

Títol del treball:

Un nou inhibidor sintètic de la sintasa d'àcids grassos (FASN) amb efectes citotòxics

Estudiant: Emma Polonio Alcalá

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: emmapolonioalcala@gmail.com

Tutor: Maria Vilanova Bruges

Cotutor*: Ariadna Sarrats Carbó

Empresa/institució: Grup de Recerca en Noves Diances Terapèutiques (TargetsLab)

Departament de Ciències Mèdiques (UdG)

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Maria Vilanova Bruges

Nom del cotutor*: Ariadna Sarrats Carbó

Empresa / institució: Grup de Recerca en Noves Diances Terapèutiques (TargetsLab), Departament de Ciències Mèdiques (UdG)

Correu(s) electrònic(s):

maria.vilanova@udg.edu

ariadna.sarrats@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ACC	Carboxilasa Acetil-CoA
ACLY	ATP Citrat Liasa
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i>
Akt	Proteïna Quinasa B
AMPK	Proteïna Quinasa Activada per AMP
BSA	Albúmina de Sèrum Boví
CPT-1	Carnitina Palmitoil-Transferasa 1
DH	Deshidratasa
EGCG	Epigal·locatequina-3-Gallat
ER	Enoil-Acil Reductasa
ERK1/2	Quinasa Extracel·lular Reguladora de Senyals
FASN	Sintasa d'Àcids Grassos
FBS	Sèrum Fetal Boví
FIX	FASN Inhibitor X
KR	β -Cetoacil Reductasa
KS	β -Cetoacil Sintasa
MAPK	Proteïna Quinasa Activada per Mitògens
MAT	Malonil Acetil Transferasa
mTOR	Diana de la Rapamicina per als Mamífers
PBS	Tampó Fosfat Salí
PI3K	Fosfatidil Inositol 3-Quinasa
PPB	Tampó Fosfat
SREBP-1	Proteïna d'Unió a l'Element Regulada d'Esterols
SREBP-1c	Proteïna d'Unió a l'Element Regulada d'Esterols 1c
TE	Tioesterasa

RESUM

El càncer de mama afecta a més d'un milió i mig de dones i causa la mort a més de 500.000 arreu del món cada any. Les cèl·lules tumorals presenten la capacitat de sintetitzar *de novo* els àcids grassos per suplir la gran demanda d'energia i síntesis d'estructures derivades dels seus elevats índexs de proliferació. Així doncs, la sintasa d'àcids grassos (FASN), un enzim de 270 KDa responsable de la lipogènesi, es troba sobreexpressada i hiperactivada en la majoria de càncers, incloent el de mama. La inhibició de FASN causa citotoxicitat específica a les cèl·lules canceroses. Per aquest motiu, el desenvolupament de fàrmacs inhibidors de FASN suposa una interessant estratègia terapèutica pel càncer.

En aquest treball s'ha estudiat una molècula potencialment inhibidora de FASN, el *FASN Inhibitor X* (FIX), i s'ha analitzat el seu efecte sobre cèl·lules de càncer de mama HER2+. S'ha avaluat com afectava la proliferació cel·lular, l'expressió i activitat de FASN i vies de senyalització relacionades, com són la de PI3K/Akt i AMPK. Els resultats obtinguts han mostrat que el compost presenta efectes antiproliferatius i que inhibeix l'activitat de FASN sense modificar-ne la seva expressió. En l'estudi de les vies de senyalització, s'ha pogut observar una inhibició de proteïnes implicades en la proliferació cel·lular, com són Akt o S6, al mateix temps que una activació d'AMPK, proteïna sensor dels nivells energètics cel·lulars. AMPK es troba activa a concentracions del fàrmac on Akt es troba inhibida. La inhibició d'Akt concomitant a l'activació d'AMPK s'observa també en altres fàrmacs inhibidors de FASN, per la qual cosa aquests dos mecanismes podrien estar relacionats. Tot i així, la relació entre AMPK i Akt no està ben descrita i caldria realitzar estudis més concrets per tal confirmar-ho.

En resum, el compost FIX ha mostrat capacitat per inhibir l'activitat enzimàtica de FASN i bloquejar vies de senyalització proliferatives, pel què podria resultar un bon fàrmac anticancerígen de confirmar-se aquests resultats en estudis amb altres línies cel·lulars i models animals.

RESUMEN

El cáncer de mama afecta a más de un millón y medio de mujeres y causa la muerte a más de 500.000 en todo el mundo cada año. Las células tumorales presentan la capacidad de sintetizar *de novo* los ácidos grasos para suplir la gran demanda de energía y síntesis de estructuras derivadas de los elevados índices de proliferación. Así pues, la sintasa de ácidos grasos (FASN), una enzima de 270 KDa responsable de la lipogénesis, se encuentra sobreexpresada y hiperactivada en la mayoría de cánceres, incluyendo el de mama. La inhibición de FASN causa citotoxicidad específica a las células cancerosas. Por este motivo, el desarrollo de fármacos inhibidores de FASN supone una interesante estrategia terapéutica para el cáncer.

En este trabajo se ha estudiado una molécula potencialmente inhibidora de FASN, el *FASN Inhibitor X* (FIX), y se ha analizado su efecto sobre células de cáncer de mama HER2+. Se ha avaluado como afectaba a la proliferación celular, a la expresión y actividad de FASN y a las vías de señalización relacionadas, como son la de PI3K/Akt y AMPK. Los resultados obtenidos muestran que el compuesto presenta efectos antiproliferativos y que inhibe la actividad de FASN sin modificar su expresión. En el estudio de las vías de señalización, se ha podido observar una inhibición de proteínas implicadas en la proliferación celular, como son Akt o S6, al mismo tiempo que una activación de AMPK, proteína sensor de los niveles energéticos celulares. AMPK se encuentra activa en concentraciones del fármaco donde Akt se encuentra inhibida. La inhibición de Akt concomitante a la activación de AMPK se observa también en otros fármacos inhibidores de FASN, por la cual cosa estos dos mecanismos podrían estar relacionados. Aun así, la relación entre AMPK y Akt no está bien descrita y haría falta realizar estudios más concretos para confirmarla.

En resumen, el compuesto FIX ha mostrado capacidad para inhibir la actividad enzimática de FASN y bloquear vías de señalización proliferativas, por lo que podría resultar un buen fármaco anticancerígeno de confirmarse estos resultados en estudios con otras líneas celulares y modelos animales.

ABSTRACT

Breast cancer affects more than 1.500.000 of women and it is responsible for more than 500.000 worldwide each year. Tumour cells have the ability to synthesize fatty acids *de novo* to supply the high demand of energy and synthesis of structures resulting from the high rates of proliferation. Thus, Fatty Acid Synthase (FASN), an enzyme of 270 KDa responsible of lipogenesis, is overexpressed and hyperactivated in most cancers, including breast cancer. The inhibition of FASN causes specific cytotoxicity to cancer cells. For this reason, the development of FASN inhibitors is an interesting strategy for cancer treatment.

In this work, we studied a potentially FASN inhibitory molecule, the FASN Inhibitor X (FIX), and we analyzed its effects on breast cancer cells HER2+. We have evaluated its effects on cell proliferation, FASN expression and activity and on associated signalling pathways, such as PI3K/Akt and AMPK. The results obtained show that the compound presents antiproliferative properties and it inhibits FASN activity without modifying its expression. Regarding FIX effects of signalling pathways, it has been observed an inhibition of proteins involved in cell proliferation, as Akt or S6, parallel to an AMPK activation, a sensor protein of cell energy levels. AMPK is activated at drug concentrations in which Akt is inhibited. Akt inhibition concomitant to AMPK activation is also observed in other FASN inhibitors, consequently these two mechanisms might be related. However, the relationship between AMPK and Akt is not well described and further studies would be needed to confirm it.

To sum up, FIX molecule has shown an ability to inhibit FASN activity and to block proliferation signaling pathways. Consequently it could represent a potential anticancer drug if these results were confirmed in other cell lines and animal models.

INDEX

1. INTRODUCCIÓ	8
1.1 El càncer de mama	8
El càncer de mama	8
Els subtipus de càncer de mama	8
1.2 El metabolisme de la cèl·lula cancerosa	9
La reprogramació del metabolisme energètic de les cèl·lules tumorals	9
El metabolisme dels àcids grassos	10
1.3 La sintasa dels àcids grassos (FASN)	11
Estructura i tipus	11
La síntesi <i>de novo</i> d'àcids grassos	11
El paper de FASN en càncer	12
1.4 Inhibidors de FASN	13
Cerulenina	14
C75	14
Epigallocatequina-3-gallat (EGCG)	15
Orlistat	15
C93	15
G28UCM	15
FASN Inhibitor X (FIX)	15
1.5. Estudi de la senyalització de FASN i vies relacionades	16
2. OBJECTIVES	18
3. METODOLOGIA	19
Línia cel·lular i condicions de cultiu	19
Recompte cel·lular	19

Quantificació de proteïna total	20
Assaig d'inhibició de la proliferació	20
Assaig de l'activitat enzimàtica de FASN	20
Anàlisi de la senyalització cel·lular de FIX mitjançant <i>Western-Blot</i>	21
Criteris ètics i de sostenibilitat	22
4. RESULTATS	23
4.1 Assaig d'inhibició de la proliferació	23
4.2 Assaig d'activitat enzimàtica de FASN	23
4.3 Anàlisi de la senyalització cel·lular després del tractament amb FIX	25
5. DISCUSSIÓ	27
6. CONCLUSIONS	29
7. BIBLIOGRAFIA	30

1. INTRODUCCIÓ

1.1 El càncer de mama

El càncer de mama

El càncer de mama és el tumor maligne que s'origina en el teixit de la glàndula mamària¹. Degut a anomalies genètiques, que poden ser hereditàries o causades per l'envelliment cel·lular, les cèl·lules del teixit mamari comencen a proliferar sense control i formen un tumor². A més, aquestes cèl·lules tenen la capacitat d'envair teixits sans del voltant o propagar-se a àrees allunyades i implantar-se formant tumors secundaris^{1,2}.

El càncer de mama és el segon càncer més comú a tot el món i el primer entre les dones, amb 1.670.000 nous casos diagnosticats arreu del món durant l'any 2012, que correspon al 25% de tots els càncers³. A Espanya es van diagnosticar 25.000 nous casos durant l'any 2012⁴.

Aquest tipus de càncer, és el cinquè més mortal, amb 522.000 morts arreu del món durant l'any 2012³ i 6080 morts a Espanya el 2012⁴.

Els subtipus de càncer de mama

El càncer de mama és una malaltia molt heterogènia, presentant diferents subtipus segons els criteris que s'utilitzin⁵. Des d'un punt de vista clínic, el càncer de mama es classifica habitualment en:

- **Receptors horminals d'estrògens (ER) i progesterona (PR) positiu.** Els tumors mamaris d'aquest subtipus sobreexpressen els receptors d'estrògens i/o de progesterona a la membrana plasmàtica. Aquest grup representa el 75-80% dels càncers de mama totals⁶. Existeix teràpia dirigida contra aquest subtipus, anomenada teràpia endocrina, que inhibeix el creixement tumoral bloquejant la via activada pels receptors sobreexpressats⁷. No obstant, la meitat dels càncers són tolerants a la teràpia o adquireixen resistència⁸.
- **HER2/Neu Positiu.** Aquest subtipus correspon al 20-30% dels càncers de mama totals i presenta una amplificació del gen ErbB2 i/o una sobreexpressió del receptor HER2 a la membrana⁹. Existeixen teràpies dirigides contra el receptor HER2, com per exemple el tractament amb trastuzumab, pertuzumab o lapatinib^{10,11}.
- **Triple negatiu.** Els tumors classificats dins d'aquest subtipus no sobreexpressen cap dels receptors abans mencionats (ER, PR i HER2)⁹. Aquest grup representa entre el 10-25% de tots els tumors de mama. No existeixen teràpies dirigides per aquest subtipus de càncer de mama i actualment es tracten únicament amb quimioteràpia. Cal desenvolupar doncs teràpies més

específiques i menys tòxiques per aquest subtipus de tumors, ja que hi ha un elevat risc de recurrència i progressió de la malaltia¹².

1.2 El metabolisme de la cèl·lula cancerosa

La reprogramació del metabolisme energètic de les cèl·lules tumorals

La formació d'un tumor és una transformació progressiva de les cèl·lules normals a tumorals a causa d'alteracions genètiques. La inestabilitat del genoma genera un genotip particular a la cèl·lula cancerosa, la qual mostra al menys sis característiques fisiològiques o *hallmarks*, descrites per Hanahan i Weinberg (**Figura 1**). Aquestes característiques són adquirides durant el desenvolupament del tumor¹³.

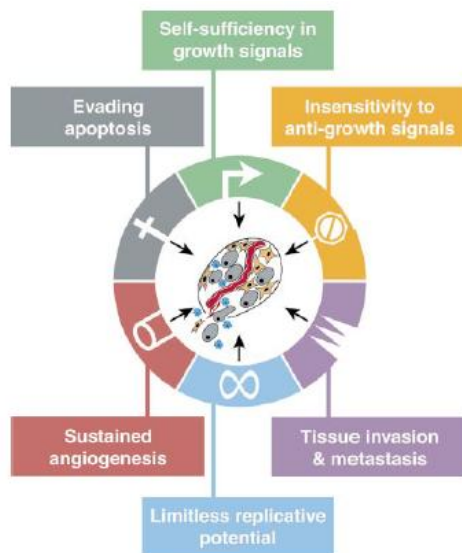


Figura 1. Característiques fisiològiques adquirides per les cèl·lules canceroses. Els *hallmarks* presentats per les cèl·lules canceroses són l'evasió de l'apoptosi, el sosteniment de l'angiogènesi, potencial de replicació il·limitat, insensibilitat als senyals antiproliferatius, autosuficiència dels senyals proliferatius i invasió de teixits i metàstasi. Hanahan, D. i Weinberg R.A., *Cell*, 2000¹².

En un treball posterior dels mateixos autors es van descriure dues característiques addicionals de les cèl·lules cancerígenes: la reprogramació del metabolisme energètic i l'evasió de la destrucció del sistema immunitari¹⁴. La reprogramació del metabolisme energètic apareix en la cèl·lula cancerosa per poder suportar el creixement cel·lular i la proliferació contínua. El metabolisme propi del teixit i de les cèl·lules associades és reemplaçat i ajustat per tal d'impulsar el creixement cel·lular i la divisió, permetent un augment de la proliferació¹⁴.

En condicions aeròbiques, les cèl·lules normals processen la glucosa, primer a piruvat a través de la glucòlisi en el citosol i després, a diòxid de carboni en el mitocondri. Sota condicions anaeròbiques, s'afavoreix la glucòlisi i relativament poc piruvat és enviat al mitocondri, que consumeix oxigen. En canvi, les cèl·lules canceroses limiten el seu metabolisme energètic a la glucòlisi, principalment, dirigint-se a un estat de **glucòlisi aeròbica**, també anomenat efecte Warburg, el qual és induït per

certs oncògens¹⁵. També, s'augmenta molt el transport de glucosa per la sobreexpressió dels transportadors específics. En condicions d'hipòxia, la dependència a la glucòlisi és més accentuada i el sistema també sobreexpressa els enzims de la via glucolítica¹⁶.

Aquest metabolisme pot semblar contradictori, ja que és molt menys eficient en termes energètics que la fosforilació oxidativa mitocondrial, però s'explica per la hipòtesi de que l'augment de la glicòlisi permet desviar productes intermedis cap a diferents rutes biosintètiques, incloent aquelles que generen aminoàcids i nucleòsids. Això facilita la biosíntesi de macromolècules i orgànuls, els quals es requereixen per crear noves cèl·lules¹⁷.

El metabolisme dels àcids grassos

Un aspecte rellevant de les cèl·lules canceroses és el increment de la síntesi *de novo* dels àcids grassos¹⁸. Els àcids grassos són constituents essencials dels lípids de les membranes cel·lulars, substrats importants per al metabolisme energètic i substàncies missatgeres. A més, provoquen modificacions post-traduccionals i modulen l'expressió gènica¹⁹. Els àcids grassos poden venir d'una font exògena, com la dieta, o d'una font endògena, com la hidròlisi dels triacilglicèrids emmagatzemats o la lipogènesi²⁰.

La lipogènesi és la síntesi *de novo* dels àcids grassos. És un procés llarg que involucra un gran nombre d'enzims (**Figura 2**)²¹. Aquest procés es dona en el fetge i en el teixit adipós blanc, principalment²².

Pel que fa el metabolisme dels àcids grassos, les cèl·lules tumorals emmagatzemen els àcids grassos endògens en forma de fosfolípids i duen a terme la síntesi *de novo*²³. En canvi, les cèl·lules normals els emmagatzemen en forma de triacilglicèrids i obtenen els àcids grassos de la dieta²⁴. A més, la síntesi d'àcids grassos en cèl·lules tumorals està regulada per factors transcripcionals o per

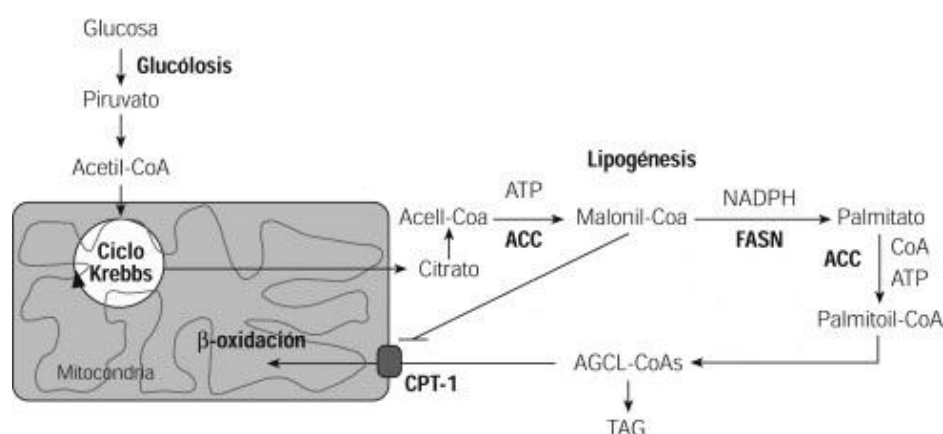


Figura 2. Metabolisme dels àcids grassos. La glucosa és transportada del mitocondri al citoplasma en forma de citrat, que és convertit a acetil-CoA per l'ATP citrat liasa (ACL). Aquest és metabolitzat a malonil-CoA per la carboxilasa acetil-CoA (ACC), que juntament amb el acetil-CoA i el NADPH són els substrats de la síntesi d'àcids grassos (FASN) per a la formació de palmitat. El malonil-CoA inhibeix la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), bloquejant la β-oxidació dels àcids grassos sintetitzats. Modificada de Puig T. et al., Medicina Clínica, 2009²³.

oncoproteïnes relacionades amb rutes de senyalització dependents de quinases, mentre que en les cèl·lules normals està regulada per factors dietètics²³.

Gràcies a l'augment de la glucòlisi, les cèl·lules tumorals tenen prou piruvat per sintetitzar els àcids grassos, ja que hi ha una gran demanda degut a l'elevada proliferació²⁵.

La necessitat que tenen les cèl·lules tumorals de sintetitzar *de novo* els àcids grassos fa que el bloqueig del metabolisme dels àcids grassos s'hagi considerat des de fa uns anys una estratègia terapèutica interessant per diferents tipus de càncer²³. En concret, la sintasa d'àcids grassos (FASN) que es troba sobreexpressada en una àmplia varietat de tumors²⁶, s'ha estudiat com a diana en el tractament del càncer (veure punt 1.4), ja que la seva inhibició és selectivament citotòxica en cèl·lules tumorals²³.

1.3 La sintasa dels àcids grassos (FASN)

Estructura i tipus

La sintasa d'àcids grassos (FASN) és una proteïna homodimèrica multienzimàtica encarregada de catalitzar la síntesi *de novo* dels àcids grassos de cadena llarga²⁷. Es tracta d'un dels enzims més complexos que es troben en els mamífers. Consisteix en una cadena polipeptídica de 270 KDa on es troben tots els dominis requerits per a l'activitat enzimàtica²⁸.

FASN posseeix set dominis funcionals. Té cinc dominis catalítics: β -cetoacil sintasa (KS), malonil acetil transferasa (MAT), deshidratasa (DH), enoil-acil reductasa (ER) i β -cetoacil reductasa (KR). I dos reguladors: *acyl carrier protein* (ACP) i tioesterasa (TE)^{27,29}. A més, s'han identificat dos dominis no-enzimàtics addicionals: una pseudo-cetoreductasa i una pseudo-metiltransferasa perifèrica²⁹.

Existeixen dos tipus de FASN: I i II. FASN I és un gran polipèptid multifuncional que integra tots els passos per a la síntesi dels àcids grassos²⁷, mentre que la II es troba dissociada formant una sèrie de proteïnes monofuncionals¹⁹. FASN I sintetitza *de novo* els àcids grassos saturats de cadena llarga utilitzats per construir la membrana, per senyalitzar les molècules amb lípids i per ancorar les proteïnes a la membrana³⁰. En canvi, FASN II es localitza al mitocondri i s'encarrega de la producció d'octanoil, que és el precursor de la síntesi de lípids del mitocondri³¹.

La síntesi *de novo* d'àcids grassos

A través de 32 reaccions en sèrie, FASN és capaç de sintetitzar un àcid gras de cadena llarga utilitzant el acetil-CoA i el malonil-CoA com a substrats i el NADPH com a donador d'electrons (**Figura 3**). El producte predominant de FASN és el palmitat, un àcid gras de 16 carbonis³².

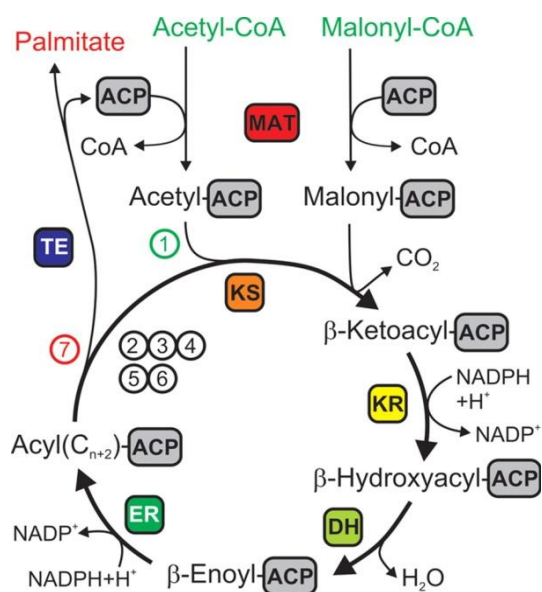


Figura 3. Cicle de la síntesi *de novo* d'àcids grassos per FASN. MAT transfeix un grup acil, que prové del acetyl-CoA, a l'ACP i també transaccila el grup malonil del malonil-CoA a l'ACP. El KS catalitza la condensació descarboxilativa entre l'acetyl-ACP i el malonyl-ACP generant β-ketoacyl-ACP. El carboni β és processat per la KR, la qual és dependent de NADPH, de manera que resulta β-hidroxiacyl-ACP, que la DH deshidrata resultant β-enoyl-ACP. Aquest es redueix per l'ER, que és també dependent de NADPH i que produeix un acil de quatre carbonis, que després de uns quants cicles elongant-se a cada cicle amb dos carbonis provinents del malonyl-CoA, passa a ser d'una longitud de 16 a 18 carbonis. Finalment, la TE allibera l'ACP del producte donant lloc a palmitat. Modificat de Maier, T. *et al.*, *Science*, 2006²⁷.

En adults, la lipogènesi es requereix principalment per emmagatzemar l'excés de carbohidrats com a triacilglicèrids, per a la síntesi de greixos provinents d'altres substàncies, com els carbohidrats o les proteïnes, o per a la producció d'àcids grassos en teixits i/o situacions especials, com en la lactància³³.

El paper de FASN en càncer

FASN s'expressa majoritàriament en cèl·lules sensibles a hormones³⁴, com l'endometri³⁵ o les glàndules mamàries³⁶, en les cèl·lules fetals proliferatives, en diferents tipus de cèl·lules especialitzades, com el hipotàlem³⁴, i en els teixits lipogènics, com el fetge i el teixit adipós^{22,34}. No obstant, FASN té una baixa expressió general en les cèl·lules humanes, ja que la majoria de teixits prefereixen utilitzar els lípids provinents de fonts exògenes³⁷. A més, la seva regulació és complexa i altament dependent de l'estat nutricional i del perfil hormonal³⁴. En les poblacions ben nodrides, l'expressió de FASN sol ser baixa, ja que la dieta cobreix els requeriments lipídics per mantenir la homeòstasi³⁷. Ara bé, alteracions de l'expressió d'aquest enzim es troben associades a trastorns com l'obesitat, diabetis³⁸, esteatosis hepàtica³⁹, inflamació i càncer⁴⁰. FASN es troba sobreexpressada i hiperactivada en la majoria de càncers³², incloent el de mama, pròstata, colon, bufeta, pàncrees i pulmó, entre altres, i freqüentment està correlacionada amb la progressió del càncer, una elevada taxa de recurrència i una baixa supervivència⁴¹. Aquesta sobreexpressió és a causa de que les cèl·lules canceroses tenen una gran demanda d'energia i d'estructures atès a l'elevada proliferació que tenen¹⁴. Així doncs, els seus nivells d'expressió estan relacionats amb la malignitat del tumor³², ja que sembla que aquest fenotip els dona un avantatge per a la supervivència. A més, FASN en les cèl·lules canceroses és insensible als senyals nutricionals⁴².

L'expressió de FASN està regulada principalment per vies de senyalització dependents de quinases, com PI3K/Akt (fosfatidil inositol 3-quinasa/proteïna quinasa B) i MAPK/ERK1/2 (proteïna quinasa activada per mitògens/quinasa extracel·lular reguladora de senyals), les quals modulen l'expressió factor de transcripció SREBP-1, que produeix SREBP-1c (proteïna d'unió a l'element regulada d'esterols 1c). SREBP-1c és un factor de transcripció que s'uneix al promotor de FASN, modulant la seva expressió gènica⁴³.

Els mecanismes de senyalització molecular responsables de la sobreexpressió de FASN en cèl·lules canceroses encara no són del tot coneguts. Tot i així, s'han proposat diferents mecanismes:

- A nivell d'amplificació gènica, s'ha observat que la regió on es troba el gen de FASN és propensa a ser amplificada en càncer, la qual cosa s'ha correlacionat amb la seva sobreexpressió⁴⁴.
- A nivell transcripcional, la sobreexpressió és causada per factors de creixements i els seus receptors, com HER2, i per hormones esteroides, involucrant l'activació i entrecreuament de múltiples vies de transducció del senyal⁴⁵. També pot ser causada pel microambient del tumor, com la hipòxia i el pH baix⁴⁶.
- A nivell de traducció, la sobreexpressió en cèl·lules HER2 positives podria estar relacionada amb l'activació de la via PI3K/AKT o de la diana de la rapamicina per als mamífers (mTOR)⁴⁷.
- A nivell post-traducciona, prevenint la degradació de FASN al proteosoma, donant una forta estabilitat a l'enzim⁴⁸.

Varis d'aquests mecanismes poden ser actius al mateix temps i evitar la regulació fisiològica de FASN, resultant en una activació constitutiva de la via lipogènica en el tumor⁴⁹.

1.4 Inhibidors de FASN

La sobreexpressió i hiperactivitat de la sintasa d'àcids grassos i la seva funció energètica i estructural que supleix l'elevada proliferació han aparegut com a un fenotip característic de les cèl·lules canceroses humanes^{14,32}. Per aquest motiu, s'han desenvolupat diferents inhibidors de FASN per tal d'intentar revertir aquest fenotip. La inhibició de FASN causa citotoxicitat específica en les cèl·lules canceroses humanes i disminueix el creixement del tumor o retarda la seva progressió en models animals. Per tant, es considera una bona diana terapèutica en el tractament del càncer^{23, 50-52}.

Els diferents mecanismes que expliquen l'efecte anti-tumoral al inhibir FASN són:

- La manca d'àcids grassos per a la construcció de la membrana plasmàtica⁵³.

- El trencament de l'assemblatge de les bales lipídiques que afecten als receptors de la família HER⁵⁴.
- La inhibició de la replicació del DNA pel bloqueig del cicle cel·lular⁵⁵.
- La iniciació de la apoptosi regulada per p53⁵⁶.
- La detenció del creixement cel·lular⁵⁷.
- L'acumulació de malonil-CoA que inhibeix la CPT-1, de manera que s'inhibeix la producció d'energia i s'indueix la apoptosi cel·lular per l'acumulació de lípids tòxics⁵⁸.
- La inhibició o interferència de la via PI3K/Akt^{59,60}.

Els primers compostos inhibidors de FASN presentaven certes problemàtiques per esser utilitzats en clínica, com baixa biodisponibilitat o bé efectes secundaris greus, com la pèrdua de pes excessiva⁶¹. Per aquest motiu es van dissenyar nous fàrmacs partint de les estructures dels anteriors, però intentant-ne millorar les seves limitacions.

A continuació es detallen les característiques d'alguns dels inhibidors de FASN més importants.

Cerulenina

La cerulenina ((2S,3R)-2,3-epoxi-4-oxo-7,10-dodecadien-oxilamida) és un antibiòtic natural que prové del fong *Cephalosporium caeruleum*. Aquesta petita molècula s'uneix covalentment al domini KS de FASN, bloquejant l'activitat de l'enzim (**Figura 4**)⁶².

Va ser el primer compost utilitzat com a inhibidor de l'activitat de FASN, amb efectes citotòxics *in vitro* i *in vivo*⁶³. No obstant, el compost presenta inestabilitat química degut a la reactivitat del grup epòxid, limitant la seva aplicació clínica^{52,64}.

C75

El C75 (α -metilen- γ -butirolactona) és un anàleg sintètic de la cerulenina al qual se li ha eliminat el grup reactiu epòxid superant així la inestabilitat química de la cerulenina⁶⁵. Es tracta d'una molècula petita que s'uneix als dominis KS, ER i TE, inhibint l'activitat de l'enzim (**Figura 4**)⁶⁶. Es va demostrar que el C75 causava reducció tumoral *in vivo* mitjançant la inhibició de FASN en models de càncer xenotransplantats de mama, entre altres⁶⁷, però tenia efectes adversos. Provocava una ràpida i profunda pèrdua de pes i també afectava a la ingesta d'aliments^{61,68}. A més d'inhibir FASN, aquest compost també estimula la CPT-1, que activa conseqüentment l'oxidació dels àcids grassos⁶⁹, induint una pèrdua del 20% del pes després de 24 hores del tractament en ratolins⁷⁰. A més, podia induir anorèxia degut a la inhibició de la producció del neuropèptid Y, dins l'hipotalem⁶¹.

Epigal·locatequina-3-gallat (EGCG)

L'EGCG és la principal catequina polifenòlica del té verd⁷¹. Es tracta d'un component natural que bloqueja el domini KS de FASN (**Figura 4**)⁷². Sembla ser que el grup gal·loil que posseeix és essencial per a la inhibició de FASN⁷³.

S'ha observat que EGCG indueix l'apoptosi de diferents línies cel·lulars tumorals *in vitro*, i redueix la mida dels tumors mamaris en models animals⁷⁴. També inhibeix l'activitat de HER2, MAPK i Akt, a més de causar una disminució de les formes actives de certes oncoproteïnes en el càncer de mama⁷¹. Tot i que no presenta els efectes adversos observats amb el C75, l'efecte anti-tumoral requereix d'una elevada concentració de EGCG limitant l'efecte *in vivo*, a més té una baixa biodisponibilitat oral i una baixa estabilitat en condicions fisiològiques lleugerament alcalines o neutres^{75,76}.

Orlistat

L'Orlistat és una β -lactona que ha estat aprovada per la FDA com a fàrmac contra l'obesitat, ja que inhibeix les lipases gastrointestinal i pancreàtica⁷⁷. A més, inhibeix potentment FASN, ja que bloqueja el domini TE, de manera que no permet l'alliberament de l'àcid gras de cadena llarga acabat de sintetitzar (**Figura 4**)⁷⁸.

S'ha demostrat que aquest compost té efectes anti-tumorals amb activitat apoptòtica i antiproliferativa en línies cel·lulars de càncer de mama HER2 positives^{78,79}. També s'ha observat que inhibeix l'angiogènesi⁸⁰. Malgrat això, l'Orlistat és poc soluble, té una baixa permeabilitat cel·lular, una manca de selectivitat, biodisponibilitat oral baixa i una estabilitat metabòlica pobre^{77,81,82}.

C93

El C93 és un derivat de la cerulelina i un anàleg del C75. Es va desenvolupar amb l'objectiu d'eliminar els efectes secundaris causat pel C75. Inhibeix FASN boquejant el domini KS. El C93 ha mostrat grans efectes anti-tumorals, tant *in vitro* com *in vivo*, en molts tipus de càncer sense mostrar els efectes secundaris del C75. Un altre avantatge que presenta el C93 és que es pot administrar oralment^{83,84}.

G28UCM

El G28UCM és un derivat del EGCG que es va seleccionar per la seva potent inhibició de l'activitat de FASN (inhibeix un 90% l'activitat de l'enzim) i per la seva elevada activitat anti-tumoral i apoptòtica, a més de presentar una gran selectivitat contra les cèl·lules canceroses^{85,86}.

S'ha observat que en models cel·lulars HER2+/FASN+ indueix l'apoptosi i disminueix el creixement del tumor en càncer de mama HER2+/FASN+ en models xenoinjertats. Presenta una inhibició de la proliferació relacionada amb les vies de senyalització d'alguns receptors tirosina-quinasa, a més

d'actuar sinèrgicament amb drogues anti-HER2 i/o inhibidors d'HER1, com transtuzumab i el gefitinib, respectivament. No s'han mostrat efectes secundaris *in vivo*, com la pèrdua de pes o l'anorèxia⁸⁵.

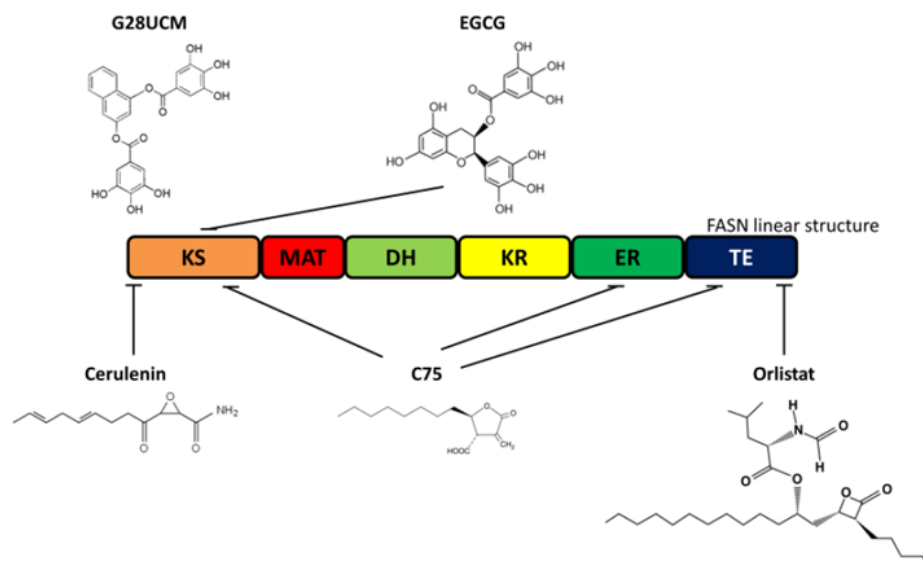


Figura 4. Inhibidors de la sintasa d'àcids grassos (FASN). Es mostra l'estructura d'alguns inhibidors de FASN i els dominis que afecten. Modificada de Maier, T *et al.* Science, 2008²⁹.

FASN Inhibitor X (FIX)

L'empresa farmacèutica que va sintetitzar la molècula d'estudi del present treball va observar que aquesta tenia efectes antiproliferatius en diferents models cel·lulars de càncer de mama. Posteriorment, es va realitzar un estudi predictiu de hibridació *in silico* comparant l'estructura química de FIX amb la base de dades ChEMBL15 (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/>). Aquest estudi va permetre la identificació de varies dianes potencials de FIX, entre elles FASN. Per aquest motiu, es va establir una col·laboració amb el Grup de Recerca en Noves Dianes Terapèutiques (TargetsLab), amb experiència prèvia en l'estudi d'aquest enzim, per tal de comprovar experimentalment si aquest compost realment inhibia l'activitat de FASN.

Tant l'estructura com el nom real del fàrmac i l'empresa fabricant són confidencials. Al llarg del treball s'utilitzarà el nom FIX (*FASN Inhibitor X*) per tal de designar aquest compost.

1.5. Estudi de la senyalització de FASN i vies relacionades

La inhibició de l'activitat de FASN porta a un augment de la relació intracel·lular AMP/ATP. Aquesta modificació dels nivells energètics de la cèl·lula activa AMPK⁸⁷. AMPK és una quinasa essencial en els

eucariotes que actua com a un sensor de l'estat energètic cel·lular. Aquesta proteïna s'activa degut a estressos metabòlics i a compostos xenobiòtics que causen un desequilibri energètic en la cèl·lula. En general, AMPK activa processos catabòlics generant ATP, mentre que desactiva vies anabòliques i altres processos que consumeixen ATP, restaurant així l'homeòstasi energètica cel·lular⁸⁸. S'han descrit diferents dianes per AMPK, les quals estan implicades en la regulació del metabolisme (**Figura 5a**): (i) AMPK activa l'oxidació dels àcids grassos mitjançant la fosforilació e inactivació de la isoforma associada als mitocondris de l'ACC2 (acetil-CoA carboxilasa), reduint així el malonil-CoA, un inhibidor de l'absorció d'àcids grassos a través de la CPT-1 del mitocondri⁸⁹, (ii) AMPK inhibeix la síntesi de proteïnes mitjançant la fosforilació de TSC2, la qual cosa causa la inhibició de mTORC1⁹⁰ i també mitjançant la fosforilació directa a Raptor, una subunitat de mTORC1⁹¹ i (iii) AMPK inhibeix directament la síntesi d'àcids grassos mitjançant la fosforilació e inactivació de la isoforma citosòlica de l'acetil-CoA carboxilasa (ACC1)⁹².

D'altra banda, s'ha observat que la majoria d'inhibidors de FASN provoquen una inhibició d'Akt^{93,94}. La inhibició d'Akt resulta en una inhibició de la proliferació cel·lular, ja que quan es bloqueja Akt, aquesta no pot inactivar TSC2 mitjançant la fosforilació, de manera que Rheb, que és un senyal estimulador, no pot estimular mTORC1. Conseqüentment, mTORC1 no fosforilarà S6K, ni aquesta a S6, inhibint així la proliferació cel·lular. També s'ha observat que AMPK inactiva la senyalització de mTORC1 a través d'activar el complex TSC⁹⁵. És possible doncs que l'activació d'AMPK estigui relacionada amb la inhibició d'Akt.

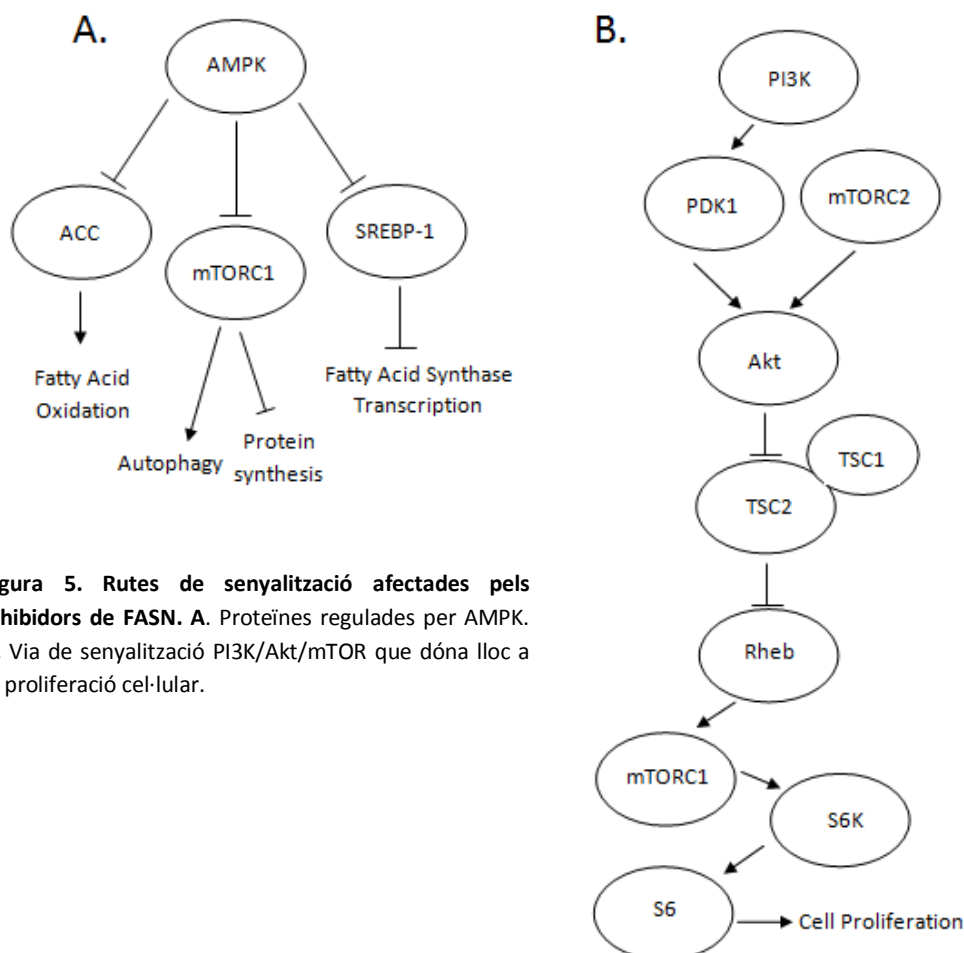


Figura 5. Rutes de senyalització afectades pels inhibidors de FASN. A. Proteïnes regulades per AMPK. **B.** Via de senyalització PI3K/Akt/mTOR que dona lloc a la proliferació cel·lular.

2. OBJECTIVES

The main objective of this study has been to **determine the effect of a new synthetic compound (FIX) on Fatty Acid Synthase (FASN) to investigate its antiproliferative mechanism of action.**

To accomplish this main objective, the following specific objectives were defined:

- I. To determine FIX antiproliferative effect (IC_{50}) on a FASN expressing cell line (SkBr3) and to compare it with another known FASN inhibition (C75).
- II. To determine FASN activity inhibition by FIX and C75 on SkBr3 cells.
- III. To determine FIX treatment influence on the expression levels of FASN and related pathways (Akt and AMPK) by *Western-Blot* on SkBR3 cells.

3. METODOLOGIA

Línia cel·lular i condicions de cultiu

Per a aquest estudi, s'ha utilitzat un model cel·lular de càncer de mama HER2+ que sobreexpressa FASN, la línia SkBr3 (**Figura 6**), provinent d'Eucellbank (Universitat de Barcelona). Aquestes s'han cultivat a 37°C amb un 5% de CO₂ en medi McCoy (Gibco) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS) (HyClone Laboratories), 1% de L-glutamina (Gibco), 1% de sodi piruvat (Gibco), 100 U/mL de penicil·lina i 100 µg/mL d'estreptomicina (Gibco) en plaques de Petri P-100.

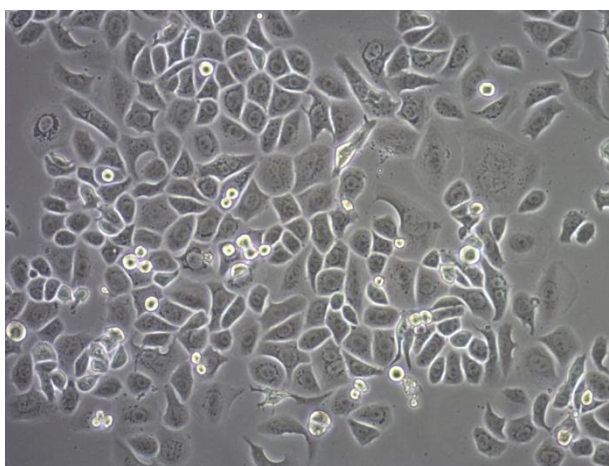


Figura 6. Línia cel·lular SkBr3. Model cel·lular de càncer de mama HER2 positiu amb expressió positiva de FASN.

Pel manteniment de les cèl·lules en cultiu, quan aquestes arriben a una certa densitat cal desadherir-les de la superfície de la placa i subcultivar-ne una fracció (habitualment 1/3-1/5). Per fer-ho es realitza el procés de tripsinització: s'aspira el medi de cultiu, es renten les cèl·lules amb tampó fosfat salí (PBS) i a continuació s'aspira el PBS, s'afegeix tripsina 1X i es deixa la placa a l'incubador (5% CO₂ a 37°C) durant 5 minuts aproximadament. Quan les cèl·lules estan totalment desadherides, s'atura la tripsinització afegint medi complet i es realitza el procediment de *flushing*, per tal d'acabar de desunir les cèl·lules que es troben adherides a la placa.

Un cop fet això, s'agafa tota la barreja de la placa i es traspassa a un tub de centrifuga. Es centrifuga a 1000 rpm durant 5 minuts a 20°C. Després, s'aspira el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* amb medi. Una fracció d'aquesta suspensió cel·lular es subcultiva en una nova placa.

Recompte cel·lular

Per tal de poder realitzar experiments amb un nombre controlat de cèl·lules, cal realitzar un recompte cel·lular. Un cop s'obté un *pellet* cel·lular després del procés de tripsinització, aquest es resuspèn en un volum conegut de medi. La suspensió cel·lular es dilueix 1:5 amb blau de tripà i es

posen 10 µL a la cambra de Neubauer. El recompte en la cambra consisteix en comptar totes les cèl·lules vives que es troben dins els 16 requadres que formen cada quadrant. Un cop fet això, es calcula la mitjana dels quatre resultats obtinguts i aquesta es multiplica pel factor de dilució (5) i es divideix pel volum d'un quadrant (10^{-4} mL), és a dir: $\bar{x} \cdot 5 \cdot 10000$, obtenint així la concentració de la suspensió cel·lular (cèl·lules/mL).

Quantificació de proteïna total

La quantificació de proteïna total es realitza amb un assaig basat en el mètode de Lowry (DC™ Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Per realitzar la recta patró, s'utilitza albúmina de sèrum boví (BSA) a diferents concentracions: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 i 1.2 µg/µL. Pel que fa les mostres a quantificar, es realitza una dilució 1:10 d'aquestes. En una placa de 96, a cada pouet s'afegeixen 5 µL de les mostres diluïdes, 25 µL de barreja S+A (relació 1:50) i 200 µL d'agent B. La placa es deixa en fosc durant 15 minuts i després es llegeix en un espectrofotòmetre a 700 nm (Spectra Max 340PC (380), Bio-Nova Científica S.L., Madrid, Spain).

Assaig d'inhibició de la proliferació

En plaques de 96, es sembren 4000 cèl·lules per pouet amb medi complet amb 10% FBS i es deixen a l'incubador *overnight*. Al dia següent, es realitzen els tractaments amb diferents concentracions de FIX o C75 als seus respectius pouets amb medi complet amb 0,5% FBS. Es deixen les plaques a l'incubador durant 72 hores per al FIX i 48 hores per al C75. Un cop passat el temps, s'aspira el medi amb el tractament i es posen 100 µL de medi complet amb 10% FBS lliure de fàrmac i 10 µL de MTT (5 mg/mL)(Sigma-Aldrich) a cada pouet i s'incuba a 37°C durant 2 hores i 30 minuts. Després, el sobrenedant s'elimina curosament i els cristalls de formazà que es formen pel metabolisme de les cèl·lules viables es dissolen amb 100 µL de dimetil sulfòxid (DMSO) a cada pouet. Es llegeix l'absorbància de cada pou a 570 nm a l'espectrofotòmetre (Spectra Max 340PC (380), Bio-Nova Científica S.L., Madrid, Spain).

Assaig de l'activitat enzimàtica de FASN

En plaques P100 es sembren 3 milions de cèl·lules amb medi complet amb 10% de FBS i es deixen a l'incubador *overnight*. Al dia següent, les cèl·lules SkBr3 es tracten amb FIX 250 µM o bé amb C75 100 µM en medi amb 0,5% de FBS durant 6 hores o 12 hores. També es realitza un control sense fàrmacs. Un cop passat el temps del tractament, s'obtenen les cèl·lules i les seves restes mitjançant una tripsinització en un tub de centrifuga i al *pellet* cel·lular se li afegeix 100 µL de tampó de lisis fred (EDTA 1mM, NaCl 150 mM i TrisHCl 50 mM)(Cell Signaling Technology, Inc.) amb PMSF 200 mM

(100 µg/mL)(Sigma) i la barreja es traspasa a un eppendorf. Per llisar les cèl·lules, aquestes es soniquen en fred durant 30 minuts i es vortegen durant 20 segons cada 5 minuts. Tot seguit, es

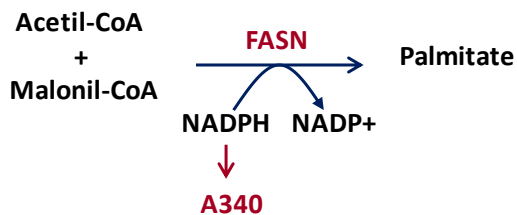


Figura 7. Reacció enzimàtica de FASN. L'assaig de l'activitat enzimàtica de FASN es basa en la mesura de la disminució de NADPH (A340nm) com a resultat de la conversió d'Acetil-CoA i Malonil-CoA a Palmitat.

centrifuguen les mostres a 14.000 rpm durant 15 minuts a 4°C. Després, es recupera el sobrenedant i es quantifica la proteïna total. Caldrà diluir les mostres amb tampó de l·lisis fins a una concentració de 1 µg/µL. Les mostres dels lisats s'incuben a 37°C durant 15 minuts i es prepara la barreja de la reacció per a cada una de les mostres: en un eppendorf s'afegeixen 30 µL de tampó fosfat (PPB) 0.2 M, 30 µL de DDT 10 mM, 30 µL d'EDTA 10 mM, 30 µL de NADPH 2.4 mM i 30 µL d'acetil-CoA 300 µM. A continuació, es diposita 120 µL de la mostra juntament amb la barreja de reacció i es llegeix l'absorbància a 340nm al minut 0 i al minut 3. La diferència d'absorbància entre aquests minuts es pren com a soroll de fons o *background* i correspon a altres reaccions enzimàtiques que també utilitzen NADPH. Passats els 3 minuts, s'afegeix 30 µL de malonil-CoA 500 µM, el substrat limitant específic de FASN, i es mesura la disminució de NADPH a través de la monitorització de l'absorbància a 340 nm cada minut durant 10 minuts (**Figura 7**).

Anàlisi de la senyalització cel·lular de FIX mitjançant *Western-Blot*

En plaques P-60 es sembren 500.000 cèl·lules amb medi complet amb 10% de FBS i s'incuben *overnight*. Al dia següent, es canvia el medi de les cèl·lules per medi complet amb 0,5% de FBS i es tracten a diferents concentracions de FIX: 0 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM i 100 µM. Després de 24 hores de tractament, s'afegeixen 100 µL de tampó de l·lisis fred amb 1% de PMSF a cada placa i a continuació, amb l'ajuda d'scrappers, s'acaben de llisar les cèl·lules i es recull en un eppendorf la barreja de tampó de l·lisis amb les restes cel·lular, amb l'ajuda d'una micropipeta. Tot seguit, es vorteja la barreja 20 segons cada 5 minuts durant 30 minuts en fred, per assegurar la l·lisis completa de les cèl·lules. Per acabar, es determina la quantitat de proteïna total de cada lisat.

A continuació, 30 µg de cada llisat s'incuba amb *LDS Sample Buffer* i *Sample Reducing Agent* (Invitrogen) a 70°C durant 10 minuts, de manera que s'aconsegueix que les proteïnes es despleguin.

Un cop fet això, les proteïnes es separen mitjançant una electroforesis SDS-PAGE en gels de poliàcrilamida al 7,5% d'1mm, els quals es van deixar córrer a 200V durant 45 minuts aproximadament, exactament fins que la banda del marcador molecular corresponent a 25 KDa hagi

desaparegut. Després, les proteïnes són transferides a una membrana de nitrocel·lulosa a 90V durant 1 hora i 15 minuts.

Al finalitzar la transferència, les membranes es bloquegen amb tampó de bloqueig (5% llet en pols descremada en solució PBS amb 0,1%) Tween 20 durant 1 hora a temperatura ambient en agitació suau. A continuació, s'incuben *overnight* a 4°C en agitació suau amb tampó de bloqueig amb els següents anticossos primaris: anticòs policlonal de conill contra FASN (Assay Designs; 905-069; dilució 1:1000), AMPK α (Cell Signaling Technology Inc.; #2532; dilució 1:1000), phospho-AMPK α ^{Thr172} (Cell Signaling Technology Inc.; #2531; dilució 1:1000), Akt (Cell Signaling Technology Inc.; #9272; dilució 1:1000), phospho-mTOR^{Ser2448} (Cell Signaling Technology Inc.; #2971; dilució 1:500) i Phospho-S6 Ribosomal Protein^{Ser235/236} (Cell Signaling Technology Inc.; #2211; dilució 1:1000), anticòs monoclonal de conill contra Phospho-Akt^{Ser473} (Cell Signaling Technology Inc.; #4058; dilució 1:1000) i mTOR (Cell Signaling Technology Inc.; #2983; dilució 1:500) i anticòs monoclonal de ratolí contra β -actina (Santa Cruz Biotechnology Inc.; #47778; dilució 1:1000) pel control de la proteïna carregada i transferida. Després, les membranes es renten 3 vegades amb PBS-Tween i s'incuben amb els seus corresponents anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa, contra conill (Cell Signaling Technology Inc.; #7074; dilució 1:1000) o contra ratolí (Merck Millipore Corporation; #401215; dilució 1:5000).

Un cop finalitzada la incubació amb l'anticòs secundari, les membranes es van incubar amb el kit comercial Immobilon Western HRP Substrate (Millipore) o Super Signal West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific Inc.) i la quimoluminisència es va detectar mitjançant ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad Laboratories Inc.).

Criteris ètics i de sostenibilitat

Mentre s'estaven realitzant els experiments explicats anteriorment es va intentar que el impacte al medi ambient fos mínim. Un problema associat a la recerca amb cultius cel·lulars és que es necessita molt material d'un sol ús, ja que cal treballar en condicions estèrils. Per tal de minimitzar l'ús de material, les plaques de Petri on es mantenien els cultius cel·lulars es van reutilitzar dues vegades, reduint així el material de plàstic que s'utilitzava. A més, les pipetes per fer els rentats de les cèl·lules o canviar els medis de cultiu també s'intentaven reutilitzar més d'una vegada. Per altra banda, en la realització dels *Western-Blot*, els tampons es reutilitzaven un segon cop per a la cubeta exterior, reduint així la quantitat de productes químics. A més, el *Transfer Buffer* utilitzat es guardava en un contenidor a part, ja que aquest conté metanol i és perjudicial pel medi ambient.

Pel què fa a la gestió de residus, aquest s'han separat en "urbans", "biològics" o "citotòxics" segons la seva naturalesa.

4. RESULTATS

4.1 Assaig d'inhibició de la proliferació

Es va realitzar un assaig d'inhibició de la proliferació per conèixer la concentració inhibidora 50 (IC_{50}) de FIX, és a dir, la concentració de fàrmac que inhibeix la proliferació de la meitat de les cèl·lules cultivades (**Figura 8**). En paral·lel, es va realitzar el mateix assaig utilitzant el compost C75, inhibidor específic de FASN. Per a realitzar aquest assaig, les cèl·lules SkBr3 es van tractar amb diferents concentracions de FIX i C75 durant 72 hores o 48 hores, respectivament.

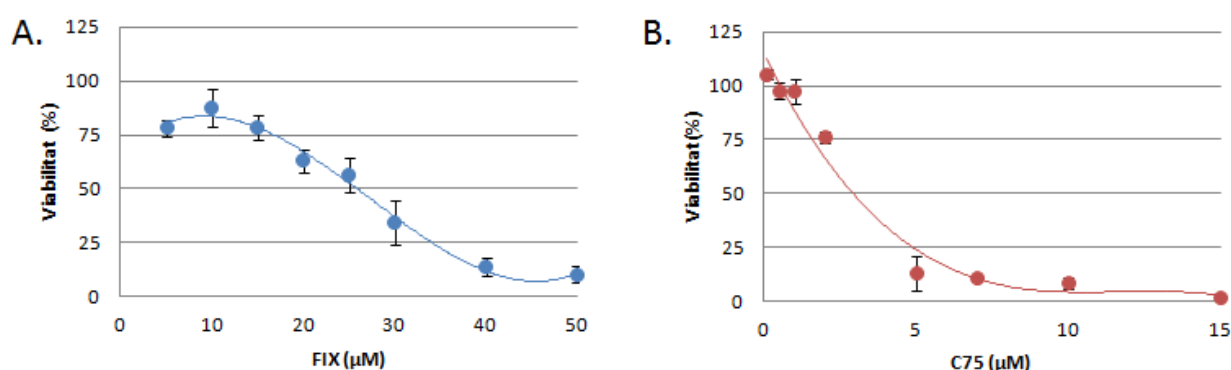


Figura 8. Assaig d'inhibició de la proliferació de FIX (A) i C75 (B). Les cèl·lules SkBr3 es van tractar amb diferents concentracions de FIX (5 a 50 μM) durant 72 hores o amb diferents concentracions de C75 (0.1 a 15 μM) durant 48 hores. Es representa la mitjana i la desviació estàndard de la viabilitat obtinguda per a cada concentració assajada de 3 experiments independents, juntament amb la corba de tendència.

Tal i com es pot veure a la **Figura 7**, la IC_{50} obtinguda per FIX va ser de 26 μM , mentre que pel C75 va ser de 3 μM . L'especificitat de l'inhibidor C75 queda plasmada amb els resultats obtinguts en aquest assaig. Es pot observar que el percentatge de viabilitat disminueix un 50% aproximadament, de 2 μM a 5 μM .

4.2 Assaig d'activitat enzimàtica de FASN

Per avaluar la capacitat de FIX i C75 per a inhibir l'activitat de FASN, les cèl·lules SkBr3 es van tractar a 6 i 12 hores amb FIX (250 μM) o C75 (100 μM) (**Figura 9**). Es van escollir concentracions elevades per poder veure efecte del fàrmac a temps curts. Es pot observar que a 6 hores, tant el C75 com el FIX, van tenir efectes antiproliferatius sobre les cèl·lules, atès que es poden visualitzar algunes cèl·lules aixecades i restes cel·lulars respecte a la placa control. A les 12 hores, encara hi va haver més cèl·lules mortes i més restes cel·lulars.

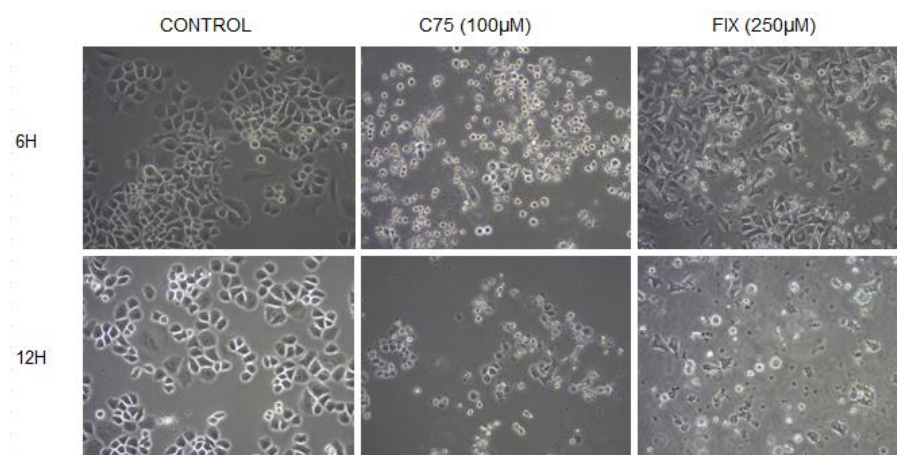


Figura 9. Tractaments de les cèl·lules SkBr3 amb FIX i C75. Les cèl·lules han estat tractades a 6 i 12 hores amb C75 (100 µM) i FIX (250 µM) per a mesurar la seva capacitat d'inhibir l'enzim.

A continuació, l'activitat de FASN es va analitzar mitjançant l'oxidació del NADPH (**Figures 10 i 11**). En la monitorització de l'absorbància (**Figura 10**), es pot observar que el consum de NADPH és menor en les cèl·lules que han estat tractades amb els inhibidors C75 o FIX que en les cèl·lules control. De manera que aquests compostos provoquen una inhibició de l'activitat de FASN.

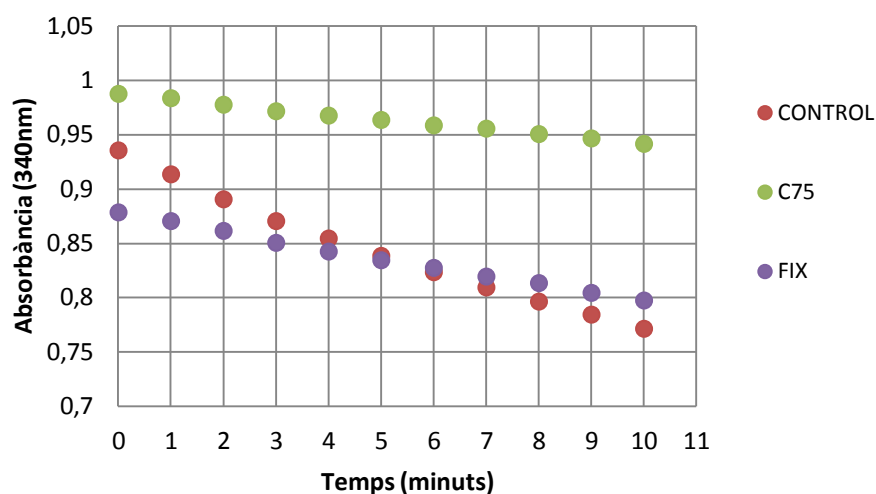


Figura 10. Monitorització de la inhibició de l'activitat de FASN. Per a cada tractament, un cop afegit el malonil-CoA a la mostra, es va mesurar l'absorbància a 340 nm cada minut durant 10 minuts.

Prenent com a referència els controls, es va calcular el percentatge d'inhibició de l'activitat de FASN després de 6h i 12h de tractament amb C75 o FIX (**Figura 11**). L'activitat de FASN ja es veu reduïda després d'exposar les cèl·lules SkBr3 als fàrmacs durant 6 hores en un $48,5\% \pm 3,4\%$ amb el FIX i en un $62,9\% \pm 5,3\%$ amb el C75. Aquesta inhibició s'incrementa a mesura que augmenta el temps de tractament: a 12 hores, l'activitat de FASN té una inhibició del $79,3\% \pm 9,5\%$ en el tractament amb C75 i $57,3\% \pm 5,4\%$ en el tractament amb FIX, respecte les cèl·lules control.

També es pot veure que FIX té una menor capacitat d'inhibició que el C75, tot i que les diferències no són significatives ($P=0,0718$ per 6 hores i $P=0,0571$ per 12 hores).

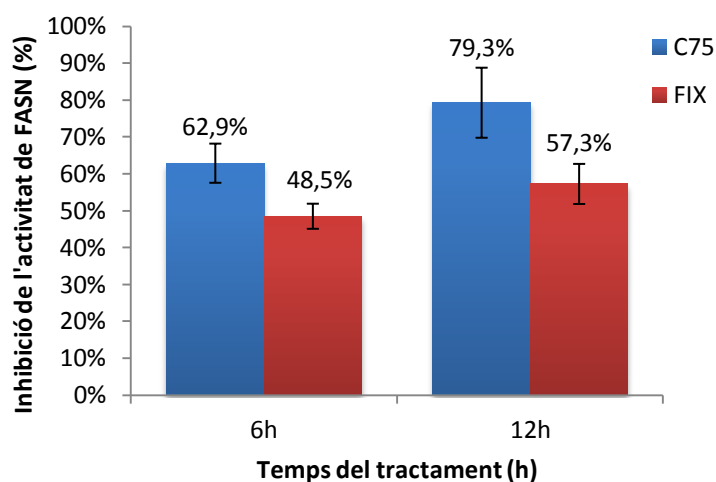


Figura 11. Assaig d'inhibició de l'activitat de FASN en les cèl·lules SkBr3. Les cèl·lules SkBr3 han estat tractades durant 24 hores amb FIX (250 μ M) i C75 (100 μ M) per mesurar l'activitat de FASN, tal i com s'ha descrit en la Metodologia. Les barres representen el percentatge d'inhibició de l'activitat de les cèl·lules tractades.

4.3 Anàlisi de la senyalització cel·lular després del tractament amb FIX

Per tal de determinar l'efecte de FIX sobre els nivells d'expressió proteica de FASN així com la seva influència en vies de senyalització relacionades (**Figura 5**), es va realitzar un anàlisi proteic mitjançant *Western-Blot*. Les cèl·lules SkBr3 es van tractar durant 24 hores a diferents concentracions de FIX: 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M i 100 μ M (**Figura 12**). Es pot observar com a mesura que va augmentant la concentració del fàrmac, hi ha més quantitat de cèl·lules mortes i de les seves restes cel·lulars.

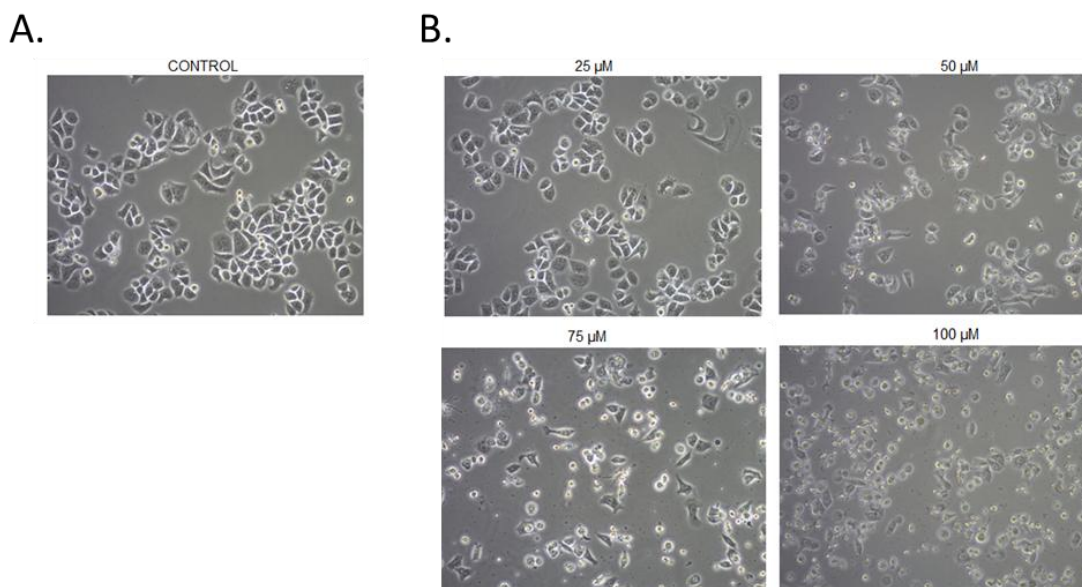


Figura 12. Tractaments de les SkBr3 amb FIX. A. SkBr3 no tractades i B. SkBr3 tractades a diferents concentracions del fàrmac durant 24 hores. Es pot observar com a mesura que augmenta la concentració del fàrmac, augmenta la mortalitat cel·lular.

Després, les cèl·lules tractades es van recollir i lliar i la mateixa quantitat de proteïna de cada un dels tractaments es va analitzar mitjançant un *Western-Blot*. La **Figura 13** mostra les diferents proteïnes immunodetectades amb anticossos específics.

FASN no varia la seva expressió a mesura que augmenta la concentració de FIX, de manera que el fàrmac no inhibeix l'expressió de l'enzim. mTOR roman activada tot i augmentar la concentració de l'inhibidor, al contrari que Akt i S6, que disminueixen la seva activació. pAkt és indetectable a partir del tractament amb FIX 50 μ M. pS6 disminueix a 100 μ M de FIX. En canvi, es pot detectar una activació de la proteïna quinasa activada per AMP (AMPK) a 50 μ M de FIX. Cal tenir en compte que la quantitat de mTOR i AMPK total no varia amb els tractaments, però la quantitat de Akt total disminueix una mica en les concentracions més elevades.

S'han normalitzat els *Western-Blots* realitzant un control intern amb β -actina per assegurar que s'ha carregat i transferit la mateixa quantitat de proteïna a tots els carrils. En la **Figura 13** es mostren dades representatives dels resultats obtinguts en dos experiments independents.

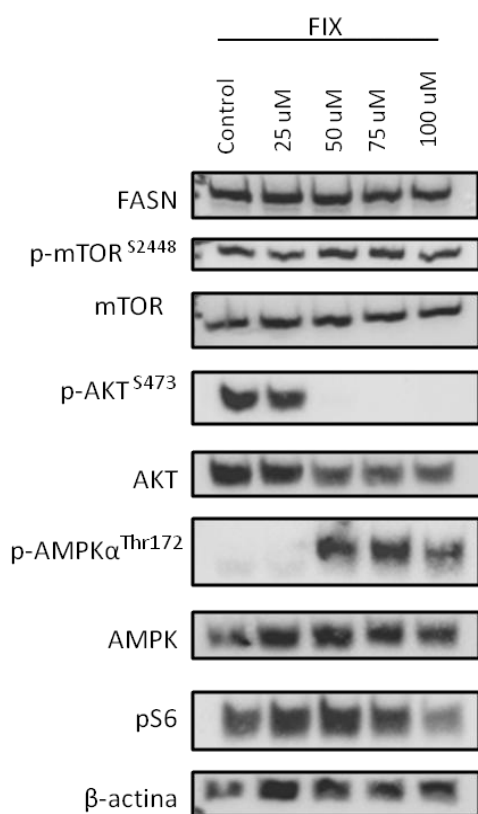


Figura 13. Anàlisi proteic dels llisats cel·lulars mitjançant *Western-Blot*. Les cèl·lules han estat tractades amb 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M i 100 μ M, i amb la mateixa quantitat de proteïna s'ha fet un *Western-Blot*. La membrana s'ha revelat amb els corresponents anticossos contra la proteïna específica. S'han normalitzat els resultats realitzat un control intern amb β -actina.

5. DISCUSSIÓ

La reprogramació del metabolisme energètic és un fet característic de les cèl·lules tumorals¹⁴. En concret, l'augment de l'activitat de la sintasa d'àcids grassos (FASN) és una característica que confereix avantatges proliferatives a la majoria de cèl·lules tumorals⁴². En aquest context, el desenvolupament de fàrmacs inhibidors de FASN podria suposar una bona estratègia terapèutica per alguns tipus de càncer.

En el present treball, s'ha assajat una molècula (FIX) potencialment inhibidora de FASN en cèl·lules de càncer de mama SkBr3 que sobreexpressen aquest enzim. En concret, s'ha avaluat l'acció antiproliferativa del compost, la seva capacitat d'inhibir l'activitat de FASN i la seva influència en les vies de senyalització d'PI3K/Akt i d'AMPK.

En els resultats obtinguts en l'assaig d'inhibició de la proliferació, es va observar que la IC₅₀ de FIX (26 µM) era superior a la del C75 (3 µM), el fàrmac utilitzat com a control positiu a l'experiment, ja que es tracta d'un inhibidor específic de FASN. Podria semblar que la IC₅₀ obtinguda per FIX és més elevada del desitjable, però cal tenir en compte que és força baixa si es compara amb inhibidors no tòxics de FASN, com pot ser EGCG. Aquest compost presenta una IC₅₀ de 149 µM per a la mateixa línia cel·lular⁹⁶.

En l'assaig d'activitat enzimàtica de FASN, es va comprovar que el tractament amb FIX produïa una inhibició parcial de l'activitat de l'enzim, la qual és depenent del temps, ja que a 12 hores la inhibició és major que a 6 hores. En un altre estudi on es realitzava el mateix assaig amb els inhibidors de FASN C75 i EGCG, també van observar que la inhibició de l'activitat de FASN era depenent del temps⁷¹. A més, aquest mateix estudi mostrava que la inhibició de FASN també depenia de la dosi d'inhibidor utilitzada. Per tant, una millora de l'assaig seria realitzar l'experiment a diferents concentracions del fàrmac i mirar l'activitat de l'enzim a més temps.

En darrer lloc, l'anàlisi de la senyalització cel·lular per *Western-Blot* va mostrar que l'expressió de FASN no es modificava en relació al control encara que augmentéssim la concentració de fàrmac. Per tant, semblaria que la inhibició de l'activitat de FASN per part de FIX no és deguda a una disminució de l'expressió de l'enzim.

Pel què fa a la senyalització de vies relacionades amb la proliferació i el metabolisme energètic, es va observar que, a mesura que augmentava la concentració del fàrmac, Akt i S6 s'inhibien (disminució de p-Akt i p-S6) i AMPK s'activava (augment de p-AMPK). Per altra banda, mTOR es mantenia constant (activa) independentment de la concentració de FIX. La hiperactivació de la via Akt/mTORC1 s'observa en la majoria de càncers humans i el bloqueig d'aquesta és una important estratègia contra el càncer⁹⁷. Pel què fa a FIX, sembla que els seus efectes antiproliferatius podrien ser deguts, al

menys en part, a la inhibició d'aquesta via. Es detecta una disminució molt clara de l'activació d'Akt i de S6 que es troba al final de la via (**Figura 5b**). En canvi no es detecta inhibició de mTOR. Aquest fet podria ser degut a l'especificat de l'anticòs utilitzat, ja que el que s'ha emprat en aquest treball és dirigit contra la Serina 2448. S'ha descrit que la quinasa depenent de Rheb pot fosforilar mTOR en una altra serina, la 1261⁹⁸. A més, cal tenir en compte que existeixen dos complexos proteics mTOR: mTORC1 i mTORC2⁹⁹. La banda que s'observa en la membrana revelada podria contenir també fosforilació de mTORC2 del qual podria no estar influenciat per l'efecte fàrmac. Per tant, a partir dels resultats obtinguts sembla que la mort cel·lular provocada per FIX podria ser deguda a la inhibició de la via proliferativa Akt/mTORC1. Per tal de confirmar-ho, caldria analitzar altres proteïnes que es troben dins el conjunt de mTORC1, com per exemple Raptor, per així poder saber si aquesta proteïna es troba activada o no, i per extensió el conjunt mTORC1.

Per altra banda, s'ha observat una activació d'AMPK a les concentracions on Akt es trobava inhibida. AMPK actua com a un sensor de l'estat energètic cel·lular i activa processos catabòlics generant ATP mentre que desactiva vies anabòliques⁸⁸. De manera que probablement AMPK s'ha activat com a conseqüència de la inhibició de l'activitat de FASN, per part de FIX, i la seva conseqüent modificació de la relació AMP/ATP. Es coneix que l'activació d'AMPK inhibeix directament la síntesi d'àcids grassos, inactivant l'acetil-CoA carboxilasa (ACC1)⁹² i també inhibeix la transcripció dels gens lipogènics, incloent ACC-1 i FASN, a través de la fosforilació de SREBP-1c, prevenint així el seu processament proteolític i la seva translocació nuclear¹⁰⁰. No obstant, en aquest estudi no s'ha observat cap canvi en l'expressió de FASN, de manera que AMPK no estaria inhibint la seva transcripció, però sí que podria estar regulant-la post-traduccionalment¹⁰¹.

Per últim, la regulació directe entre AMPK i Akt no ha estat ben descrita, però altres estudis han observat que l'activació d'Akt inhibeix l'activitat d'AMPK¹⁰². Caldria dissenyar experiments més específics per comprovar si la regulació és també possible en sentit invers, és a dir, si l'activació d'AMPK pot inhibir Akt i per tant si en el nostre cas el bloqueig de la via Akt/mTOR és causada per la inhibició de FASN o bé, la molècula té capacitat per inhibir aquesta via en altres punts.

En resum, s'ha pogut comprovar que la molècula FIX presenta efectes antiproliferatius i té una IC₅₀ adequada. El compost FIX no modifica l'expressió de FASN, però sí que inhibeix la seva activitat de manera similar com ho fa un altre inhibidor de FASN de referència, el C75. A més, FIX activa AMPK, probablement per la modificació dels nivells energètics cel·lulars causats pel bloqueig de FASN. També s'ha observat que FIX bloqueja la via proliferativa d'Akt. La inhibició de FASN i el bloqueig de la via d'Akt podrien estar relacionades.

El compost FIX podria doncs resultar un bon fàrmac anticancerígen de confirmar-se aquests resultats en estudis amb altres línies cel·lulars i models animals.

6. CONCLUSIONS

- FIX shows an antiproliferative action on SkBr3 cells with an IC_{50} of 26 μ M.
- FIX inhibits the activity of FASN at similar rates that another well-known FASN inhibitor (C75) does. This inhibition increases with the length of the treatment. FIX does not modify FASN protein levels, thus it affects only the activity of the enzyme.
- FIX activates AMPK probably due to the modification of the cellular energetic levels caused by FIX FASN inhibition.
- FIX blocks the proliferative Akt pathway as it inhibits Akt and S6 phosphorylation.
- AMPK activation and Akt inhibition may be related, but further studies would be needed to confirm it.
- FIX could be used as an antitumoral drug if the results obtained were confirmed in other cell lines and animal models.

7. BIBLIOGRAFIA

1. AECC. (2015). *Cáncer de mama*. Recuperat de <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/cancerde mama.aspx>.
2. American Cancer Society. (2015). *Breast cancer*. Recuperat de <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/overviewguide/breast-cancer-overview-what-is-breast-cancer>.
3. Globocan 2012. (2013). *Fact Sheets by Cancer*. Recuperat de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
4. Ferlay, J. *et al.* (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49, 1374–1403.
5. Sotiriou, C. & Pusztai, L. (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. *New England Journal Medicine*, 360, 790–800.
6. Konecny, G. *et al.* (2003). Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 142–153.
7. Ali, S., Buluwela, L. & Coombes, R. C. (2011). Antiestrogens and Their Therapeutic Applications in Breast Cancer and Other Diseases. *Annual Review of Medicine*, 62, 217–232.
8. Osborne, C. K. & Schiff, R. (2011). Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Annual Review of Medicine*, 62, 233–247.
9. Perou, C. M. *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747–752.
10. Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.-B., Im, S.-A. & Hegg, R. (2012) Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *New England Journal Medicine*, 366, 109–119.
11. Harris, C. A., Ward, R. L., Dobbins, T. A., Drew, A. K. & Pearson, S. (2011). The efficacy of HER2-targeted agents in metastatic breast cancer: a meta-analysis. *Annals of Oncology*, 22, 1308–1317.
12. Perou, C. M. (2010). Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *Oncologist*, 15, 39–48.
13. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57–70.
14. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646–674.
15. Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309–314.
16. Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H.-M. & Wang, G. L. (1994). Transcriptional Regulation of Genes Encoding Glycolytic Enzymes by Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 23757–23763.
17. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029–1033.
18. Ookhtens, M., Kannan, R., Lyon, I. & Baker, N. (1984). Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *American Journal of Physiology*, 247, R146–153.
19. White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y.-M. & Rock, C. O. (2005). The Structural Biology Of Type II Fatty Acid Biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 791–831.
20. Menendez, J. A. & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7, 763–777.
21. Oliveras, G. *et al.* (2010). Novel anti-fatty acid synthase compounds with anti-cancer activity in HER2+ breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1210, 86–92.
22. Fukuda, H., Iritani, N., Sugimoto, T. & Ikeda, H. (2001). Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene by insulin/glucose, polyunsaturated fatty acid and leptin in hepatocytes and adipocytes in normal and genetically obese rats. *European Journal Biochemistry*, 505–511.
23. Puig, T., Porta, R. & Colomer, R. (2009). Fatty acid synthase: a new anti-tumor target.

- Medicina Clínica*, 132, 359–363.
24. Eaton, S., Bartlett, K. & Pourfarzam, M. (1996). Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochemistry Journal*, 320, 345–357
 25. Costello, L. C. & Franklin, R. B. (2005). 'Why do tumour cells glycolyse?': From glycolysis through citrate to lipogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 280, 1–8.
 26. Wang, Y., Kuhajda, F. P., Sokoll, L. J. & Chan, D. W. (2001). Two-site ELISA for the quantitative determination of fatty acid synthase. *Clinica Chimica Acta*, 304, 107–115.
 27. Maier, T., Jenni, S. & Ban, N. (2006). Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science*, 311, 1258–1262.
 28. Smith, S., Witkowski, A. & Joshi, A. K. (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progress in Lipid Research*, 42, 289–317.
 29. Maier, T., Leibundgut, M. & Ban, N. (2008). The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science*, 321, 1315–1322.
 30. Daub, G. W. & Tamelen, E. E. Van. (1977). Synthesis of oligoribonucleotides based on the facile cleavage of methyl phosphotriester intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, 99, 3526–3528.
 31. Witkowski, A., Joshi, A. K. & Smith, S. (2007). Coupling of the de Novo Fatty Acid Biosynthesis and Lipoylation Pathways in Mammalian Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 14178–14185.
 32. Kuhajda, F. P. *et al.* (1994). Fatty acid synthesis: A potential selective target for antineoplastic therapy since inhibition of FAS inhibits growth of human carcinoma cell lines commensurate with their FAS levels. Since FAS activity in the tissues of humans eating a diet containing. *Medicine Science*, 91, 6379–6383.
 33. Porstmann, T. *et al.* (2005). PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene*, 24, 6465.
 34. Kusakabe, T. *et al.* (2000). Fatty Acid Synthase Is Expressed Mainly in Adult Hormone-sensitive Cells or Cells with High Lipid Metabolism and in Proliferating Fetal Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48, 613–622.
 35. Pizer, E. S., Kurman, R. J., Pasternack, G. R. & Kuhajda, F. P. (1997). Expression of fatty acid synthase is closely linked to proliferation and stromal decidualization in cycling endometrium. *International Journal of Gynecological Pathology*, 16, 45–51.
 36. Anderson, S. M., Rudolph, M. C., McManaman, J. L. & Neville, M. C. (2007). Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Research*, 9, 204.
 37. Weiss, L. *et al.* (1986). Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biological Chemistry. Hoppe Seyler*, 367, 905–912.
 38. Lenhard, J. M. (2011). Lipogenic enzymes as therapeutic targets for obesity and diabetes. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 325–331.
 39. Huang, Y. Y., Gusdon, A. M. & Qu, S. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular pathways and therapeutic strategies. *Lipids Health Disease*, 12, 171.
 40. Wang, D. & Dubois, R. N. (2012). Associations between obesity and cancer: the role of fatty acid synthase. *Journal of the National Cancer Institute*, 104, 343–345.
 41. Liu, H., Liu, J.Y., Wu, X. & Zhang, J.T. (2010). Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1, 69–89.
 42. Milgraum, L. Z., Witters, L. A., Pasternack, G. R. & Kuhajda, F. P. (1997). Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 3, 2115–2120.
 43. Medes, G., Thomas, A. & Weinhouse, S. (1953). Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Research*, 13, 27–29.
 44. Shah, U. S. *et al.* (2006). Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in

- prostate adenocarcinoma. *Human Pathology*, 37, 401–409.
45. Yang, Y.A. *et al.* (2003). Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c. *Experimental Cell Research*, 282, 132–137.
 46. Furuta, E. *et al.* (2008). Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Research*, 68, 1003–1011.
 47. Yoon, S. *et al.* (2007). Up-regulation of acetyl-CoA carboxylase alpha and fatty acid synthase by human epidermal growth factor receptor 2 at the translational level in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 26122–26131.
 48. Graner, E. *et al.* (2004). The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, 5, 253–261.
 49. Relat, J. & Puig, T. (2010). Design of Anti-Fasn Molecules as a New Anti-Tumour Modality, in *Frontiers in Drug Design and Discover. Benthan Science Publishers*, 168–211.
 50. Lu, S. & Archer, M. C. (2005). Fatty acid synthase is a potential molecular target for the chemoprevention of breast cancer. *Carcinogenesis*, 26, 153–157.
 51. De Schrijver, E., Brusselmans, K., Heyns, W., Verhoeven, G. & Swinnen, J. V. (2003). RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Research*, 63, 3799–3804.
 52. Lupu, R. & Menendez, J. A. (2006). Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)-catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7, 483–493.
 53. Rodríguez-González, A., Ramírez de Molina, A., Bañez-Coronel, M., Megias, D. & Lacal, J. C. (2005). Inhibition of choline kinase renders a highly selective cytotoxic effect in tumour cells through a mitochondrial independent mechanism. *International Journal of Oncology*, 26, 999–1008.
 54. Nagy, P. *et al.* (2002). Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *Journal of Cell Science*, 115, 4251–4262.
 55. Zhou, W. *et al.* (2003). Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Research*, 63, 7330–7337.
 56. Li, J. N. *et al.* (2001). Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Research*, 61, 1493–1499.
 57. Menendez, J. A. & Lupu, R. (2005). RNA interference-mediated silencing of the p53 tumor-suppressor protein drastically increases apoptosis after inhibition of endogenous fatty acid metabolism in breast cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 15, 33–40.
 58. Bandyopadhyay, S. *et al.* (2006). Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Research*, 66, 5934–5940.
 59. Grunt, T. W. *et al.* (2009). *Interaction between fatty acid synthase- and ErbB-systems in ovarian cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385, 454–459.
 60. Menendez, J. A. *et al.* (2004). Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 10715–10720.
 61. Loftus, T. M. *et al.* (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, 288, 2379–2381.
 62. Funabashi, H. *et al.* (1989). Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase. *Journal of Biochemistry*, 105, 751–755.
 63. Omura, S. (1976). The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriology Reviews*, 40, 681–697.
 64. Pizer, E. S. *et al.* (1996). Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 56, 2745–2747.
 65. Kuhajda, F. P. *et al.* (2000). Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 3450–3454.
 66. Rendina, A. R. & Cheng, D. (2005). Characterization of the inactivation of rat fatty acid

- synthase by C75: inhibition of partial reactions and protection by substrates. *Biochemistry Journal*, 388, 895–903.
67. Alli, P. M., Pinn, M. L., Jaffee, E. M., McFadden, J. M. & Kuhajda, F. P. (2005). Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene*, 24, 39–46.
 68. Wortman, M. D., Clegg, D. J., D'Alessio, D., Woods, S. C. & Seeley, R. J. (2003). C75 inhibits food intake by increasing CNS glucose metabolism. *Nature Medicine*, 9, 483–485.
 69. Thupari, J. N., Landree, L. E., Ronnett, G. V & Kuhajda, F. P. (2002). C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 9498–9502.
 70. Puig, T. *et al.* (2007). (–)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits fatty acid synthase in breast cancer cells and does not induce weight loss in vivo. in *The European Cancer Conference (ECCO14)*.
 71. Puig, T. *et al.* (2008). Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75. *Breast Cancer Research Treatment*, 109, 471–479.
 72. Wang, X. & Tian, W. (2001). Green Tea Epigallocatechin Gallate: A Natural Inhibitor of Fatty-Acid Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288, 1200–1206.
 73. Wang, X., Song, K.-S., Guo, Q.-X. & Tian, W.-X. (2003). The galloyl moiety of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase. *Biochemical Pharmacology*, 66, 2039–2047.
 74. Jatoi, A. *et al.* (2003). A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma. *Cancer*, 97, 1442–1446.
 75. Choan, E. *et al.* (1999). A prospective clinical trial of green tea for hormone refractory prostate cancer: an evaluation of the complementary/alternative therapy approach. *Urologic Oncology*, 23, 108–113.
 76. Landis-Piowar, K. R. *et al.* (2007). A novel prodrug of the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Research*, 67, 4303–4310.
 77. Menendez, J. A., Vellon, L. & Lupu, R. (2005). Orlistat: from antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB-2)-overexpressing gastrointestinal tumors?. *Experimental Biology and Medicine*, 230, 151–154.
 78. Kridel, S. J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N. & Smith, J. W. (2004). Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Research*, 64, 2070–2075.
 79. Menendez, J. A., Vellon, L. & Lupu, R. (2005). Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Annals of Oncology*, 16, 1253–1267.
 80. Lin, J.K. & Lin-Shiau, S.Y. (2006). Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 211–217.
 81. Hoover, H. S., Blankman, J. L., Niessen, S. & Cravatt, B. F. (2008). Selectivity of inhibitors of endocannabinoid biosynthesis evaluated by activity-based protein profiling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 5838–5841.
 82. Zhi, J. *et al.* (1996). Metabolic profiles of minimally absorbed orlistat in obese/overweight volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, 36, 1006–1011.
 83. McFadden, J. M. *et al.* (2005). Application of a flexible synthesis of (5R)-thiolactomycin to develop new inhibitors of type I fatty acid synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 946–961.
 84. Orita, H. *et al.* (2007). Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 13, 7139–7145.
 85. Puig, T. *et al.* (2011). A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Research*, 13, R131.
 86. Puig, T. *et al.* (2009). Novel Inhibitors of Fatty Acid Synthase with Anticancer Activity. *Clinical*

- Cancer Research*, 15, 7608–7615.
87. Zhou, W. *et al.* (2007). Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 67, 2964–2971.
 88. Hardie, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development*, 25, 1895–1908.
 89. Merrill, G., Kurth, E., Hardie, D. & Winder, W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *American Journal of Physiology*, 273, E1107–E1112.
 90. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115, 577–590.
 91. Gwinn, D. *et al.* (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Cell*, 30, 214–226.
 92. Davies, S., Carling, D., Munday, M. & Hardie, D. (1992). Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *European Journal Biochemistry*, 203, 615–623.
 93. Relat, J. *et al.* (2012). Different fatty acid metabolism effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate and C75 in adenocarcinoma lung cancer. *BMC Cancer*, 12, 280.
 94. Ventura, R. *et al.* (2015). Inhibition of de novo Palmitate Synthesis by Fatty Acid Synthase Induces Apoptosis in Tumor Cells by Remodeling Cell Membranes, Inhibiting Signaling Pathways, and Reprogramming Gene Expression. *EBioMedicine*, 2, 808.
 95. Hindupur, S. K., González, A. & Hall, M. N. (2015). The opposing actions of target of rapamycin and AMP-activated protein kinase in cell growth control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, a019141.
 96. Turrado, C. *et al.* (2012). New synthetic inhibitors of fatty acid synthase with anticancer activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 5013–5023.
 97. Engelman, J. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Review Cancer*, 9, 550–562.
 98. Acosta-Jaquez, H. A. *et al.* (2009). Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 29, 4308–4324.
 99. Bhaskar, P. T. *et al.* (2007). The two TORCs and Akt. *Developmental Cell*, 12, 487–502.
 100. Li, Y. *et al.* (2011). No AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metabolism*, 13, 376–388.
 101. An, Z. *et al.* (2007). Nicotine induced activation of AMP-activated protein kinase Inhibits fatty acid synthase in 3T3-L1 adipocytes: a role for oxidant stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 26793–26801.
 102. Kovacic, S. *et al.* (2003). Akt Activity Negatively Regulates Phosphorylation of AMP-activated Protein Kinase in the Heart. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 39422–39427.