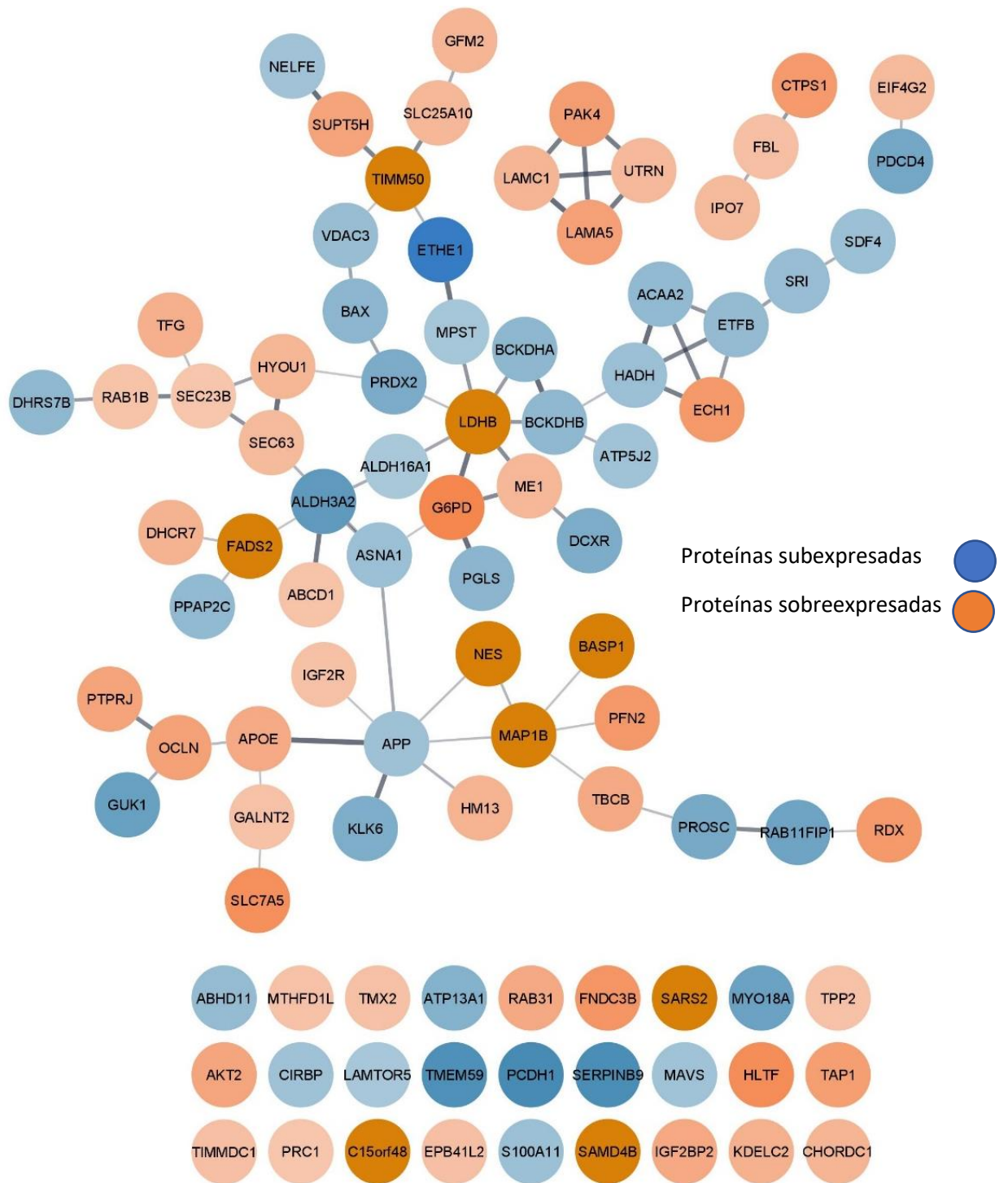


Figura 6. Red de interacciones de las proteínas diferencialmente expresadas entre las células de cáncer pancreático naturalmente resistentes y sensibles a la inhibición de la señal oncogénica



La Figura 7 muestra los cromatogramas de iones extraídos de péptidos pertenecientes a proteínas representativas de la Tabla 5, comparando los resultados entre las células sensibles y resistentes.

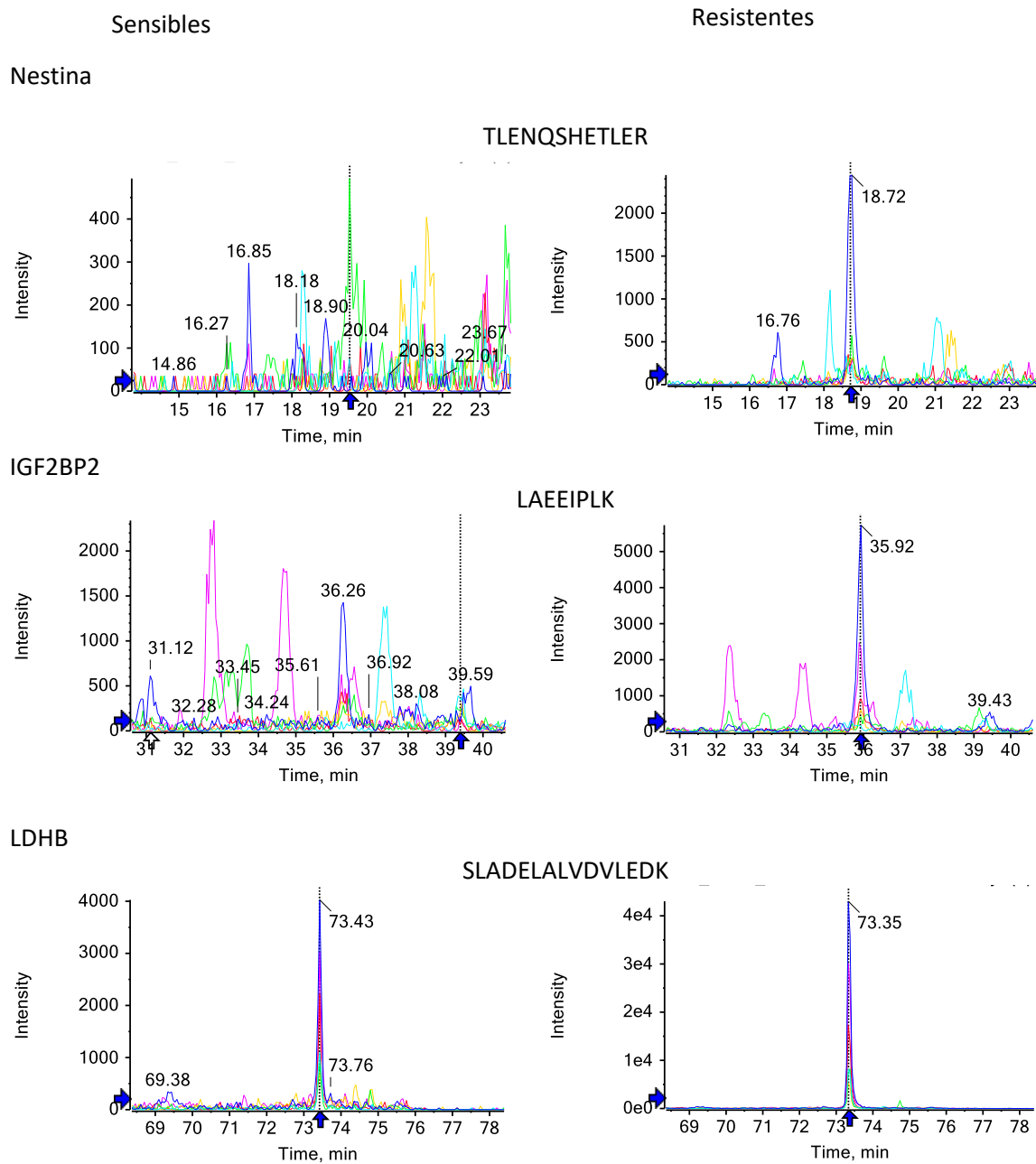


Figura 7. Señal cromatográfica de péptidos correspondientes a algunas proteínas representativas diferencialmente expresadas

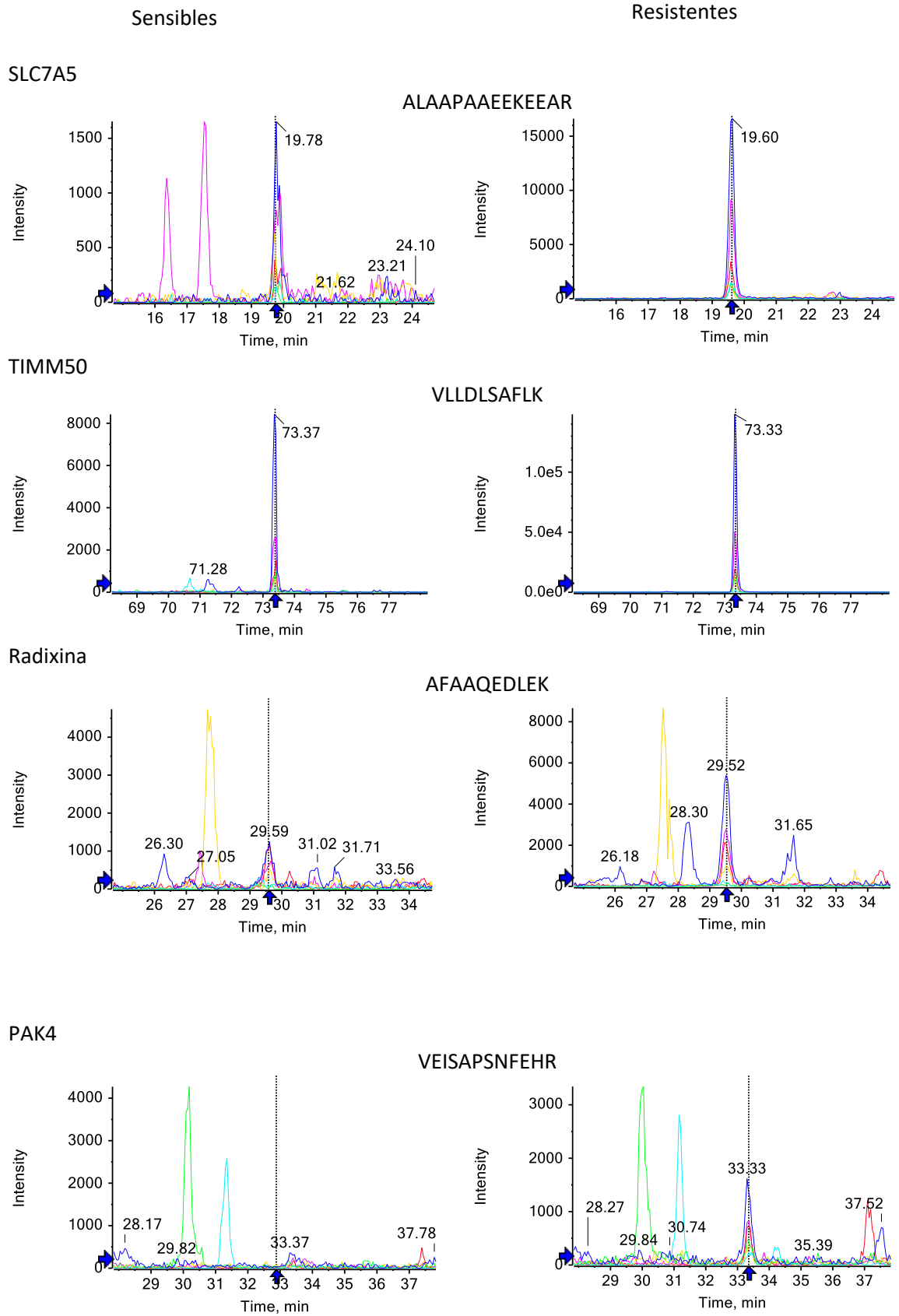


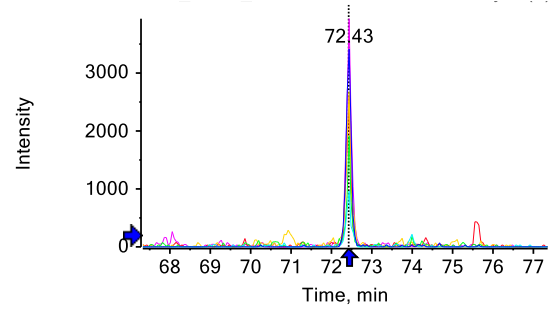
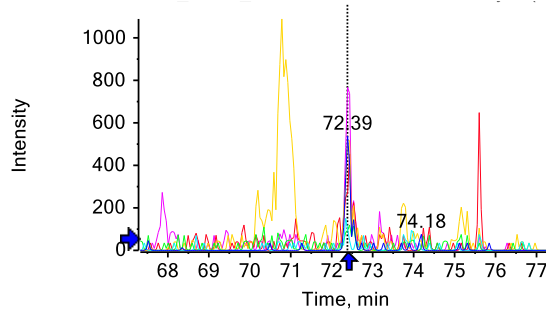
Figura 7 (continuación)

Sensibles

Resistentes

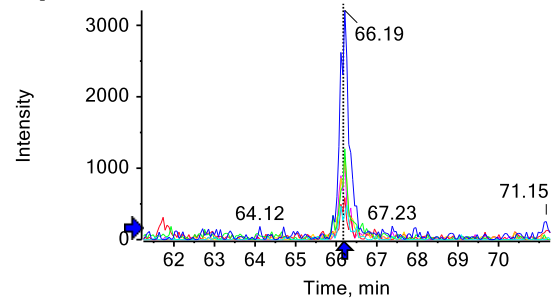
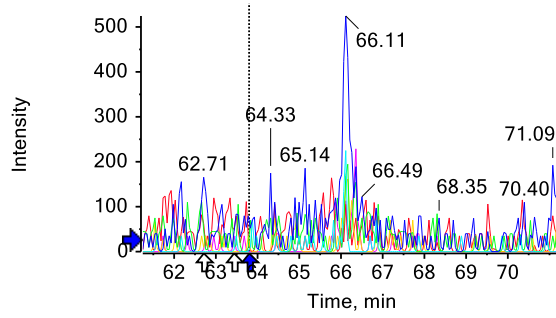
Importina 7

ENIVEAIIHSPELIR



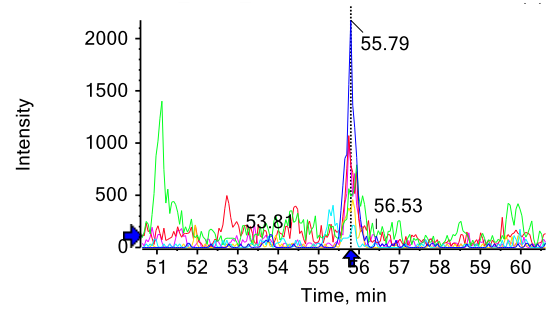
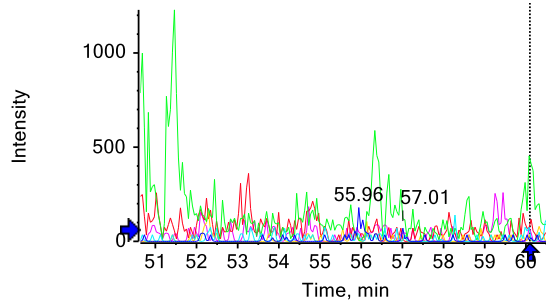
G6PD

LILDVFC[CAM]GSQMHFVR



FADS2

FLKPLLIGELAPEEPSQDHGK



Resistentes

Sensibles

Akt2

SDGSFIGYK

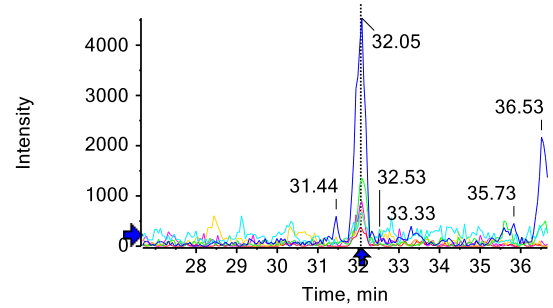
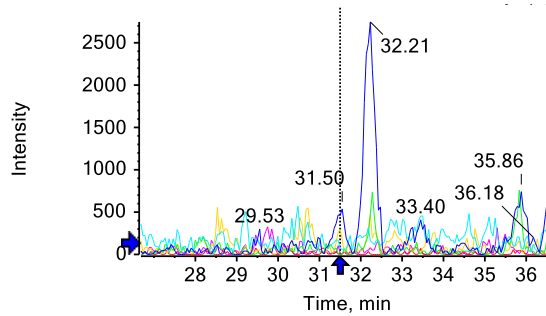


Figura 7 (continuación)

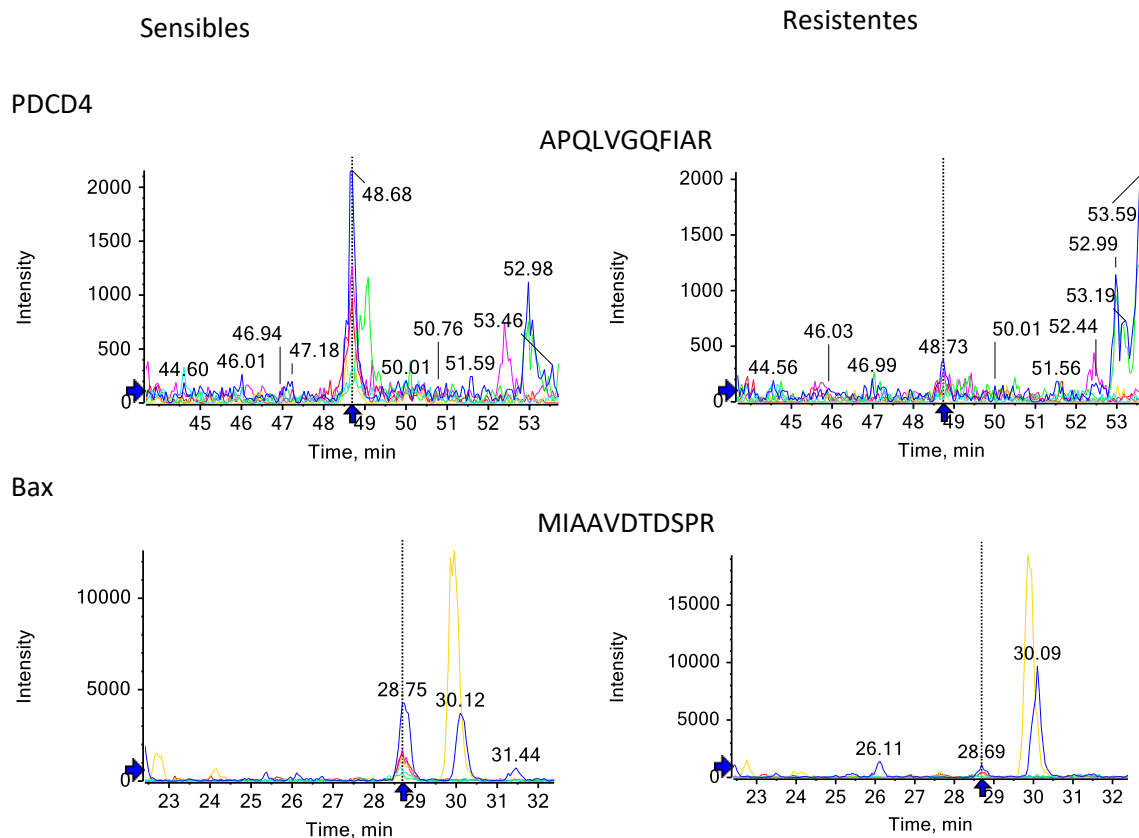


Figura 7 (continuación)

## 5.2. Inhibición de la señalización de MEK y PI3K por los inhibidores AZD6244 y GDC-0941

Las Figuras 8 y 9 muestran los resultados de la detección por Western blot de algunas fosfoproteínas y proteínas totales de las vías de MEK y PI3K en las líneas celulares AsPC-1 y PANC-1 tratadas con los inhibidores AZD6244 y GDC-0941. Las células AsPC-1 son naturalmente sensibles y las células PANC-1 resistentes a los fármacos. Se observa una clara disminución en la fosforilación de ERK al utilizar el inhibidor de MEK AZD6244 y es visible también una reducción en la fosforilación de Akt por tratamiento con GDC-0941, inhibidor de PI3K. Asimismo, se encontró decremento en la activación de las proteínas 4E-BP1 y S6 de la vía PI3K/Akt. Por otro lado, el tratamiento combinado con AZD6244 y GDC-0941 resultó en una reducción en la fosforilación de ERK, Akt, 4E-BP1 y S6 en ambos tipos de células. Los niveles de expresión de las proteínas totales permanecen estables, lo que apoya el efecto mencionado de los fármacos sobre la fosforilación.

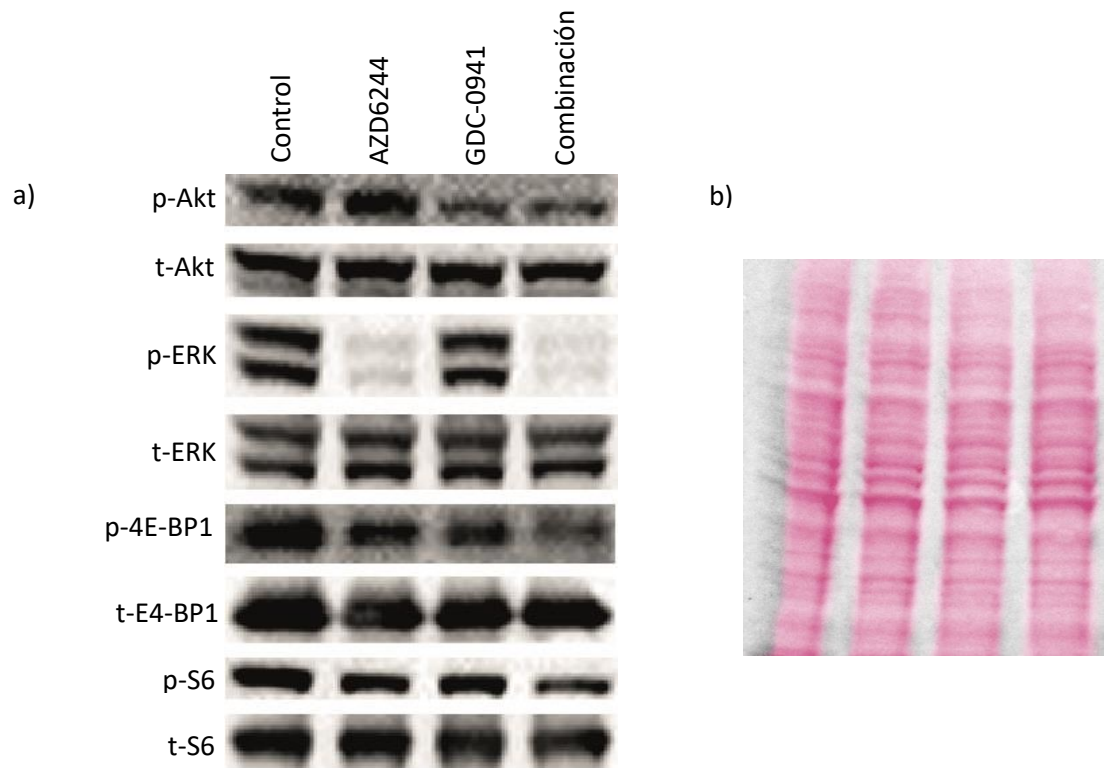


Figura 8. a) Western blot de proteínas asociadas a las vías de señalización PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK de las células AsPC-1 tratadas con los inhibidores AZD6244 y GDC-0941 por 1h, individualmente y en combinación. Se utilizaron las concentraciones correspondientes a CI50. b) Verificación de la igualdad en la carga por carril utilizando tinción con rojo de Ponceau

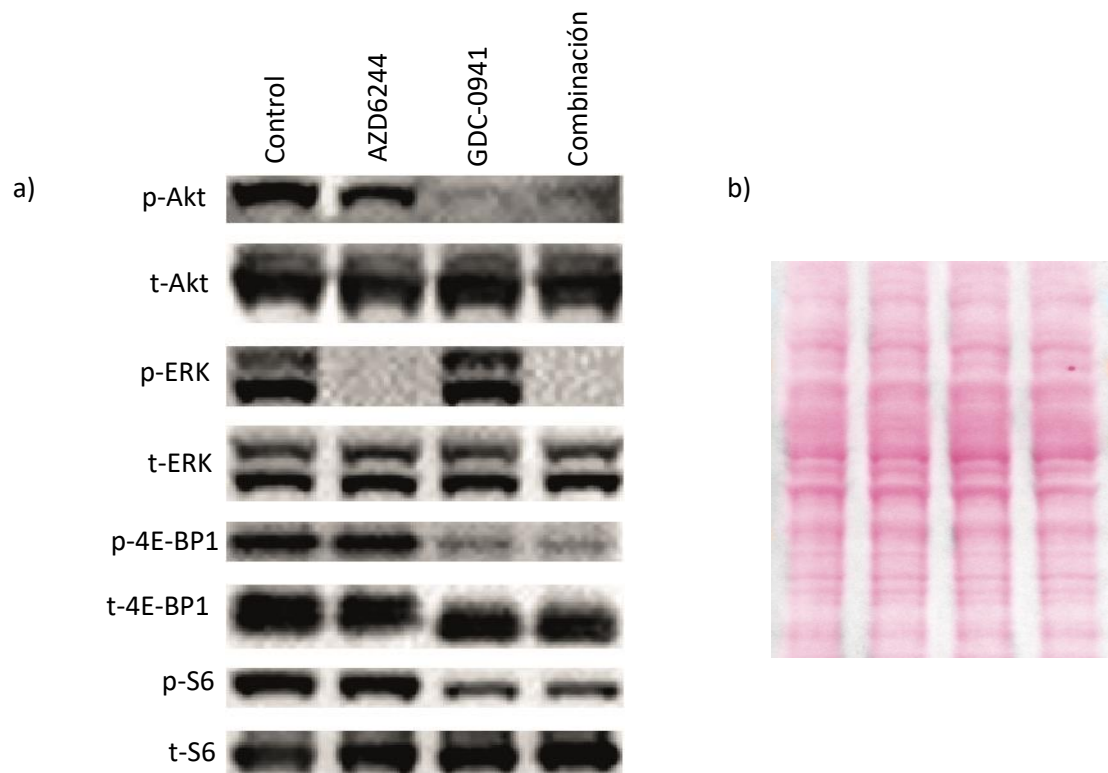


Figura 9. a) Western blot de proteínas asociadas a las vías de señalización PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK de las células PANC-1 tratadas con los inhibidores AZD6244 y GDC-0941 por 1h, individualmente y en combinación. Se utilizaron las concentraciones correspondientes a CI50. b) Verificación de la igualdad en la carga por carril utilizando tinción con rojo de Ponceau

## **6. Análisis de resultados**

### **6.1. Inhibición de las vías de señalización Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt**

La inhibición de la fosforilación de ERK por el fármaco AZD6244 es congruente con su acción inhibitoria sobre la actividad de MEK, cinasa de ERK. AZD6244 es un inhibidor no competitivo que se une a MEK y lo mantiene en una conformación tal que no es posible que interactúe con ERK, evitando su fosforilación [58]. Asimismo, la reducción en la fosforilación de Akt por GDC-0941 demuestra que este fármaco inhibe la señalización de la cinasa PI3K y, de acuerdo con los reportes previos, esto sucede por inhibición de la subunidad catalítica p110 de manera competitiva con ATP [59]. Puesto que las proteínas S6 y 4E-BP1 se encuentran río abajo en la cascada de señalización de PI3K/Akt, reguladas específicamente por el complejo mTORC1 (Figura 1), su activación también se ve disminuida por la inhibición de PI3K. La combinación de los dos fármacos consigue la inhibición general de la fosforilación de las cuatro proteínas mencionadas y por tanto de las dos vías de señalización respectivas tanto en las células AsPC-1 como en PANC-1 (ver Figura 10). De acuerdo con estos resultados, la resistencia natural no está relacionada con una posible persistencia de la fosforilación de ERK o Akt, por lo que los datos de comparación proteómica por espectrometría de masas son importantes para entender el fenotipo celular resistente.

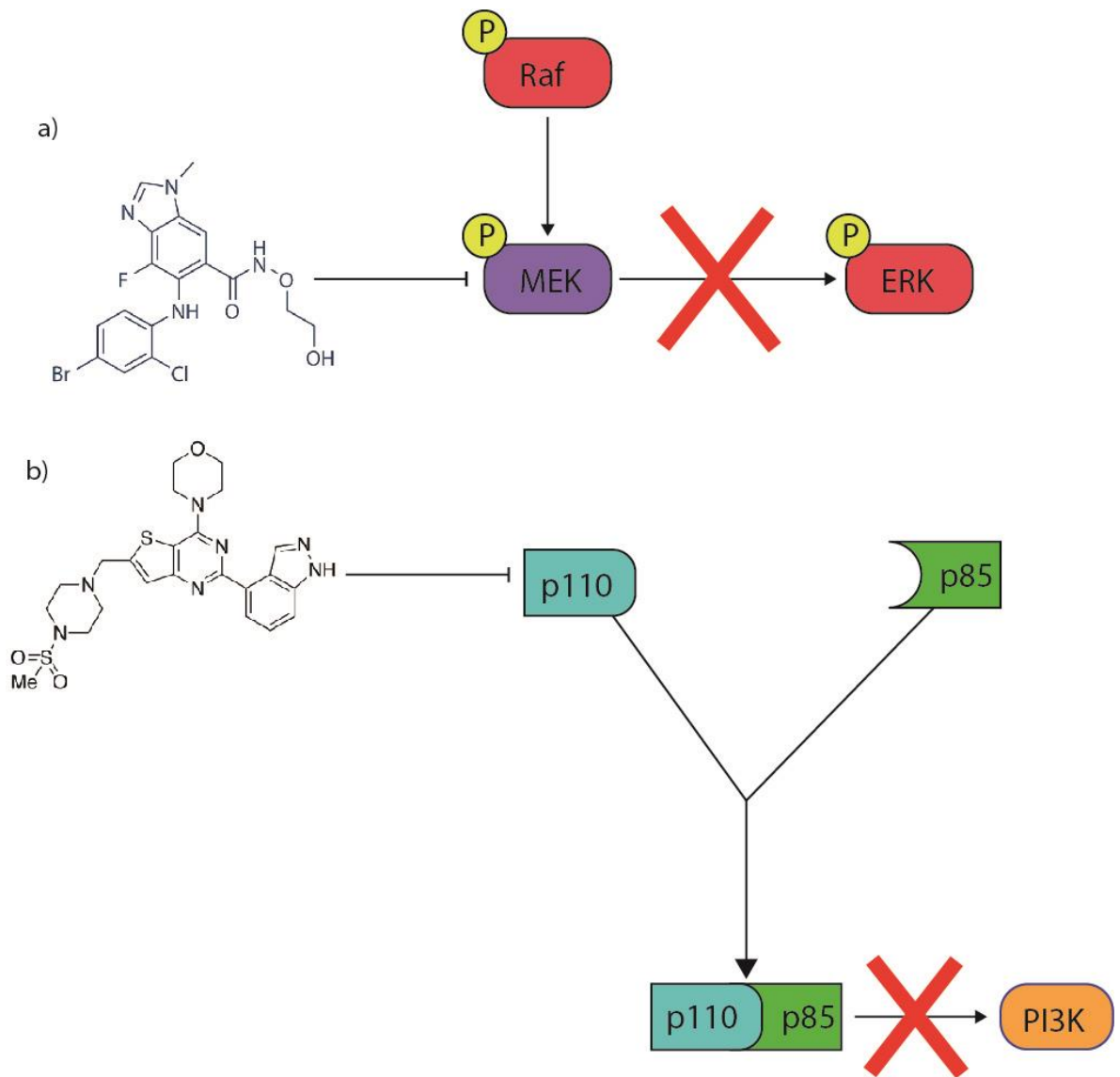


Figura 10. a) Mecanismo de inhibición de AZD6244. b) Mecanismo de inhibición de GDC-0941.

## 6.2. El proteoma asociado a la resistencia natural

Con los resultados mostrados en la Tabla 5 del análisis proteómico comparativo del panel de células de cáncer pancreático se llevó a cabo una búsqueda en la literatura científica para conocer cuáles proteínas pueden tener una función relevante en la resistencia natural a la inhibición de la señal oncogénica y podrían además representar proteínas diana alternativas o complementarias a los



fármacos AZD6244 y GDC-0941 en el tratamiento del cáncer de páncreas. Estos hallazgos se discuten a continuación.

### 6.2.1. Nestina

La nestina es un filamento intermedio del citoesqueleto celular, expresado principalmente en células progenitoras neuronales [60], pero también se ha encontrado expresada en células progenitoras de otros tejidos como muscular, dental y pancreático. Asimismo, se ha observado una regulación positiva en respuesta a daño en tejido, por lo que se le ha implicado en funciones de reparación [61]. Esta proteína se encuentra asociada a distintos tipos de cáncer como pancreático, gastrointestinal, prostático, mamario y tiroideo, promoviendo principalmente la migración e invasión celular. Nestina es fosforilada en la posición Thr316 por las cinasas cdc2 y la cdk5, lo que promueve la reorganización citoplasmática durante la mitosis [62, 63]. Su expresión se registra en el 30 % de los casos de cáncer pancreático y también se ha localizado en células cancerosas adyacentes o invasivas de las fibras nerviosas [61]. Su *et al.* sobreexpresaron nestina en la línea celular MIA PaCa-2 e inhibieron su expresión en PANC-1, y determinaron que la transición entre el fenotipo epitelial a mesenquimal (TEM, transición epitelio-mesénquima) es mediada por esta proteína. Observaron que el bloqueo de nestina incrementa los niveles de marcadores epiteliales como E-cadherina y reduce los de mesenquimales como vimentina, SMA (*smooth muscle actin*, actina de musculo liso) y N-cadherina. También se demostró la interacción entre nestina y la vía de señalización TGF- $\beta$ 1/SMAD4, indispensable para la transición TEM durante la carcinogénesis. Este descubrimiento se realizó mediante inmunoblot de los niveles de expresión de nestina entre líneas celulares con y sin expresión de SMAD4, observándose un incremento en el primer caso. [64].

La nestina se ha propuesto como posible diana para inhibir la metástasis del cáncer de páncreas. Por ejemplo, mediante experimentos *in vitro* con las células PANC-1 y PK-45H transfectadas con ARN interferente (siRNA) para suprimir la expresión de esta proteína, se demostró que las células reducen su capacidad de migración, aunque no su viabilidad. También se observó que su inhibición incrementa la expresión de E-cadherina, promoviendo una mayor adhesión entre las células y la presencia de uniones más fuertes entre estas [61]. En un estudio adicional utilizando siRNA contra nestina se comprobó la disminución en la migración celular además de una relación entre su expresión y las llamadas células iniciadoras de cáncer [65], que poseen capacidad de renovarse a sí

mismas, diferenciarse en diversos linajes celulares y sobrevivir bajo condiciones adversas, por lo que están asociadas a la heterogeneidad tumoral, tumorigénesis y la respuesta variable a los tratamientos [62]. La supresión de nestina en las células iniciadoras de cáncer pancreático incrementó su susceptibilidad al fármaco gemcitabina, reduciendo la viabilidad de PANC-1 y PK-45H a 20% y 15%, respectivamente. Complementariamente se realizaron experimentos donde se encontró que la supresión de nestina disminuye la formación de esferoides [65]. Con base en esta información, se puede plantear que la sobreexpresión de nestina puede contribuir a la resistencia natural de las células PANC-1 y Su 86.86 al tratamiento con el inhibidor de MEK. Por otro lado, también sería interesante averiguar la participación de células iniciadoras de cáncer en dicha resistencia.

### **6.2.2. IGF2BP2**

IGF2BP2 (*insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2*, proteína 2 de unión al mRNA del factor de crecimiento similar a la insulina 2) pertenece a una familia de proteínas que regula y estabiliza los transcritos del factor de crecimiento similar a la insulina IGF2. En el núcleo, IGF2BP2 se une al mRNA a través de la región 5', lo protege de la degradación y le permite salir al citoplasma. Esta proteína también tiene la capacidad de unirse a transcritos de otros genes, lo que le confiere una amplia gama de efectos reguladores incluyendo desarrollo embriológico, metabolismo de lípidos, resistencia a la insulina y oncogénesis. Su sobreexpresión se encuentra asociada a cáncer de mama, colon, recto, ovario, páncreas, esófago e hígado [66]. En cáncer de páncreas, un análisis Kaplan-Meier a partir del estudio de muestras de tejido tumoral ha vinculado la sobreexpresión de IGF2BP2 con menor supervivencia, disminuyendo de aproximadamente 50 a 15 meses. Además, se halló mediante inmunohistoquímica una asociación entre la expresión de esta proteína y menor supervivencia a un año. En otras investigaciones, se encontró mayor expresión de IGF2BP2 en células PANC-1 con TEM inducida, y también se observó que presenta mayor abundancia en células de cáncer circulantes en comparación con tejido tumoral de un mismo paciente [67, 68]. Se ha reportado que la expresión de IGF2BP2 acelera la proliferación *in vitro* de las células de cáncer de páncreas y se incrementan los niveles de Akt fosforilada [68]. Otro estudio encontró asociación entre IGF2BP2 con la estabilización del transportador membranal de glucosa GLUT1 (*glucose transporter type 1*, transportador de glucosa tipo 1) y se observó que una menor expresión de IGF2BP2 resulta en inhibición de GLUT1 y de la glucólisis, lo que interfiere con el crecimiento celular

[69]. Los datos sobre la fosforilación de Akt modulada por IGF2BP2 sugieren un papel de esta proteína en el mantenimiento de la señal oncogénica y la proliferación durante la inhibición de MEK, posiblemente debido a la interacción entre las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK.

### **6.2.3. LDHB**

LDHB (*lactate dehydrogenase B*, lactato deshidrogenasa B) es una subunidad de lactato deshidrogenasa (LDH) que tiene como función la oxidación de piruvato a lactato para la producción de energía. LDHB es importante en la cooperación entre células de cáncer oxidativas y glucolíticas para su supervivencia en condiciones de estrés, además de contribuir a la actividad lisosomal y autofagia [70]. Se ha encontrado expresada en cáncer de mama, tiroides y pulmón y se ha asociado con malignidad, un perfil más agresivo del cáncer y pronóstico pobre. Un análisis de muestras de 106 pacientes de cáncer de páncreas encontró expresión en 53.8% de tejidos tumorales y nula expresión en tejido pancreático normal; además, se observó mayor abundancia en los casos de metástasis de nodos linfáticos u órganos adyacentes y a través de análisis Kaplan-Meier se demostró que aquellos pacientes con expresión de la proteína tenían menor supervivencia [71]. Un estudio en fibroblastos embrionarios de ratón estableció una relación entre el complejo mTORC1 y la expresión de LDHB. Se demostró, por ejemplo, que la inhibición de las subunidades del complejo TSC incrementa los niveles de LDHB; la sobreexpresión de Akt produjo también un incremento de LDHB y S6 (proteína efectora de mTORC1), y el bloqueo de raptor disminuyó la expresión de LDHB, en contraste con el bloqueo de rictor, que no tuvo efecto. En consecuencia, se propone que LDHB es regulada por Akt-mTOR [72]. Considerando esta relación entre la vía PI3K/Akt y la expresión de LDHB, se sugiere un mayor estudio sobre su posible contribución en la resistencia a la inhibición de la vía MAPK, complementaria.

### **6.2.4. SLC7A5 (LAT-1)**

La proteína SLC7A5 (*solute carrier family 7 member 5*, miembro 5 de la familia 7 de transportadores de solutos), también conocida como transportador 1 de aminoácidos tipo L (LAT1, *L-type amino acid transporter 1*), se encarga del transporte de aminoácidos neutros, principalmente los de tipo esencial, y se encuentra en la membrana citoplasmática. Se ha observado expresada de manera significativa en tejido canceroso de pulmón, páncreas, hígado, mama, próstata, ovario, cerebro, esófago, cavidad oral, útero, piel y hueso. LAT1 es el principal responsable de transportar al

aminoácido leucina dentro de la célula, es importante para la activación del complejo mTORC1, el crecimiento celular y está asociada al desarrollo de fenotipos malignos [73]. Estudios con tejido tumoral de páncreas han mostrado que LAT1 se presenta en mayor abundancia en estos que en tejido sano y su expresión está vinculada con un pronóstico pobre y menor supervivencia [71, 74]. Una investigación realizada en células MIA PaCa-2 demostró que este transportador es indispensable para incorporar los aminoácidos neutros a la célula, descubriendo que la internalización de leucina es significativamente reducida al bloquear LAT1 y esto inhibe la proliferación celular [75]. Otro experimento utilizó células de cáncer de mama con sobreexpresión de LAT1 por medio de vectores lentivirales y exploró los niveles de Akt y mTOR fosforilados, hallando incremento en comparación con los controles [76]. Dada la importancia de este transportador en células de cáncer de páncreas y su interacción con mTORC1, se recomienda probar si su inhibición puede reducir la viabilidad de las células resistentes de nuestro estudio.

#### **6.2.5. TIMM50**

La subunidad mitocondrial TIMM50 (*translocase of the inner mitochondrial membrane 50*-translocasa de la membrana interna mitocondrial 50) forma parte del complejo TIM23, que media el transporte de proteínas unidas a péptidos de tránsito del exterior de la membrana mitocondrial al interior, especialmente proteínas de la matriz y membrana interna mitocondrial [77]. La sobreexpresión de TIMM50 se ha observado mayoritariamente en cáncer de mama, pero no es exclusivo de este. Por ejemplo, en un estudio realizado con células de cáncer pulmonar A549, H1299 y H460 se observó que la sobreexpresión de TIMM50 incrementa el crecimiento tumoral y la capacidad de formar colonias; asimismo, se evaluó su relación con la TEM analizando los niveles de snail (factor de transcripción asociado a TEM) y E-cadherina en células con mayor abundancia de TIMM50: en estas células se incrementó la expresión de snail y se redujo la expresión de E-cadherina. Dentro de este mismo estudio se observó por medio de Western blot una correlación entre niveles altos de TIMM50 y la fosforilación de ERK; adicionalmente, al tratar las células que sobreexpresan TIMM50 con el inhibidor de ERK U0126 se contrarrestaron los efectos sobre las proteínas snail y E-cadherina [78]. Un estudio adicional demostró que la supresión de TIMM50 disminuye el crecimiento de células de cáncer de pulmonar y mamario con mutaciones en p53 y resulta también en un incremento de la susceptibilidad al tratamiento con paclitaxel [79]. En un trabajo complementario, se encontró que la reducción de la expresión de TIMM50 disminuyó la

migración y crecimiento de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT549 y se observó incremento de apoptosis [80]. La asociación entre ERK y TIMM50, así como su posible rol como promotor del crecimiento celular en cáncer podrían estar implicados en el mantenimiento de la viabilidad de las células de cáncer de páncreas tratadas con el inhibidor de MEK.

#### **6.2.6. Radixina**

La radixina es una proteína de unión entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática, implicada en funciones como motilidad, adhesión y proliferación [81]. Un estudio en células de cáncer gástrico SGC-7901 demostró que la inhibición de radixina disminuye la migración, adhesión y viabilidad celular y que esta respuesta está mediada por la expresión de E-cadherina [82]. Otra investigación *in vitro* enfocada en cáncer de colon halló resultados similares: se encontró que las células con menor abundancia de radixina presentan reducción en la capacidad de migración e invasión. Además, se observó mediante Western blot que una menor presencia de radixina estaba acompañada con disminución en la activación de ERK [83]. Shu-Dong *et al.* investigaron los efectos *in vivo* e *in vitro* de la inhibición de radixina en cáncer de páncreas. Al bloquear esta proteína en células PANC-1 se observó una disminución en la proliferación, adhesión e invasión, así como incremento en la apoptosis y también se detectó mayor expresión de E-cadherina. Otro efecto observado fue la disminución del tamaño de los tumores desarrollados al inocular ratones con células PANC-1 donde radixina había sido suprimida ( $696.25 \pm 82.32 \text{ mm}^3$  en los controles vs  $246.2 \pm 60.42 \text{ mm}^3$  con células sin radixina) [84]. La reducción de migración y proliferación de células cancerosas al inhibir radixina y su sobreexpresión en las células resistentes de este trabajo sugiere una posible ruta de escape de la inhibición de MEK.

#### **6.2.7. PAK4**

PAK4 (*p-21 activated kinase 4*, cinasa 4 activada por p-21) es una proteína efectora de la familia de GTPasas Rho, involucradas en la morfología, adhesión, migración, proliferación y supervivencia celular. La sobreexpresión de PAK4 se ha hallado en varios tipos de cáncer como mamario, gástrico, prostático, pulmonar, urotelial, ovárico y pancreático, donde se ha descrito como promotora de la proliferación, supervivencia e invasión celular, así como del proceso de metástasis, la transición TEM y adquisición de resistencia farmacológica [85]. Se ha demostrado que al bloquear PAK4 en las células de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 y T3M4 disminuye el crecimiento celular en 35.7%/31.4%

y la capacidad clonogénica 3.6/3.3 veces; esta disminución se debe al arresto del ciclo celular en la fase G1 por una menor abundancia de las ciclinas A1, D1 y E1. También se encontró que la supresión de esta proteína incrementa la apoptosis al disminuir los niveles de Bcl-2 e incrementar los de p21, p37 y Bax. Adicionalmente, se observó que PAK4 regula la actividad del factor nuclear NF- $\kappa$ B a través de las vías de Akt y ERK [86]. En otro estudio se aislaron células iniciadoras de cáncer a partir de las líneas MIA PaCa-2 y T3M4, y se encontró que la inhibición de PAK4 condujo a una disminución de CD24, CD44 y EpCAM, que son marcadores asociados a la capacidad de perpetuación y diferenciación de este tipo de células. También se halló disminución de la capacidad de formar esferoides y de la resistencia al tratamiento con gemcitabina. Complementariamente se demostró que la inhibición de PAK4 disminuye la actividad del factor de transcripción STAT3, mientras que la reactivación de STAT3 revierte el efecto de PAK4 sobre la formación de esferoides y la resistencia farmacológica [87]. El tratamiento con inhibidores alostéricos de PAK4 (e.g. KPT-7523, KPT-9274, KPT-7189 y KPT-9307) redujo la proliferación y migración celular, incrementó la apoptosis y disminuyó la presencia de marcadores de células iniciadoras de cáncer. Otro efecto observado fue el sinergismo con el tratamiento con gemcitabina y oxaliplatino. Cuando se evaluó el efecto *in vivo* de la inhibición de PAK4 en xenoinjertos en ratones se observó la eliminación del tumor a los cinco días del tratamiento o bien una reducción de tumores grandes después de tres dosis, sin efectos adversos. Estos resultados fueron replicados en xenoinjertos con células iniciadoras de cáncer resistentes a gemcitabina [88]. Un reciente enfoque sobre PAK4 como blanco de tratamiento en el cáncer de páncreas utilizó RNA interferente contra esta proteína, liberado en los tumores mediante exosomas; en dicho trabajo se comprobó que la reducción de la expresión de PAK4 mitiga la velocidad de crecimiento y malignidad tumoral, resultando en mayor supervivencia de los ratones tratados [89]. Sung-Ung *et al.* demostraron que la inhibición de PAK4 mediante siRNA en células de cáncer de páncreas resistentes a gemcitabina como Capan-2, PANC-1 y SNU-410 reduce 27% la viabilidad celular y 50% en combinación con dicho fármaco [90]. Las investigaciones mencionadas muestran una relación entre la sobreexpresión de PAK4 y la quimiorresistencia, además de presentar a esta proteína como un blanco terapéutico efectivo contra el cáncer de páncreas, por lo que es necesario investigar si las células naturalmente resistentes a la inhibición de MEK son susceptibles a un tratamiento dirigido a PAK4.

### 6.2.8. Importina 7

La importina 7 es un transportador nuclear que permite la entrada de ERK fosforilado al núcleo [91]. Esta proteína se ha encontrado sobreexpresada en cáncer de páncreas, particularmente en pacientes en etapa IV, y su expresión se ha correlacionado con un pronóstico pobre. La sobreexpresión de importina 7 con un vector lentiviral en células PANC-1 produjo aumento de la proliferación, migración e invasión celular, aunado a disminución de apoptosis e incremento de los niveles de marcadores de transición TEM como N-cadherina, vimentina y snail. También se encontró una disminución en la abundancia de p53 y mayor expresión del factor de transcripción MALAT1 (*metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1*, transcrito 1 asociado a la metástasis pulmonar 1), relacionado con la progresión del cáncer y la inhibición de MiR-129-5p, un microRNA que puede interferir con importina 7. Estas interacciones tienen como resultado un bucle de retroalimentación que promueve la progresión de la neoplasia. Por ejemplo, al inocular ratones con células de cáncer de páncreas HPAC con supresión de importina 7 se demostró una disminución del factor MALAT1 y N-cadherina, así como del crecimiento tumoral [92]. También se ha observado reducción de viabilidad y capacidad clonogénica de las células HeLa y C-41 al inhibir importina 7, y que esta inhibición, por siRNA o con el fármaco importazole, reduce los niveles de fosforilación de Akt y m-TOR [93]. Importina 7, como transportadora de ERK al núcleo, puede ser considerada una diana terapéutica. El péptido sintético myr-EPE, por ejemplo, interfiere con la unión entre importina 7 y ERK, lo que disminuye la proliferación de células derivadas de diversos tipos de cáncer y reduce el tamaño de los tumores en xenoinjertos en ratones [94]. Otro acercamiento del uso de importina 7 como diana de tratamiento fue realizado utilizando la proteína MTBP (*Mdm2-binding protein*, proteína de unión a Mdm2) en células de carcinoma hepatocelular PLC/PRF/5 y Huh7, ya que MTBP tiene la capacidad de unirse a la importina 7 e impedir su unión a ERK. Este tratamiento disminuyó la migración celular mediada por ERK [95]. La reducción de la activación de las proteínas m-TOR y Akt en presencia de menores niveles de Importina 7 sugiere un papel de esta proteína como parte de la comunicación entre las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK, lo que podría facilitar el mantenimiento de la señal oncogénica al inhibir MEK.

### 6.2.9. G6PD

G6PD (*glucose-6-phosphate dehydrogenase*, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) es una enzima de la vía de las pentosas fosfato, donde participa en la producción de ribosa para la síntesis de nucleótidos y en la regeneración de NADPH, que es un componente de las rutas biosintéticas de lípidos [96, 97]. G6PD tiene un papel importante en el metabolismo redox, ya que el NADPH generado es indispensable para la modulación del estrés oxidativo por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*). También se ha visto que esta proteína participa en el crecimiento y supervivencia celular, por lo que es considerada una proteína oncogénica [97]. Se ha observado que al inhibir KRas disminuye la actividad de la vía de las pentosas, la cual está regulada por la expresión de G6PD [98]. Su desregulación se ha asociado a la resistencia a quimioterapia, por ejemplo, Kaoru *et al.* encontraron que esferoides de cultivos primarios de cáncer de ovario resistentes al tratamiento con oxaliplatino presentaban niveles altos de G6PD y actividad redox. La inhibición de G6PD con un vector lentiviral provocó disminución del crecimiento celular [99]. Otro estudio demostró que al inhibir G6PD con RNA interferente en las líneas celulares de cáncer colorrectal DLD-1 y HCT116 se redujo la producción de NADPH, lo que incrementó el estrés oxidativo y mejoró la respuesta a oxaliplatino aumentando la apoptosis mediada por liberación de citocromo c, y este efecto fue replicado con xenoinjertos en ratón [100]. Otro grupo de estudio encontró resultados similares en células de cáncer de vejiga. Al silenciar G6PD en las líneas celulares 5637, T24, TCCSUP y 293T los niveles de ROS se elevaron y las células perdieron capacidad clonogénica y proliferativa. Otros efectos importantes fueron una mayor apoptosis y disminución de la fosforilación de Akt. Adicionalmente, el tratamiento combinado de las células con un inhibidor competitivo de G6PD y un activador de Akt resultó en rescate parcial de la actividad de G6PD [101]. En líneas celulares de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 y AsPC-1 con resistencia adquirida a la inhibición de EGFR (*epidermal growth factor receptor*, receptor del factor de crecimiento epidermal) con erlotinib también se detectó incremento en la expresión de G6PD y otras proteínas de la vía de las pentosas fosfato, y la resistencia pudo ser atenuada por inhibición de G6PD [102].

La asociación reportada de G6PD con los niveles de fosforilación de Akt así como su participación en la vía de pentosas fosfato sugiere que la expresión de esta proteína en las células resistentes a la inhibición de MEK podría estar relacionada con la respuesta observada a este tratamiento.



### **6.2.10. FADS2**

La enzima FADS2 (*fatty acid desaturase 2*, desaturasa de ácidos grasos 2) tiene un rol en del metabolismo de los lípidos a través de la introducción de enlaces dobles entre carbonos de ácidos grasos, que son a su vez importantes en la formación de las membranas celulares. Si bien la desaturasa SCD (*stearoyl-CoA desaturase*, desaturasa de estearil-CoA) es la principal enzima encargada de crear estos dobles enlaces, recientemente se ha observado que FADS2 proporciona a las células cancerosas una ruta alternativa para producir ácidos grasos insaturados, particularmente el ácido sapiénico, que se genera a partir del ácido palmítico [103]. Esta enzima contribuye entonces a la capacidad de adaptación metabólica de las células de cáncer y a su proliferación. Vriens *et al.* estudiaron líneas celulares de cáncer de hígado, pulmón, próstata y mama, y encontraron que aquellas que sobreviven a la inhibición de SCD poseen mayor expresión de FADS2 y producción de ácido sapiénico. También observaron que la sobreexpresión de FADS2 en las células dependientes de SCD reestablece la proliferación y que el silenciamiento del gen altera la composición de los fosfolípidos de la membrana, comprobando así la participación de FADS2 en la síntesis de esta última. Además, notaron mayor proporción de ácido sapiénico en tejido canceroso que en tejido normal de hígado y pulmón [104]. En un estudio subsecuente descubrieron que la sobreexpresión de la proteína SREBP (*sterol regulatory element-binding protein 1*, proteína 1 de unión al elemento regulador de esteroles) y la activación de mTOR aumentan la expresión de FADS2 y la síntesis de ácido sapiénico [105]. Esta asociación entre el incremento del ácido mencionado en cáncer y la actividad de mTOR fue observada también en células de cáncer de mama cultivadas en medio suplementado con ácido sapiénico, observando elevación en la fosforilación de mTOR y Akt [106]. La relación entre el incremento de FADS2 y la activación de Akt y mTOR podría proveer un mecanismo de compensación a la inhibición de MEK en las células de cáncer de páncreas resistentes a este tratamiento.

### **6.2.11. Akt2**

Akt2 es una de las tres isoformas de Akt y se ha encontrado relacionada con la regulación de la captación de glucosa y la respuesta a insulina [107]. En un estudio donde se evaluó la expresión de esta isoforma por inmunohistoquímica en muestras de 22 pacientes de cáncer de páncreas bajo tratamiento con gemcitabina y erlotinib, se observó que aquellos con menor supervivencia (224

días) tendían a presentar mayores niveles de Akt2 en comparación con pacientes cuyos niveles de esta proteína eran menores (295 días). Los autores encontraron que la inhibición de PI3K en las células de cáncer de páncreas PANC-1, que poseen nivel alto de expresión de Akt2 y son resistentes a erlotinib, reduce su crecimiento con respecto al tratamiento individual con este último. Por otro lado, la sobreexpresión de Akt2 en las células BxPC-3, sensibles al inhibidor de EGFR, conduce a la adquisición de resistencia [108]. En otro estudio se encontró que la sobreexpresión de Akt2 en líneas celulares de cáncer de mama y ovario incrementa la adhesión e invasión celular, mientras que al inhibir PI3K se reduce la capacidad invasiva. Al evaluar el efecto *in vivo* se observó que los tumores generados con células con mayor expresión de Akt2 tienen mayor capacidad metastásica [109]. En células de cáncer de páncreas se ha visto que la inhibición de Akt2 disminuye la invasividad y el crecimiento de tumores en ratones [110]. La inhibición de Akt2 mediante microRNA se ha vinculado con un aumento de apoptosis y reducción de proliferación, migración, crecimiento tumoral y metástasis de células de cáncer pancreático. [111, 112]. Adicionalmente, se ha observado que el silenciamiento de Akt2 inducido por siRNA disminuye la proliferación y capacidad clonogénica de las células PANC-1 en 51.4% y 75.4%, respectivamente, y tiene un efecto sinérgico con la inhibición simultánea de KRas [113]. La sobreexpresión de Akt2 en células naturalmente resistentes a la inhibición con AZD6244 sugiere una participación de esta proteína en dicha resistencia ya que su expresión promueve la supervivencia y crecimiento celular.

#### **6.2.12. PDCD4**

La proteína PDCD4 (*programmed cell death protein 4*, proteína de muerte celular programada 4) es considerada un supresor tumoral y se ha encontrado subexpresada en cánceres como el de pulmón, mama, colon y páncreas [114]. Su expresión inhibe la transformación neoplásica [115] y aumenta durante la apoptosis en gran número de células [116, 117]. Esta proteína se encuentra ubicada predominantemente en la membrana nuclear e inhibe al factor de iniciación eIF4A, un componente del complejo de iniciación de la traducción eIF4F, y por consiguiente reprime la síntesis de proteínas [118, 119].

PDCD4 también es capaz de bloquear la fosforilación y por tanto actividad de c-Jun [120], que forma parte del factor de transcripción AP-1, involucrado en diversos procesos oncogénicos como proliferación, angiogénesis e invasión [121]. También se ha demostrado que Akt fosforila a PDCD4

en las posiciones Ser67 y Ser457 y que PDCD4 fosforilada reduce su interacción con c-Jun [120]. Un mecanismo de subexpresión de PDCD4 en cáncer es su ubiquitinación mediada por DTL (*Denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog*), que conduce a su degradación [122]. La relevancia de PDCD4 en el tratamiento del cáncer de páncreas se ha demostrado en un estudio utilizando microRNA-429 para incrementar la expresión de esta proteína en células SW1990 resistentes a gemcitabina, lo que recuperó la sensibilidad a este agente de quimioterapia. Adicionalmente, se comprobó que la restauración de la expresión de PDCD4 en xenoinjertos de ratones tratados con este fármaco disminuye el crecimiento tumoral [123]. Con la información recopilada es prudente sugerir investigar si el estado de activación de c-Jun está relacionado con la resistencia de las células y si una mayor expresión de PDCD4 puede mejorar la susceptibilidad de las células resistentes al fármaco AZD6244.

### **6.2.13. Bax**

Bax forma parte de la familia de proteínas Bcl-2; esta familia está dividida en proteínas antiapoptóticas y proteínas proapoptóticas siendo Bax de estas últimas. La regulación de estas proteínas esta mediada por proteínas con dominio BH3. Al inicio de la apoptosis, una variedad de proteínas pueden activar a las proteínas con este dominio, inactivando a las proteínas antiapoptóticas, lo que facilita la dimerización de Bax en la membrana mitocondrial [124, 125]. Se ha observado subexpresión de Bax en cáncer, así como sobreexpresión de proteínas similares a Bcl-2 y tal disminución de Bax está asociada a la resistencia a la apoptosis. Por este motivo, Bax se considera una posible diana para el tratamiento del cáncer. Una estrategia propuesta para este objetivo es la utilización de homólogos de las proteínas similares a BH3, que se podrían unir a la familia Bcl-2 para liberar a Bax. Alternativamente, estos homólogos tienen la capacidad de unirse directamente a Bax, lo que también promueve su dimerización en la membrana mitocondrial [126, 127]. También se ha observado que Akt fosforila y bloquea la función de Bax al impedir su dimerización. Lo anterior fue demostrado mediante un experimento utilizando inmunofluorescencia, donde se observó que las células que sobreexpresan Akt presentan niveles reducidos de Bax dimerizado [128]. Adicionalmente, en un trabajo con las células de cáncer de páncreas AsPC-1 modificadas para sobreexpresar Bax se encontró incremento en la apoptosis

cuando fueron tratadas con gemcitabina y 5-FU; la sobreexpresión de Bax fue confirmada por Western blot y la apoptosis fue observada mediante tinción con DAPI, que está dirigida al ADN nuclear y permite observar su fragmentación durante el proceso [129]. En otro estudio se demostró que el uso de IL-29 promueve la expresión de Bax en células PAN-48, con un efecto antiproliferativo observado mediante el conteo de colonias, así como un efecto proapoptótico determinado mediante el monitoreo de la actividad de la caspasa 3 [130]. El papel fundamental de Bax para iniciar la muerte celular programada y su menor expresión en las células resistentes, así como el rol inhibitorio de Akt sobre esta proteína convergen en la posibilidad de que la subexpresión de Bax pueda estar involucrada en la capacidad de las células para sobrevivir a la inhibición de MEK.

La Figura 11 ilustra de manera general nuestros hallazgos sobre las características del proteoma involucrado en la resistencia natural a la inhibición de la señal oncogénica en las células de cáncer de páncreas.

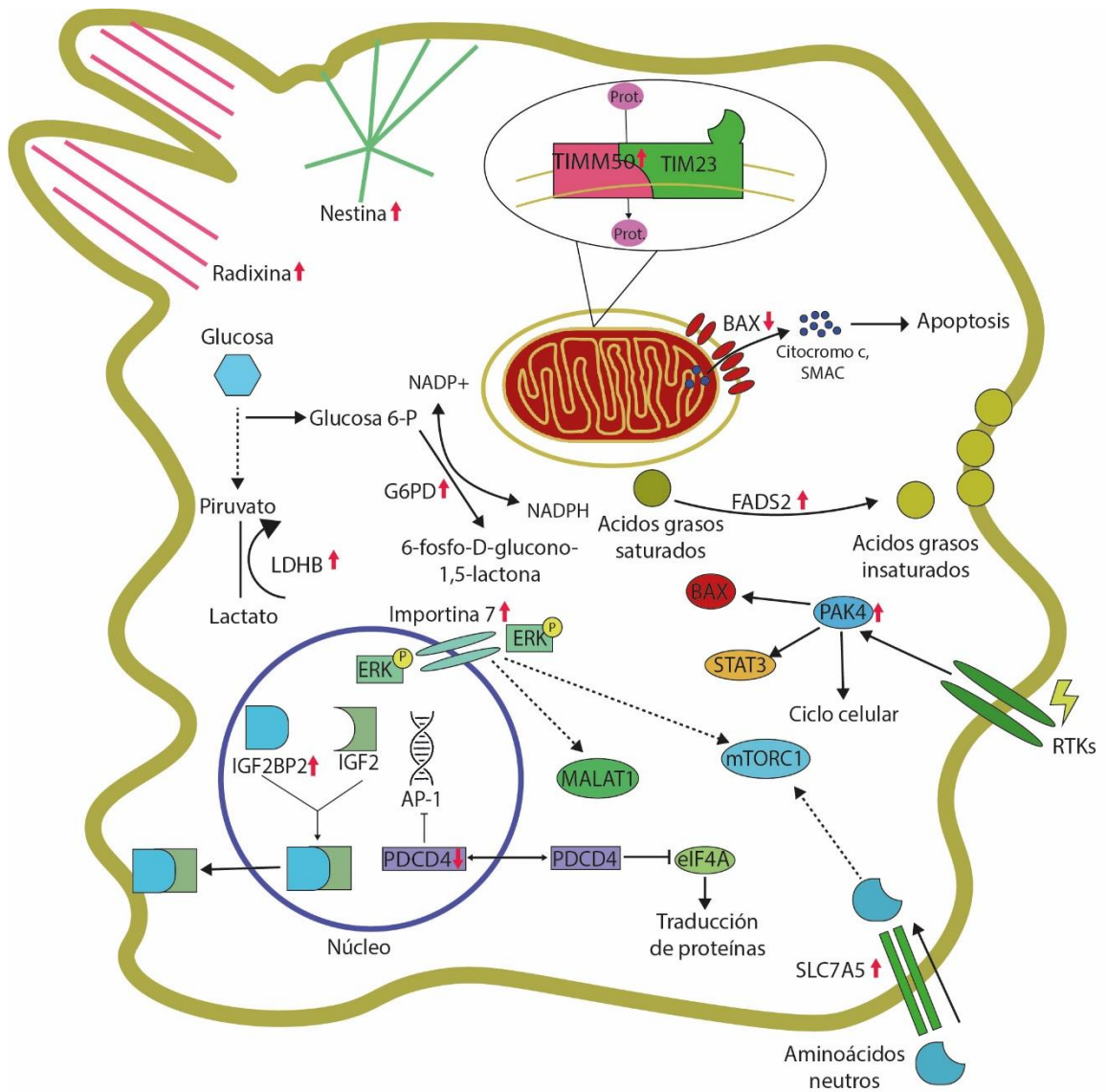


Figura 11. Proteínas diferencialmente expresadas y posiblemente asociadas a la resistencia natural a la inhibición de la señal oncogénica en las células de cáncer de páncreas

## 7. Conclusiones

El estudio del proteoma en un panel de células de cáncer de páncreas naturalmente sensibles y resistentes a la inhibición de la señal oncogénica mediante fraccionamiento de péptidos por dos métodos complementarios (cromatografía de fase reversa a pH básico y cromatografía de intercambio iónico) y análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución permitió identificar 5 466 proteínas y cuantificar relativamente 4 438 proteínas. Los resultados de expresión diferencial indicaron la asociación de 91 de tales proteínas con la resistencia natural.

En este trabajo se demostró que los fármacos AZD6244 y GDC-0941 inhiben la activación de las cascadas de señalización Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt al prevenir la fosforilación de ERK y Akt. También se encontró que la inhibición de PI3K reduce la fosforilación de proteínas río abajo de Akt como S6 y 4EBP1, y que la inhibición conjunta de MEK y PI3K posee un efecto global sobre la fosforilación de las proteínas mencionadas. Esto tiene particular importancia ya que parte de las líneas celulares estudiadas son sensibles a la inhibición de PI3K. En concordancia con lo anterior, varias proteínas diferencialmente expresadas han sido previamente relacionadas con la vía PI3K/Akt, y también pueden constituir nuevos puntos de intervención molecular para superar la resistencia a AZD6244.

El proteoma de las células resistentes tiene funciones asociadas al metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos, apoptosis, transporte de proteínas y aminoácidos, movilidad celular, síntesis de proteínas e inducción de la proliferación celular en general. Algunas proteínas han sido anteriormente vinculadas con la resistencia a fármacos y con la actividad de factores de transcripción. Estas funciones podrían facilitar a las células resistentes la preservación de la señal oncogénica aún después del bloqueo de la actividad de las vías de MEK y PI3K. La variedad de probables funciones biológicas sugiere una distribución concertada de la composición proteómica celular y un posible mecanismo *per se* para el mantenimiento del fenotipo celular resistente.

Entre los potenciales blancos terapéuticos encontrados se encuentra la proteína Bax, que es responsable de iniciar la apoptosis, se encuentra con menor expresión en las células resistentes y es regulada negativamente por Akt, aunque deben estudiarse otros mecanismos por los que disminuye su expresión. La proteína nestina es conocida por promover la resistencia a tratamientos dirigidos contra el cáncer de páncreas, por lo que un tratamiento conjunto con AZD6244 y/o GDC-

0941 y la inhibición de nestina podría resultar efectivo. PAK4 también es un blanco terapéutico atractivo pues se ha demostrado que contribuye a la supervivencia celular regulando el ciclo celular y suprimiendo la apoptosis mientras que su inhibición restaura la sensibilidad a tratamientos farmacológicos y reduce el crecimiento tumoral, lo que incita a seguir con las investigaciones en curso sobre su papel en la resistencia analizada en este trabajo. FADS2 es finalmente otra proteína importante ya que está relacionada con la síntesis de la membrana celular, indispensable para la proliferación, aunque aún se debe estudiar con mayor profundidad el efecto de la composición de la membrana sobre el mantenimiento y activación de señales, así como sobre la internalización de fármacos.

En este trabajo se describen algunos de los mecanismos posiblemente implicados en el mantenimiento de la señal oncogénica; sin embargo, es necesario estudiar con mayor profundidad en futuras investigaciones la participación puntual de las proteínas señaladas en la resistencia natural y su interacción con las vías de señalización Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt.

## **8. Perspectivas**

Los resultados de este trabajo pueden servir como base para la investigación del rol particular de varias proteínas en la resistencia natural de las células de cáncer de páncreas a la terapia molecular dirigida con inhibidores de MEK y/o PI3K.

Es recomendable incrementar el panel de células para llevar a cabo una comparación que permita obtener datos aún más generales sobre el proteoma resistente en el cáncer pancreático.

La utilización de un método de análisis alternativo al utilizado en este trabajo para corroborar la expresión diferencial de proteínas específicas podría contribuir a la solidez de las futuras investigaciones sobre su relevancia en la respuesta a la inhibición de la señal oncogénica.

## 9. Referencias

1. Maisonneuve, P. and A. Lowenfels, *Epidemiology and prospects for prevention of pancreatic cancer*. Pancreatic cancer [Internet]. 2nd ed. New York: Springer New York, 2016: p. 1-16.
2. Pereira, S.P., L. Oldfield, A. Ney, P.A. Hart, M.G. Keane, S.J. Pandol, D. Li, W. Greenhalf, C.Y. Jeon, and E.J. Koay, *Early detection of pancreatic cancer*. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2020. **5**(7): p. 698-710.
3. Hruban, R.H., M. Goggins, J. Parsons, and S.E. Kern, *Progression model for pancreatic cancer*. Clinical cancer research, 2000. **6**(8): p. 2969-2972.
4. Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R.H. Hruban, and M. Goggins, *Pancreatic cancer*. The lancet, 2011. **378**(9791): p. 607-620.
5. Kleeff, J., M. Korc, M. Apte, C. La Vecchia, C.D. Johnson, A.V. Biankin, R.E. Neale, M. Tempero, D.A. Tuveson, and R.H. Hruban, *Pancreatic cancer*. Nature reviews Disease primers, 2016. **2**(1): p. 1-22.
6. Bournet, B., C. Buscail, F. Muscari, P. Cordelier, and L. Buscail, *Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities*. European journal of cancer, 2016. **54**: p. 75-83.
7. Bengtsson, A., R. Andersson, and D. Ansari, *The actual 5-year survivors of pancreatic ductal adenocarcinoma based on real-world data*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 1-9.
8. Springfield, C., D. Jäger, M.W. Büchler, O. Strobel, T. Hackert, D.H. Palmer, and J.P. Neoptolemos, *Chemotherapy for pancreatic cancer*. La Presse Medicale, 2019. **48**(3): p. e159-e174.
9. Lee, Y.T., Y.J. Tan, and C.E. Oon, *Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity*. European journal of pharmacology, 2018. **834**: p. 188-196.
10. Junttila, M.R., V. Devasthali, J.H. Cheng, J. Castillo, C. Metcalfe, A.C. Clermont, D. Den Otter, E. Chan, H. Bou-Reslan, and T. Cao, *Modeling targeted inhibition of MEK and PI3 kinase in human pancreatic cancer*. Molecular cancer therapeutics, 2015. **14**(1): p. 40-47.
11. Cao, Z., Q. Liao, M. Su, K. Huang, J. Jin, and D. Cao, *AKT and ERK dual inhibitors: the way forward?* Cancer letters, 2019. **459**: p. 30-40.
12. Waters, A.M. and C.J. Der, *KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2018. **8**(9): p. a031435.
13. Bryant, K.L., J.D. Mancias, A.C. Kimmelman, and C.J. Der, *KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation*. Trends in biochemical sciences, 2014. **39**(2): p. 91-100.
14. Kojima, Y., R.S. Maskey, and Y. Machida, *Cell cycle machinery and its alterations in pancreatic cancer*, in *Pancreatic Cancer*. 2018, Springer New York. p. 19-49.
15. Simanshu, D.K., D.V. Nissley, and F. McCormick, *RAS proteins and their regulators in human disease*. Cell, 2017. **170**(1): p. 17-33.
16. Shaul, Y.D. and R. Seger, *The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2007. **1773**(8): p. 1213-1226.
17. Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S.J. Korsmeyer, *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-XL*. Cell, 1996. **87**(4): p. 619-628.



18. Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L.H. Boise, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer, *Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death*. Cell, 1995. **80**(2): p. 285-291.
19. McCubrey, J.A., L.S. Steelman, W.H. Chappell, S.L. Abrams, E.W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D.M. Terrian, M. Milella, and A. Tafuri, *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2007. **1773**(8): p. 1263-1284.
20. Edlich, F., S. Banerjee, M. Suzuki, M.M. Cleland, D. Arnoult, C. Wang, A. Neutzner, N. Tjandra, and R.J. Youle, *Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol*. Cell, 2011. **145**(1): p. 104-116.
21. Bogner, C., J. Kale, J. Pogmore, X. Chi, A. Shamas-Din, C. Fradin, B. Leber, and D.W. Andrews, *Allosteric regulation of BH3 proteins in Bcl-xL complexes enables switch-like activation of Bax*. Molecular Cell, 2020. **77**(4): p. 901-912. e9.
22. Sears, R., F. Nuckolls, E. Haura, Y. Taya, K. Tamai, and J.R. Nevins, *Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability*. Genes & development, 2000. **14**(19): p. 2501-2514.
23. Aksamitiene, E., A. Kiyatkin, and B.N. Kholodenko, *Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance*. Biochemical Society Transactions, 2012. **40**(1): p. 139-146.
24. Guan, K.-L., C. Figueroa, T.R. Brtva, T. Zhu, J. Taylor, T.D. Barber, and A.B. Vojtek, *Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(35): p. 27354-27359.
25. Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and P.P. Pandolfi, *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*. Cell, 2005. **121**(2): p. 179-193.
26. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends in biochemical sciences, 2011. **36**(6): p. 320-328.
27. Aoki, M. and T. Fujishita, *Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR axis*. Viruses, Genes, and Cancer, 2017: p. 153-189.
28. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-1274.
29. Cai, S.-L., A.R. Tee, J.D. Short, J.M. Bergeron, J. Kim, J. Shen, R. Guo, C.L. Johnson, K. Kiguchi, and C.L. Walker, *Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning*. The Journal of cell biology, 2006. **173**(2): p. 279-289.
30. Qin, X., B. Jiang, and Y. Zhang, *4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein*. Cell cycle, 2016. **15**(6): p. 781-786.
31. Musa, J., M. Orth, M. Dallmayer, M. Baldauf, C. Pardo, B. Rotblat, T. Kirchner, G. Leprivier, and T. Grünewald, *Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1): a master regulator of mRNA translation involved in tumorigenesis*. Oncogene, 2016. **35**(36): p. 4675-4688.
32. Magnuson, B., B. Ekim, and D.C. Fingar, *Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks*. Biochemical Journal, 2012. **441**(1): p. 1-21.
33. Tavares, M.R., I.C. Pavan, C.L. Amaral, L. Meneguello, A.D. Luchessi, and F.M. Simabuco, *The S6K protein family in health and disease*. Life sciences, 2015. **131**: p. 1-10.
34. Aguilar-Valdés, A., L.G. Noriega, A.R. Tovar, M.d.J. Ibarra-Sánchez, V.A. Sosa-Hernández, J.L. Maravillas-Montero, and J. Martínez-Aguilar, *SWATH-MS proteomics of PANC-1 and MIA*

- PaCa-2 pancreatic cancer cells allows identification of drug targets alternative to MEK and PI3K inhibition.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021. **552**: p. 23-29.
35. Kiessling, M. and G. Rogler, *Targeting the RAS pathway by mitogen-activated protein kinase inhibitors.* Swiss medical weekly, 2015. **145**: p. w14207.
  36. Alagesan, B., G. Contino, A.R. Guimaraes, R.B. Corcoran, V. Deshpande, G.R. Wojtkiewicz, A.F. Hezel, K.-K. Wong, M. Loda, and R. Weissleder, *Combined MEK and PI3K inhibition in a mouse model of pancreatic cancer.* Clinical cancer research, 2015. **21**(2): p. 396-404.
  37. Workman, P., P.A. Clarke, F.I. Raynaud, and R.L. van Montfort, *Drugging the PI3 kinome: from chemical tools to drugs in the clinic.* Cancer research, 2010. **70**(6): p. 2146-2157.
  38. Campbell, M.K., S.O. Farrell, A.C. Reyes, J.H.C. Gasco, J.B. Talavera, A.C. Bonilla, and G.R. Muñoz, *Bioquímica*. Vol. 4. 2004: Thomson.
  39. Aslam, B., M. Basit, M.A. Nisar, M. Khurshid, and M.H. Rasool, *Proteomics: technologies and their applications.* Journal of chromatographic science, 2017. **55**(2): p. 182-196.
  40. Harper, J.W. and E.J. Bennett, *Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance.* Nature, 2016. **537**(7620): p. 328-338.
  41. Krasny, L. and P.H. Huang, *Data-independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) for proteomic applications in oncology.* Molecular omics, 2021. **17**(1): p. 29-42.
  42. Cintas, C., T. Douché, N. Therville, S. Arcucci, F. Ramos-Delgado, C. Basset, B. Thibault, and J. Guillermet-Guibert, *Signal-targeted therapies and resistance mechanisms in pancreatic cancer: future developments reside in proteomics.* Cancers, 2018. **10**(6): p. 174.
  43. Wang, X., J. Niu, J. Li, X. Shen, S. Shen, R.M. Straubinger, and J. Qu, *Temporal effects of combined birinapant and paclitaxel on pancreatic cancer cells investigated via large-scale, ion-current-based quantitative proteomics (IonStar).* Molecular & Cellular Proteomics, 2018. **17**(4): p. 655-671.
  44. Olson, B.J., *Assays for determination of protein concentration.* Current protocols in pharmacology, 2016. **73**(1): p. A. 3A. 1-A. 3A. 32.
  45. Sapan, C.V., R.L. Lundblad, and N.C. Price, *Colorimetric protein assay techniques.* Biotechnology and applied Biochemistry, 1999. **29**(2): p. 99-108.
  46. Noble, J.E., *Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes.* Methods in enzymology, 2014. **536**: p. 17-26.
  47. J.M., W., *The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation.* Walker J.M. (eds) Basic Protein and Peptide Protocols. Methods in Molecular Biology™, 1994. **32**(Humana Press).
  48. Ludwig, C., L. Gillet, G. Rosenberger, S. Amon, B.C. Collins, and R. Aebersold, *Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial.* Molecular systems biology, 2018. **14**(8): p. e8126.
  49. Taylor, S.C. and A. Posch, *The design of a quantitative western blot experiment.* BioMed research international, 2014. **2014**.
  50. Mishra, M., S. Tiwari, and A.V. Gomes, *Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques.* Expert review of proteomics, 2017. **14**(11): p. 1037-1053.
  51. Mahmood, T. and P.-C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting.* North American journal of medical sciences, 2012. **4**(9): p. 429.
  52. Kurien, B.T. and R.H. Scofield, *Western blotting: an introduction.* Western Blotting, 2015: p. 17-30.
  53. Kurien, B.T. and R.H. Scofield, *Western blotting.* Methods, 2006. **38**(4): p. 283-293.

54. Baeyens, W., S. Schulman, A. Calokerinos, Y. Zhao, A.M.G. Campana, K. Nakashima, and D. De Keukeleire, *Chemiluminescence-based detection: principles and analytical applications in flowing streams and in immunoassays*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1998. **17**(6-7): p. 941-953.
55. Im, K., S. Mareninov, M.F.P. Diaz, and W.H. Yong, *An introduction to performing immunofluorescence staining*. Biobanking, 2019: p. 299-311.
56. Hamidi, H., M. Lu, K. Chau, L. Anderson, M. Fejzo, C. Ginther, R. Linnartz, A. Zubel, D. Slamon, and R. Finn, *KRAS mutational subtype and copy number predict in vitro response of human pancreatic cancer cell lines to MEK inhibition*. British journal of cancer, 2014. **111**(9): p. 1788-1801.
57. Beech, J.R., *Precision Medicine in Pancreatic Cancer*, in *Biomedical Engineering*. 2015, University of Virginia: The School of Engineering and Applied Science. p. 183.
58. Yeh, T.C., V. Marsh, B.A. Bernat, J. Ballard, H. Colwell, R.J. Evans, J. Parry, D. Smith, B.J. Brandhuber, and S. Gross, *Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**(5): p. 1576-1583.
59. Folkes, A.J., K. Ahmadi, W.K. Alderton, S. Alix, S.J. Baker, G. Box, I.S. Chuckowree, P.A. Clarke, P. Depledge, and S.A. Eccles, *The identification of 2-(1 H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno [3, 2-d] pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer*. Journal of medicinal chemistry, 2008. **51**(18): p. 5522-5532.
60. Ishiwata, T., Y. Matsuda, and Z. Naito, *Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis*. World journal of gastroenterology: WJG, 2011. **17**(4): p. 409.
61. Matsuda, Y., Z. Naito, K. Kawahara, N. Nakazawa, M. Korc, and T. Ishiwata, *Nestin is a novel target for suppressing pancreatic cancer cell migration, invasion and metastasis*. Cancer biology & therapy, 2011. **11**(5): p. 512-523.
62. Matsuda, Y., S. Kure, and T. Ishiwata, *Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer*. Medical molecular morphology, 2012. **45**(2): p. 59-65.
63. Sahlgren, C.M., A. Mikhailov, J. Hellman, Y.-H. Chou, U. Lendahl, R.D. Goldman, and J.E. Eriksson, *Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(19): p. 16456-16463.
64. Su, H.-T., C.-C. Weng, P.-J. Hsiao, L.-H. Chen, T.-L. Kuo, Y.-W. Chen, K.-K. Kuo, and K.-H. Cheng, *Stem cell marker nestin is critical for TGF- $\beta$ 1-mediated tumor progression in pancreatic cancer*. Molecular Cancer Research, 2013. **11**(7): p. 768-779.
65. Matsuda, Y., T. Ishiwata, H. Yoshimura, S. Yamashita, T. Ushijima, and T. Arai, *Systemic administration of small interfering RNA targeting human nestin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and metastasis*. Pancreas, 2016. **45**(1): p. 93-100.
66. Cao, J., Q. Mu, and H. Huang, *The roles of insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 in cancer and cancer stem cells*. Stem cells international, 2018. **2018**.
67. Dahlem, C., A. Barghash, P. Puchas, J. Haybaeck, and S.M. Kessler, *The insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein IMP2/IGF2BP2 is overexpressed and correlates with poor survival in pancreatic cancer*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(13): p. 3204.

68. Xu, X., Y. Yu, K. Zong, P. Lv, and Y. Gu, *Up-regulation of IGF2BP2 by multiple mechanisms in pancreatic cancer promotes cancer proliferation by activating the PI3K/Akt signaling pathway*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2019. **38**(1): p. 1-14.
69. Huang, S., Z. Wu, Y. Cheng, W. Wei, and L. Hao, *Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2 promotes aerobic glycolysis and cell proliferation in pancreatic ductal adenocarcinoma via stabilizing GLUT1 mRNA*. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2019. **51**(7): p. 743-752.
70. Brisson, L., P. Bański, M. Sboarina, C. Dethier, P. Danhier, M.-J. Fontenille, V.F. Van Hée, T. Vazeille, M. Tardy, and J. Falces, *Lactate dehydrogenase B controls lysosome activity and autophagy in cancer*. Cancer Cell, 2016. **30**(3): p. 418-431.
71. Luo, Y., Z. Yang, D. Li, Z. Liu, L. Yang, Q. Zou, and Y. Yuan, *LDHB and FABP4 are associated with progression and poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinomas*. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2017. **25**(5): p. 351-357.
72. Zha, X., F. Wang, Y. Wang, S. He, Y. Jing, X. Wu, and H. Zhang, *Lactate dehydrogenase B is critical for hyperactive mTOR-mediated tumorigenesis*. Cancer research, 2011. **71**(1): p. 13-18.
73. Kanai, Y., *Amino acid transporter LAT1 (SLC7A5) as a molecular target for cancer diagnosis and therapeutics*. Pharmacology & Therapeutics, 2021: p. 107964.
74. Kaira, K., Y. Sunose, K. Arakawa, T. Ogawa, N. Sunaga, K. Shimizu, H. Tominaga, N. Oriuchi, H. Itoh, and S. Nagamori, *Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer*. British journal of cancer, 2012. **107**(4): p. 632-638.
75. Hayashi, K., P. Jutabha, H. Endou, and N. Anzai, *c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells*. Oncology reports, 2012. **28**(3): p. 862-866.
76. Li, Y., W. Wang, X. Wu, S. Ling, Y. Ma, and P. Huang, *SLC7A5 serves as a prognostic factor of breast cancer and promotes cell proliferation through activating AKT/mTORC1 signaling pathway*. Annals of Translational Medicine, 2021. **9**(10).
77. Mokranjac, D. and W. Neupert, *The many faces of the mitochondrial TIM23 complex*. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2010. **1797**(6-7): p. 1045-1054.
78. Zhang, X., S. Han, H. Zhou, L. Cai, J. Li, N. Liu, Y. Liu, L. Wang, C. Fan, and A. Li, *TIMM50 promotes tumor progression via ERK signaling and predicts poor prognosis of non-small cell lung cancer patients*. Molecular carcinogenesis, 2019. **58**(5): p. 767-776.
79. Sankala, H., C. Vaughan, J. Wang, S. Deb, and P.R. Graves, *Upregulation of the mitochondrial transport protein, Tim50, by mutant p53 contributes to cell growth and chemoresistance*. Archives of biochemistry and biophysics, 2011. **512**(1): p. 52-60.
80. Gao, S.-P., H.-F. Sun, H.-L. Jiang, L.-D. Li, X. Hu, X.-E. Xu, and W. Jin, *Loss of TIM50 suppresses proliferation and induces apoptosis in breast cancer*. Tumor Biology, 2016. **37**(1): p. 1279-1287.
81. Hoeflich, K.P. and M. Ikura, *Radixin: cytoskeletal adopter and signaling protein*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2004. **36**(11): p. 2131-2136.
82. Zhu, Y.-W., J.-K. Yan, J.-J. Li, Y.-M. Ou, and Q. Yang, *Knockdown of radixin suppresses gastric cancer metastasis in vitro by up-regulation of e-cadherin via NF-κB/snail pathway*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2016. **39**(6): p. 2509-2521.
83. Jiang, Q.-H., A.-X. Wang, and Y. Chen, *Radixin enhances colon cancer cell invasion by increasing MMP-7 production via Rac1-ERK pathway*. The Scientific World Journal, 2014. **2014**.

84. Chen, S.-D., M.-M. Song, Z.-Q. Zhong, N. Li, P.-L. Wang, S. Cheng, R.-X. Bai, and H.-S. Yuan, *Knockdown of radixin by RNA interference suppresses the growth of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012. **13**(3): p. 753-759.
85. Won, S.-Y., J.-J. Park, E.-Y. Shin, and E.-G. Kim, *PAK4 signaling in health and disease: Defining the PAK4–CREB axis*. Experimental & molecular medicine, 2019. **51**(2): p. 1-9.
86. Tyagi, N., A. Bhardwaj, A.P. Singh, S. McClellan, J.E. Carter, and S. Singh, *p-21 activated kinase 4 promotes proliferation and survival of pancreatic cancer cells through AKT-and ERK-dependent activation of NF- $\kappa$ B pathway*. Oncotarget, 2014. **5**(18): p. 8778.
87. Tyagi, N., S. Marimuthu, A. Bhardwaj, S.K. Deshmukh, S.K. Srivastava, A.P. Singh, S. McClellan, J.E. Carter, and S. Singh, *p-21 activated kinase 4 (PAK4) maintains stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells through activation of STAT3 signaling*. Cancer letters, 2016. **370**(2): p. 260-267.
88. Aboukameel, A., I. Muqbil, W. Senapedis, E. Baloglu, Y. Landesman, S. Shacham, M. Kauffman, P.A. Philip, R.M. Mohammad, and A.S. Azmi, *Novel p21-activated kinase 4 (PAK4) allosteric modulators overcome drug resistance and stemness in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Molecular cancer therapeutics, 2017. **16**(1): p. 76-87.
89. Xu, L., F.N. Faruqu, Y.M. Lim, K.Y. Lim, R. Liam-Or, A.A. Walters, P. Lavender, D. Fear, C.M. Wells, and J.T.-W. Wang, *Exosome-mediated RNAi of PAK4 prolongs survival of pancreatic cancer mouse model after loco-regional treatment*. Biomaterials, 2021. **264**: p. 120369.
90. Moon, S.-U., J.W. Kim, J.H. Sung, M.H. Kang, S.-H. Kim, H. Chang, J.-O. Lee, Y.J. Kim, K.-W. Lee, and J.H. Kim, *P21-activated kinase 4 (PAK4) as a predictive marker of gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cell lines*. Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association, 2015. **47**(3): p. 501.
91. Maik-Rachline, G., A. Hacoheh-Lev-Ran, and R. Seger, *Nuclear ERK: mechanism of translocation, substrates, and role in cancer*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(5): p. 1194.
92. Xu, J., W. Xu, Y. Xuan, Z. Liu, Q. Sun, and C. Lan, *Pancreatic Cancer Progression Is Regulated by IPO7/p53/LncRNA MALAT1/MiR-129-5p Positive Feedback Loop*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021: p. 2535.
93. Chen, J., Y. Hu, Y. Teng, and B. Yang, *Increased Nuclear Transporter Importin 7 Contributes to the Tumor Growth and Correlates With CD8 T Cell Infiltration in Cervical Cancer*. Frontiers in cell and developmental biology, 2021. **9**.
94. Plotnikov, A., K. Flores, G. Maik-Rachline, E. Zehorai, E. Kapri-Pardes, D.A. Berti, T. Hanoch, M.J. Besser, and R. Seger, *The nuclear translocation of ERK1/2 as an anticancer target*. Nature communications, 2015. **6**(1): p. 1-11.
95. Ranjan, A., S.V. Iyer, C. Ward, T. Link, F.J. Diaz, A. Dhar, O.W. Tawfik, S.A. Weinman, Y. Azuma, and T. Izumi, *MTBP inhibits the Erk1/2-Elk-1 signaling in hepatocellular carcinoma*. Oncotarget, 2018. **9**(30): p. 21429.
96. Yang, H.-C., A. Stern, and D.T.-Y. Chiu, *G6PD: A hub for metabolic reprogramming and redox signaling in cancer*. biomedical journal, 2021. **44**(3): p. 285-292.
97. Yang, H.-C., Y.-H. Wu, W.-C. Yen, H.-Y. Liu, T.-L. Hwang, A. Stern, and D.T.-Y. Chiu, *The redox role of G6PD in cell growth, cell death, and cancer*. Cells, 2019. **8**(9): p. 1055.
98. Ying, H., A.C. Kimmelman, C.A. Lyssiotis, S. Hua, G.C. Chu, E. Fletcher-Sananikone, J.W. Locasale, J. Son, H. Zhang, and J.L. Coloff, *Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism*. Cell, 2012. **149**(3): p. 656-670.

99. Yamawaki, K., Y. Mori, H. Sakai, Y. Kanda, D. Shiokawa, H. Ueda, T. Ishiguro, K. Yoshihara, K. Nagasaka, and T. Onda, *Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin chemoresistance*. *Cancer Letters*, 2021. **521**: p. 29-38.
100. Ju, H., Y. Lu, Q. Wu, J. Liu, Z. Zeng, H. Mo, Y. Chen, T. Tian, Y. Wang, and T. Kang, *Disrupting G6PD-mediated Redox homeostasis enhances chemosensitivity in colorectal cancer*. *Oncogene*, 2017. **36**(45): p. 6282-6292.
101. Chen, X., Z. Xu, Z. Zhu, A. Chen, G. Fu, Y. Wang, H. Pan, and B. Jin, *Modulation of G6PD affects bladder cancer via ROS accumulation and the AKT pathway in vitro*. *International journal of oncology*, 2018. **53**(4): p. 1703-1712.
102. Sharma, N., A. Bhushan, J. He, G. Kaushal, and V. Bhardwaj, *Metabolic plasticity imparts erlotinib-resistance in pancreatic cancer by upregulating glucose-6-phosphate dehydrogenase*. *Cancer & metabolism*, 2020. **8**(1): p. 1-11.
103. Young, R.S., A.P. Bowman, E.D. Williams, K.D. Tousignant, C.L. Bidgood, V.R. Narreddula, R. Gupta, D.L. Marshall, B.L. Poad, and C.C. Nelson, *Apocryphal FADS2 activity promotes fatty acid diversification in cancer*. *Cell Reports*, 2021. **34**(6): p. 108738.
104. Vriens, K., S. Christen, S. Parik, D. Broekaert, K. Yoshinaga, A. Talebi, J. Dehairs, C. Escalona-Noguero, R. Schmieder, and T. Cornfield, *Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity*. *Nature*, 2019. **566**(7744): p. 403-406.
105. Triki, M., G. Rinaldi, M. Planque, D. Broekaert, A.M. Winkelkotte, C.R. Maier, S.J. Raman, A. Vandekerke, J. Van Elsen, and M.F. Orth, *mTOR signaling and SREBP activity increase FADS2 expression and can activate sapienate biosynthesis*. *Cell reports*, 2020. **31**(12): p. 107806.
106. Küçüksayan, E., A. Sansone, C. Chatgililoglu, T. Ozben, D. Tekeli, G. Talibova, and C. Ferreri, *Sapienic Acid Metabolism Influences Membrane Plasticity and Protein Signaling in Breast Cancer Cell Lines*. *Cells*, 2022. **11**(2): p. 225.
107. Testa, J.R. and A. Bellacosa, *AKT plays a central role in tumorigenesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(20): p. 10983-10985.
108. Banno, E., Y. Togashi, M.A. De Velasco, T. Mizukami, Y. Nakamura, M. Terashima, K. Sakai, Y. Fujita, K. Kamata, and M. Kitano, *Clinical significance of Akt2 in advanced pancreatic cancer treated with erlotinib*. *International journal of oncology*, 2017. **50**(6): p. 2049-2058.
109. Arboleda, M.J., J.F. Lyons, F.F. Kabbinar, M.R. Bray, B.E. Snow, R. Ayala, M. Danino, B.Y. Karlan, and D.J. Slamon, *Overexpression of AKT2/protein kinase B $\beta$  leads to up-regulation of  $\beta$ 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells*. *Cancer research*, 2003. **63**(1): p. 196-206.
110. Cheng, J.Q., B. Ruggeri, W.M. Klein, G. Sonoda, D.A. Altomare, D.K. Watson, and J.R. Testa, *Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(8): p. 3636-3641.
111. Sun, Y., T. Zhang, C. Wang, X. Jin, C. Jia, S. Yu, and J. Chen, *MiRNA-615-5p functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting AKT2*. *PloS one*, 2015. **10**(4): p. e0119783.
112. Li, H., J. Li, B. Shi, and F. Chen, *MicroRNA-296 targets AKT2 in pancreatic cancer and functions as a potential tumor suppressor*. *Molecular medicine reports*, 2017. **16**(1): p. 466-472.

113. Shi, X., Z. Liang, X. Ren, and T. Liu, *Combined silencing of K-ras and Akt2 oncogenes achieves synergistic effects in inhibiting pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo*. *Cancer gene therapy*, 2009. **16**(3): p. 227-236.
114. Goke, R., P. Barth, A. Schmidt, B. Samans, and B. Lankat-Buttgereit, *Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21Waf1/Cip1*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2004. **287**(6): p. C1541-C1546.
115. Cmarik, J.L., H. Min, G. Hegamyer, S. Zhan, M. Kulesz-Martin, H. Yoshinaga, S. Matsushashi, and N.H. Colburn, *Differentially expressed protein Pcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(24): p. 14037-14042.
116. Afonja, O., D. Juste, S. Das, S. Matsushashi, and H.H. Samuels, *Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis*. *Oncogene*, 2004. **23**(49): p. 8135-8145.
117. Shibahara, K., M. Asano, Y. Ishida, T. Aoki, T. Koike, and T. Honjo, *Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death*. *Gene*, 1995. **166**(2): p. 297-301.
118. Loh, P.G., H.S. Yang, M.A. Walsh, Q. Wang, X. Wang, Z. Cheng, D. Liu, and H. Song, *Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pcd4*. *The EMBO journal*, 2009. **28**(3): p. 274-285.
119. Yang, H.-S., A.P. Jansen, A.A. Komar, X. Zheng, W.C. Merrick, S. Costes, S.J. Lockett, N. Sonenberg, and N.H. Colburn, *The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation*. *Molecular and cellular biology*, 2003. **23**(1): p. 26-37.
120. Palamarchuk, A., A. Efanov, V. Maximov, R.I. Aqeilan, C.M. Croce, and Y. Pekarsky, *Akt phosphorylates and regulates Pcd4 tumor suppressor protein*. *Cancer research*, 2005. **65**(24): p. 11282-11286.
121. Bitomsky, N., M. Böhm, and K.-H. Klempnauer, *Transformation suppressor protein Pcd4 interferes with JNK-mediated phosphorylation of c-Jun and recruitment of the coactivator p300 by c-Jun*. *Oncogene*, 2004. **23**(45): p. 7484-7493.
122. Cui, H., Q. Wang, Z. Lei, M. Feng, Z. Zhao, Y. Wang, and G. Wei, *DTL promotes cancer progression by PDCD4 ubiquitin-dependent degradation*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019. **38**(1): p. 1-13.
123. Yu, G., B. Jia, Y. Cheng, L. Zhou, B. Qian, Z. Liu, and Y. Wang, *MicroRNA-429 sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine through regulation of PDCD4*. *American journal of translational research*, 2017. **9**(11): p. 5048.
124. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. *Oncogene*, 2007. **26**(9): p. 1324-1337.
125. Peña-Blanco, A. and A.J. García-Sáez, *Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis*. *The FEBS journal*, 2018. **285**(3): p. 416-431.
126. Cory, S. and J.M. Adams, *Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch*. *Cancer cell*, 2005. **8**(1): p. 5-6.
127. Liu, Z., Y. Ding, N. Ye, C. Wild, H. Chen, and J. Zhou, *Direct activation of Bax protein for cancer therapy*. *Medicinal research reviews*, 2016. **36**(2): p. 313-341.
128. Yamaguchi, H. and H.-G. Wang, *The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change*. *Oncogene*, 2001. **20**(53): p. 7779-7786.

129. Xu, Z.-W., H. Friess, M.W. Büchler, and M. Solioz, *Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents*. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2002. **49**(6): p. 504-510.
130. Balabanov, D., L. Zhao, Z. Zhu, Z.E. Hunzeker, H.M. Tonner, V.A. Ding, M.R. Wakefield, Q. Bai, and Y. Fang, *IL-29 Exhibits anti-tumor effect on Pan-48 pancreatic cancer cells by up-regulation of P21 and Bax*. *Anticancer research*, 2019. **39**(7): p. 3493-3498.