



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de Doctorat de BIOMEDICINA

Bienni 2001-2003

**Caracterització i regulació transcripcional del gen
*pfkfb3***

**Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del
Dr. Ramon Bartrons i Bach a la Unitat de Bioquímica del Departament de
Ciències Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona**

Mercè Obach Cortadellas

Dr. Ramon Bartrons i Bach

Memòria presentada per Mercè Obach Cortadellas
per a optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

De mica en mica s'omple la pica.

A la meva família, a l'Enric.

Sembla mentida però.....estic escrivint els agraïments de la tesi!!!!!! Tants com n'he llegit al llarg de la meva estada a Bellvitge i ara ja és el meu torn. Uf, només pensar-ho em puja aquella coseta per la gola que fa que comencis a veure borrós i que un intent de llàgrima rellisqui galta avall. És que quan un està tou....ja se sap, els líquids flueixen, oi, Joan?!

La veritat és que marxo plena de records, però d'aquells que marquen el teu dia a dia, ja que a més de tot l'aprenentatge que portem a les espatlles i la maduresa dels anys (que no ha acabat d'assentar del tot, no ens enganyem!), he adquirit un vocabulari molt interessant que m'acompanyarà la resta dels meus dies: *léase*, doncs, mullaments, intic, flims, altrament dits penícules, *fenómenos parasitológicos* i així una sèrie de mots mal dits que ens hem enganxat els uns als altres. No vol dir que no sapiguem parlar bé però, tantes hores junts, donen per a moltes coses!

Se que tot el que he viscut no hagués estat possible si un dia no t'hagués trobat, Ramon, caminant per Aigüestortes. Em vas obrir les portes cap a un món totalment desconegut per mi. Ara ja en surto i estic molt orgullosa de l'oportunitat i recolzament que em vas donar aquell dia i des d'aleshores fins avui.

Recordo molt bé la primera persona que em vas presentar, la meva bruixa avorrida preferida, que el primer dia ja m'intentava endollar un kit de minipreps perquè fes alguna cosa de profit. D'aquelles primeres minis segurament no en va sortir res de bo...però mira, que *me quiten lo bailao*, ara ja tinc uns quants resultats! Àurea, moltes gràcies per tot, ja ho saps, per tot, i pensa que a la *robotica* sempre hi haurà lloc per a la Júlia. i per tu, si mai deixes de ser radioactiva!

Al costat de la bruixeta hi havia la seva clon, l'Alícia. El meu primer experiment el vaig fer al teu costat, Alis! Gràcies per tenir l'habilitat de ser on fa falta en el moment que fa falta. I per totes les estones compartides ja sigui a Bellvitge o fora.

Però el laboratori Can Bartrons seria un altre sense l'Esther. Perquè, no sé, tu ets així, i fas que tot sigui fàcil, perquè em coneixes tant, que només veure'm entrar per la porta ja saps què m'ha passat! Esther, moltes gràcies per cuidar-me.

Qui no es queda curt és el Joan, o la Guillermina Mota, la Mari Sanpere i altres múltiples personatges que han recorregut el nostre laboratori gràcies a la seva veu. Joan, un dia, quan siguis miss i parlis l'anglès (*yes, yes*), recorda les bones estones que hem passat

junts, mano a mano, les "risses", el "bárbaro" i les tècniques noves que hem creat, com el northern blot exposat 30 segons a la llum u.v. Mare de déu, només de pensar-ho em "piju".

Marta, què dir d'algú amb qui he compartit hores i hores, des dels cursos de doctorat fins els museus de Londres!! La imatge aquella de les dues assegudes a les escales de Trafalgar Square no l'oblidaré mai, m'has recolzat molt en molts moments difícils i això no s'oblida. Antonio, ja se que deus estar pensant que tu també hi eres, i que no et dic res. Doncs mira, aquí ho tens! Antonio, a veure, tu, el Llorenç, el Dani i jo sabem que t'has equivocat de professió, sí, definitivament hauries de ser inventor. Es que només de pensar en digital o manual, dels acudits del telèfon 222222222, i una llarga llista més, no puc parar de riure! La veritat és que has estat i ets un molt bon amic i sé que sempre puc comptar amb tu, que estàs aquí i, per mi, això, és el més important!

Maria Nieves, encara recordo el primer dia que vas arribar, la noia nova, que vestia tant bé! Quan penso en tu em venen molt bons records, moltes rialles, consultes, música i ballaruques....i es que encara penso aquella època que ens va agafar per llegir les cartes del tarot! Nieves, cuida't i disfruta molt!

Anna, ets una bellíssima persona, sempre disposada a ajudar, a escoltar, a aconsellar i, tot i tenir mil i una històries sobre la taula (filles, pràctiques, metges...) sempre has estat capaç de donar suport a tothom que t'envolta. Per tot això, t'admiro.

I a la Susagna i la Marta Massip que us vam poder disfrutar molt poc temps però va ser genial!

Miguel i Laura, espero que pugueu disfrutar de la vostra tesi i del temps que passeu a Bellvitge com he disfrutat jo, molts ànims i sobretot molt coratge, hi haurà dies de tot, però penseu que en la dificultat està la gràcia i que els reptes que vas superant fan que estiguis orgullós de tu mateix. Vosaltres no sabeu que antigament al nostre laboratori hi havia més gent...gent sense la qual els inicis no haguessin estat els mateixos, oi, José Carlos? Tinc tantes coses a agrair-te que no sé ni per on començar. Gràcies per ser com ets Pepe Carlos, per saber tant de tot, per poder explicar resultats i dissenyar experiments mentre prepares sushi, mojitos o calçots. Per intentar planejar amb mi un cop perfecte, l'obtenció d'un *ferret*! I sobretot, perquè part d'aquesta tesi no hagués estat possible sense la teva ajuda, i sense els teus consells. Maria, tot i que ara no siguis aquí no et pensis que t'he oblidat, ni els dies liles, ni les anades a la Pisu, ni l'oninem.... vas fer que la meua entrada a Bellvitge fos suau i em vas fer sentir com a casa. Al Lluís, que em va cedir tota la seva feina i em va ajudar durant els meus inicis, a vegades fins i tot via e-mail! I a l'Anna V.

que només vam estar al mateix laboratori durant un any, i vas poder iniciar, juntament amb la Maria, el nou grup bioquímic a biofísica. Anna m'has ensenyat a veure com una mare jove pot realitzar una tesi i encara tenir un somriure per la gent del seu voltant!

I a la resta del veïns biofísics, el Francesc, la Sandra, l'Andy, l'Edu, el Jordi Boada i la Roser, per tots els moments de germanor que hem passat junts i pels que espero no perdre i poder seguir fent!

Recordo molt bé els primers dos anys de Bellvitge amb el Llorenç, el Dani, l'Antonio i la Maria anant a la pisu a dinar. Dani, gràcies per les teves rialles i pel recolzament, pels consells de laboratori i de la vida. Gràcies per a deixar-nos compartir amb tu un dels dies més emocionants de la teva vida, el dia del teu casament. Llorenç!! No em puc treure del cap aquell dia als cursos de doctorat on ens vam asseure darrera de....una noia que....bé, que ens va fer riure desmesuradament i sense parar durant hores....quin mal de galtes!!!! Ho recordes Antonio? He disfrutat moltíssim al teu costat, i admiro la capacitat que tens de fer mil històries i que en totes siguis bo: el dibuix, l'harmònica, la cuina....com ho fas? Gràcies Llorenç.

I també moltes gràcies a les nenes que compartiu laboratori amb aquest trio, sobretot a l'Ana i a la Mercè, que he tingut l'oportunitat de conèixer i de compartir molt bones estones, gràcies per estar sempre disposades a riure. I a les ex-companyes, la Montse i la Clara.

I just a la porta de davant del passadís hi ha un laboratori ple de persones increïbles, amb les que penso compartir la meua vida durant molts anys. Oi Cris i Roser? Heu passat de companyes a amigues i d'amigues a bones amigues. Gràcies per les estones compartides i per les que compartirem. Crec que no m'equivoco quan dic que teniu una sort molt gran de poder compartir espai amb l'Antonio, que des del primer dia que va entrar a Bellvitge es va posar a tothom a la butxaca, ets una persona amb una gran personalitat Antonio. I a la Maria José i a la Sílvia, per ser tant divertides i per les estones que hem compartit, que espero que no acabin aquí! A l'Arnau, perquè vam tenir una bona època, que no hem sabut continuar però que agraeixo i no oblidaré. Al Pol, a la Cristina L., a la Bea, a la Raquel i a la Cris G. I sobretot a una persona que m'ha ensenyat moltíssimes coses i que sempre escolto embadalida, la Julia. Moltes gràcies per compartir tantes coses amb mi.

Tot i que estiguin un pel més lluny, no m'oblido de l'Eduard, del Ouadah i del Francesc Garcia. Gràcies per aquestes petites xerrades esporàdiques que tenim a la mega campana de cultius! I a l'Elena i a la Diana que tinc la sort de continuar veient.

Vull agrair sobretot al Santi, al Francesc Ventura, al Francesc Vinyals, al Joan Gil, al Biel, al José Luís Rosa, a la Teresa Roig, al Jordi Bermúdez i al Ramon per aconseguir crear l'ambient de treball, companyonia i amistat del departament. Sense vosaltres i l'entorn que aconseguí res seria igual. Moltes gràcies.

I també vull agrair al Joel Smith, l'oportunitat que em va donar de passar uns inoblidables tres mesos a Nova York. I a Jaime Caro i a Antonio Castrillo per les aportacions científiques durant la tesi.

Però la meua vida fora de Bellvitge, la meua vida de fa anys i panys, la que acaba d'omplir del tot el meu món és la que comparteixo amb tots vosaltres, amb la Pela, la Luna, la Marta, la Mon, la Judith, l'Ilde, el Bernat i el Jordi, ja sabeu que des de fa anys ens tenim els uns als altres per tot. Amb la Becca i el German i tota la colla de la farmàcia, la Blanca, l'Olga i especialment amb l'Anna i la Manoli. Amb el Jordi, la M^a Dolors i el Jesús, que m'heu acollit des del primer dia. I per mi, els més importants, els que fan que tot tingui un sentit, els que t'ajuden de forma incondicional, els meus pares, el meu germà i els avis. Pares, moltes gràcies per tot el que feu per l'Amadeu, per l'àvia i per mi, per voler que tinguem a l'abast tot el que vosaltres no heu pogut tenir. Per tot el sacrifici que feu contínuament per nosaltres i per estimar-nos de forma il·limitada. A l'Amadeu perquè un germà com el meu no el té ningú, sempre disposat a ajudar, a fer riure, a disfrutar i amb un bon humor inacabable. I als avis, àvia per ser tant valenta i per no rendir-te mai, i a l'avi, que tot i que ara no estiguis aquí amb nosaltres cada dia pensem en tu i recordem el teu bon humor i la capacitat de no enfadar-te mai! I a la Christelle, per fer feliç al meu germà.

I com que per últim sempre es deixa el millor, he esperat fins a aquest moment per agrair-te, Enric, tot el que m'portes. La teua paciència, la teua abraçada confortant, les teves batalletes, la teua integritat, el teu somriure inacabable i inclús els teus acudits dolents. Gràcies per estimar-me tant i deixar-te estimar. La teua presència fa que la meua vida sigui plena i pensa que encara ens queda un llarg camí per a fer junts, on estic segura que podrem aconseguir tot el que ens proposem.

TAULA DE CONTINGUTS

INTRODUCCIÓ

1.1 El càncer.....	3
1.2 Regulació del metabolisme de la cèl·lula.....	3
1.3 Evolució de les cèl·lules tumorals cap a un fenotip glucolític.....	7
1.4 El fenotip glucolític de les cèl·lules tumorals.....	9
1.5 L'enzim 6-fosfofructoquinasa-1.....	11
1.6 La Fru-2,6-P ₂ en cèl·lules proliferants i tumorals.....	12
1.7 L'enzim 6-fosfofructoquinasa-2/fructosa 2,6-bisfosfatasa.....	13
1.8 Isoenzims de la família PFK-2/FBPasa-2.....	15
1.9 Gens que codifiquen per la família d'isoenzims PFK-2/FBPasa-2.....	18
1.10 Qui regula la glucòlisi en el creixement i progressió tumoral?.....	22
1.11 El gen <i>pfkfb3</i>	27

OBJECTIUS.....	33
----------------	----

RESULTATS

1. Clonatge i caracterització del promotor del gen <i>pfkfb3</i>	39
2. El promotor del gen <i>pfkfb3</i> conté elements de resposta pel factor induïble per hipòxia 1 (HIF-1).....	51
3. Regulació del gen <i>pfkfb3</i> per l'anàleg de progesterona Organon 2058.....	73
4. Sobreexpressió del gen <i>pfkfb3</i> al fetge de ratolins diabètics.....	85

DISCUSSIÓ.....	113
----------------	-----

CONCLUSIONS.....	125
------------------	-----

MATERIALS I MÈTODES.....	129
--------------------------	-----

BIBLIOGRAFIA.....	165
-------------------	-----

PUBLICACIONS.....	185
-------------------	-----

ABREVIATURES

AMPK	Proteïna quinasa activada per AMP
AP-2	<i>Activator protein 2</i>
1,3-BPG	1,3-bisfosfoglicerat
CoCl ₂	Clorur de cobalt
c/EBP	<i>CCAAT/ enhancer binding protein</i>
DFO	Deferoxamina
DMOG	Dimetiloxalilglicina
E2F-1	Factor de transcripció oncogènic
EGR-1	<i>Early growth response 1</i>
EPO	Eritropoietina
ER	Receptor d'estrògens
F-6-P	Fructosa-6-fosfat
FBPasa-1	Fructosa 1,6-bisfosfatasa
FBPasa-2	Fructosa 2,6-bisfosfatasa
Fru-1,6-P ₂	Fructosa 1,6-bisfosfat
Fru-2,6-P ₂	Fructosa 2,6-bisfosfat
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GA-3P	Gliceraldehid-3-fosfat
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GLUT	Transportador de glucosa
HIF-1	Factor induïble per hipòxia
HK	Hexoquinasa
HRE	Elements de resposta a hipòxia

iNOS	Sintasa induïble d'òxid nítric
iPFK-2	Isonezim induïble de la PFK-2/FBPasa-2
LnLL	N-acetil-leucin-leucin-norleucinal
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
ORG	Organon 2058
PDB	Èsters de forbol
PDK-1	<i>Pyruvate-dehydrogenase kinase 1</i>
PEP	Fosfoenolpiruvat
PET	Tomografia d'emissió de positrons
PFK-1	6-fosfofructoquinasa-1
PFK-2	6-fosfofructoquinasa-2
PK	Piruvat quinasa
PKA	Proteïna quinasa dependent d'AMPc
PRE	Element de resposta a progesterona
SP-1	<i>Specific protein 1</i>
STZ	Estreptozotocina
TIGAR	<i>TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator</i>
uPFK-2	Isoenzim ubic de la PFK-2/FBPasa-2
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>

INTRODUCCIÓ

1.1 El càncer

La cèl·lula, en condicions normals, disposa de múltiples mecanismes que controlen el metabolisme, la proliferació, la diferenciació i la mort. Aquests, en funció dels nutrients i de les diferents senyals externes i internes que li arriben, permeten que la cèl·lula sobrevisqui o bé entri en un procés de senescència o d'apoptosi.

En els processos tumorals hi ha una pèrdua del control d'aquests mecanismes, provocant la proliferació cel·lular descontrolada, la invasió del teixit que l'envolta i la metastasi. En aquesta formació i progressió tumoral hi estan implicats gens que pateixen un conjunt d'alteracions que poden comportar un guany de funció, com en el cas d'oncògens i protooncògens (Land et al., 1983; Ruley, 1983), o bé una pèrdua d'aquesta, com passa amb els gens supressors o els gens mutadors (Bishop, 1991; Vogelstein and Kinzler, 1992). En qualsevol cas, suposen un avantatge pel creixement i el desenvolupament tumoral.

El gener de l'any 2000, Robert Weinberg i Douglas Hanahan, investigadors de l'Institut de Tecnologia de Massachussets i de la Universitat de Califòrnia, respectivament, van publicar les habilitats necessàries per assolir aquest fenotip tumoral. Van definir l'alteració de múltiples mecanismes cel·lulars com són els punts de control del cicle cel·lular, l'activació de la proliferació, la inhibició de l'apoptosi, l'augment de la inestabilitat genètica, les alteracions morfològiques (com és la pèrdua de la inhibició del creixement per contacte), la capacitat de créixer amb independència d'un suport d'ancoratge o canvis en la motilitat cel·lular (Hanahan and Weinberg, 2000). En tots aquests processos hi estan implicats oncògens i gens supressors (Kopnin, 2000).

1.2 Regulació del metabolisme de la cèl·lula

L'abril del 2006, a la reunió anual de *l'American Association of Cancer Research*, Eyal Gottlieb, del *Beatson Institute for Cancer Research* de Glasgow, va exposar que estava treballant en el que ell creia una altra habilitat de les cèl·lules tumorals: la bioenergètica. Com és ben sabut, la demanda metabòlica d'aquestes cèl·lules és significativament superior a la dels altres teixits (Garber, 2006), de manera que molts càncers acaben creant una estratègia alternativa a la normal per a la producció d'energia. Aquest fet és conegut des de fa més de 70 anys, quan estudis bioquímics realitzats per Warburg demostraren que la majoria de tumors humans i animals presenten una alta taxa de captació de glucosa i una elevada glucòlisi, fins i

tot en presència d'oxigen, assolint, per tant, una alta producció de lactat a partir de glucosa (Warburg, 1930; Warburg, 1956).

▪ **Metabolisme de la glucosa en cèl·lules normals**

Les cèl·lules necessiten energia (ATP) per tal de sobreviure i proliferar. Aquesta energia prové principalment de dues fonts: la glucòlisi i el cicle de Krebs-cadena respiratòria. La glucòlisi comprèn una sèrie de reaccions que metabolitzen la glucosa fins a lactat. Complementàriament i sota condicions d'aerobiosi, les cèl·lules amb mitocondris oxiden el piruvat amb l'enzim piruvat deshidrogenasa i el conjunt d'enzims del cicle de l'àcid tricarboxílic (TCA) o cicle de Krebs. Així doncs, en presència d'oxigen lliure, a partir d'un mol de glucosa la cèl·lula acaba obtenint 36 mols d'ATP.

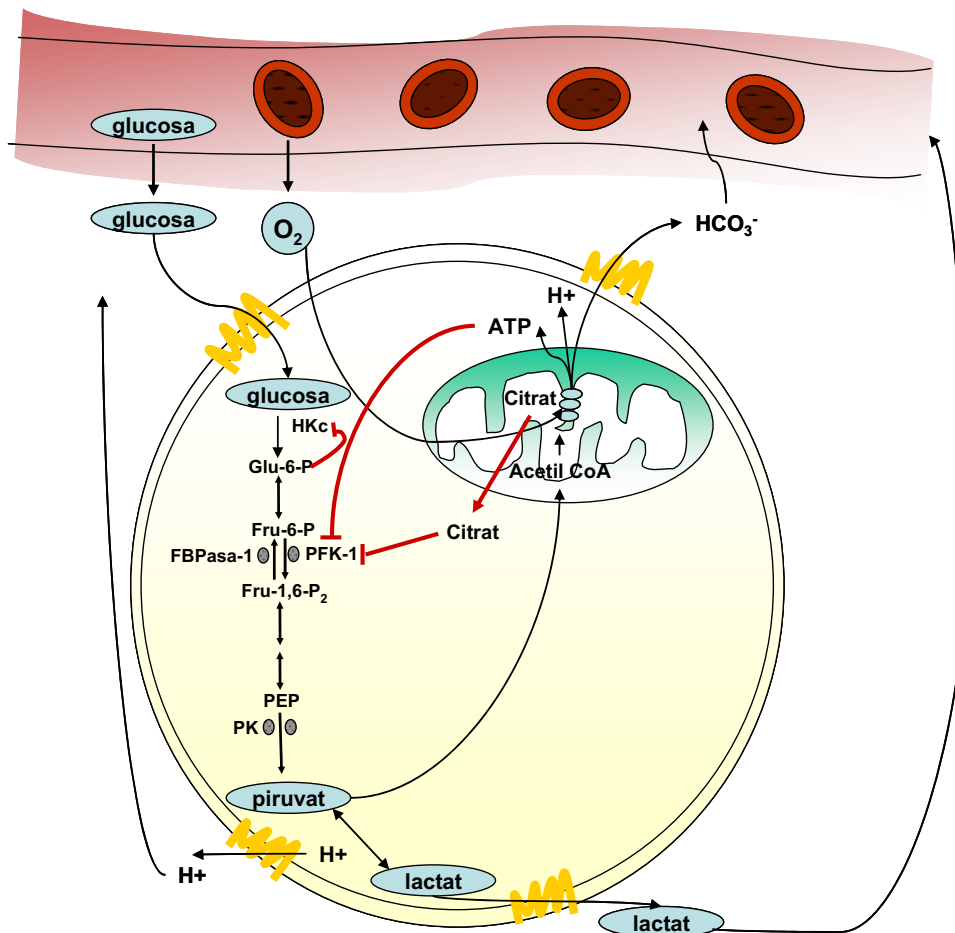


Figura 1. Regulació de la glucòlisi en cèl·lules normals. Esquema de la regulació del metabolisme de la glucosa en cèl·lules normals en presència d'oxigen i concentració de glucosa elevada.

Les cèl·lules diferenciades, doncs, en un ambient on la concentració d'oxigen no és limitant, ajusten la producció de piruvat als nivells de consum d'acetil-CoA i dels requeriments d'energia (Fig. 1). L'any 1860 Louis Pasteur va demostrar que l'oxigen inhibeix la fermentació i que el consum de glucosa és inversament proporcional a la disponibilitat d'oxigen. Aquest efecte d'inhibició de la glucòlisi per part de la presència d'oxigen és conegut amb el nom d'efecte Pasteur.

En canvi, en condicions de manca d'oxigen, es treu el màxim rendiment a la glucòlisi, doncs el piruvat no serà oxidat a acetilCoA, ja que la cadena respiratòria no és activa, i el NADH generat per aquesta via, es reoxida en la reacció de la lactat deshidrogenasa, que permet transformar el piruvat a lactat.

▪ **Metabolisme de la glucosa en cèl·lules tumorals**

El que succeeix en molts tumors, però, és la producció d'energia mitjançant elevades taxes glucolítiques, fins i tot en presència d'oxigen (efecte Warburg) fenomen conegut com a glucòlisi aeròbica (Fig. 2). Warburg considerava que el càncer es produïa com a conseqüència de defectes en la respiració mitocondrial, forçant la cèl·lula a canviar per una forma més primitiva d'obtenció d'energia, la glucòlisi. Des del seu punt de vista, aquest canvi provocava la desdiferenciació i la conversió cap a cèl·lules canceroses (Warburg, 1956). Aquest canvi metabòlic fa que la cèl·lula únicament obtingui un rendiment del 5% de l'energia total a la que podria optar si la glucosa s'oxidés entrant al cicle de Krebs i utilitzant la cadena respiratòria.

A la mateixa època que Otto Warburg, Herbert Grace Crabtree va descriure un fenomen semblant. Va observar que alguns tumors presentaven una disminució de la respiració cel·lular quan s'augmentaven els nivells de glucosa (Crabtree, 1929). Aquest fet, anomenat efecte Crabtree, s'ha descrit a cèl·lules altament proliferants com les que formen part de la mucosa intestinal o als espermatozous (Wojtczak et al., 1999), mentre que la majoria de les cèl·lules diferenciades no presenten aquest comportament.

L'efecte Crabtree i l'efecte Warburg, es poden explicar, de forma parcial, per alteracions enzimàtiques de la cadena respiratòria. Però la hipòtesi que el canvi metabòlic d'activació de la glucòlisi, també anomenat fenotip glucolític, sigui degut a un defecte en la respiració mitocondrial ha estat qüestionat. Alguns tumors no tenen defectes en la respiració i, a més a més, aquesta exerceix un efecte regulador de la glucòlisi (Chance, 2005). Craig Thompson, per exemple, vincula l'efecte Warburg a mutacions a la via de senyalització que regula la captació i oxidació de glucosa per

part de les cèl·lules. Aquestes mutacions desregulen la captació de nutrients i això és, precisament, el que promou la transformació cel·lular. Quan les cèl·lules esdevenen autònomes en l'habilitat de captar els nutrients, no depenen de l'ambient extracel·lular, fet que explicaria el canvi cap al fenotip glucolític. Aquestes cèl·lules transformades capten glucosa contínuament del medi, generant energia que la cèl·lula utilitzarà pel creixement i divisió cel·lular (Garber, 2004). Probablement, els mecanismes bioquímics i moleculars de l'efecte Warburg i de l'efecte Crabtree són múltiples i inclouen tant la disfunció mitocondrial (Wallace, 2005) i les alteracions oncogèniques (Dang and Semenza, 1999), com l'adaptació del tumor al microambient que l'envolta (Gatenby and Gillies, 2004).

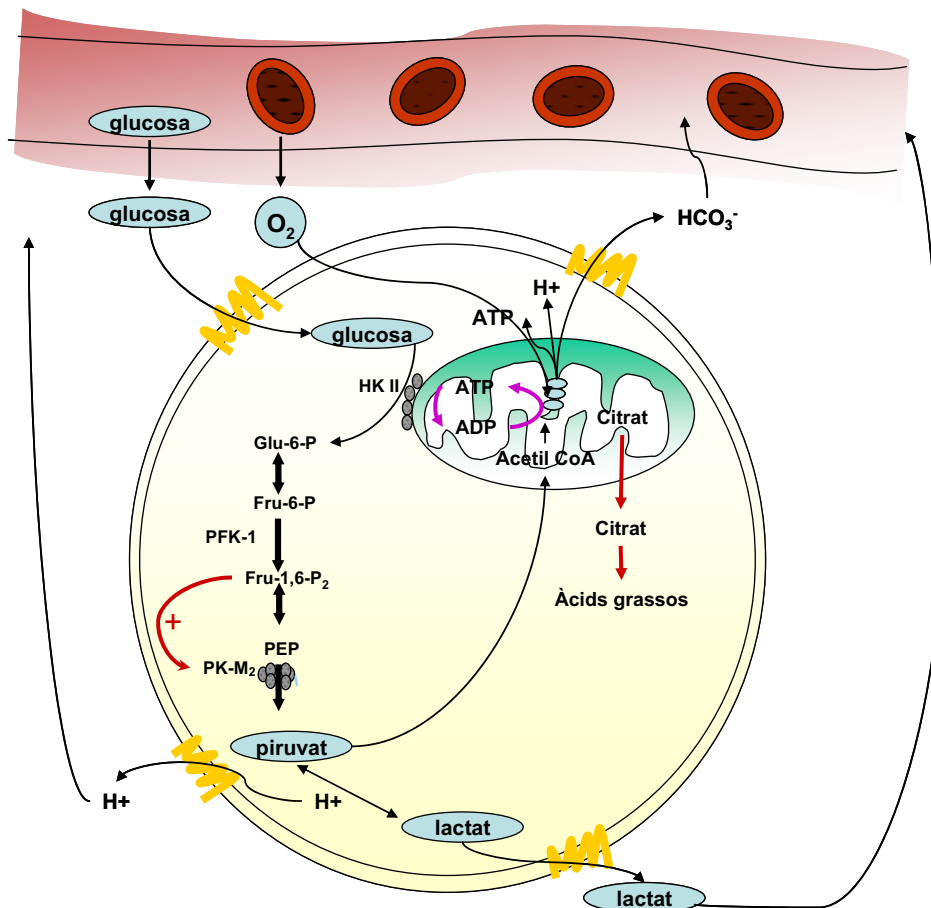


Figura 2. Regulació de la glucòlisi en cèl·lules tumorals. Esquema de la regulació del metabolisme de la glucosa en cèl·lules tumorals en presència d'oxigen i concentració de glucosa elevada.

L'elevada glucòlisi aeròbica no és exclusiva de les cèl·lules tumorals, sinó que també es troba en cèl·lules normals amb proliferació induïda per mitògens quan el

subministrament de glucosa és suficient, així com en cèl·lules de la mucosa intestinal, de la medul·la renal i de la retina (Eigenbrodt et al., 1994).

De tota manera, les cèl·lules tumorals inicialment realitzen la glucòlisi anaeròbica gràcies a que mentre el tumor està creixent i fins que no assoleix unes dimensions determinades, es troba en condicions d'hipòxia (Dang and Semenza, 1999). A més, en molts casos no hi ha un subministrament suficient de glucosa per tal que la glucòlisi aportï tota l'energia i els metabòlits intermediaris que la cèl·lula requereix per la seva proliferació descontrolada. En condicions de baixa concentració de glucosa, aquesta és utilitzada bàsicament per assegurar la síntesi d'àcids nucleics i, l'energia necessària per la divisió cel·lular l'aporta la glutamina. És aleshores quan pràcticament tot l'ATP i el lactat generats per la cèl·lula provenen de la glutamina, per acció de la glutaminòlisi (Medina, 2001). En aquestes condicions, la glucosa que capta la cèl·lula és utilitzada per produir ribosa-5-fosfat (ribosa-5-P), per la via de les pentoses fosfat, i aquesta s'utilitza per sintetitzar fosforibosil pirofosfat (PRPP), factor implicat en la síntesi de nucleòtids i d'aminoàcids (Horecker and Hiatt, 1958; Boros et al., 1997; Macallan et al., 1998)

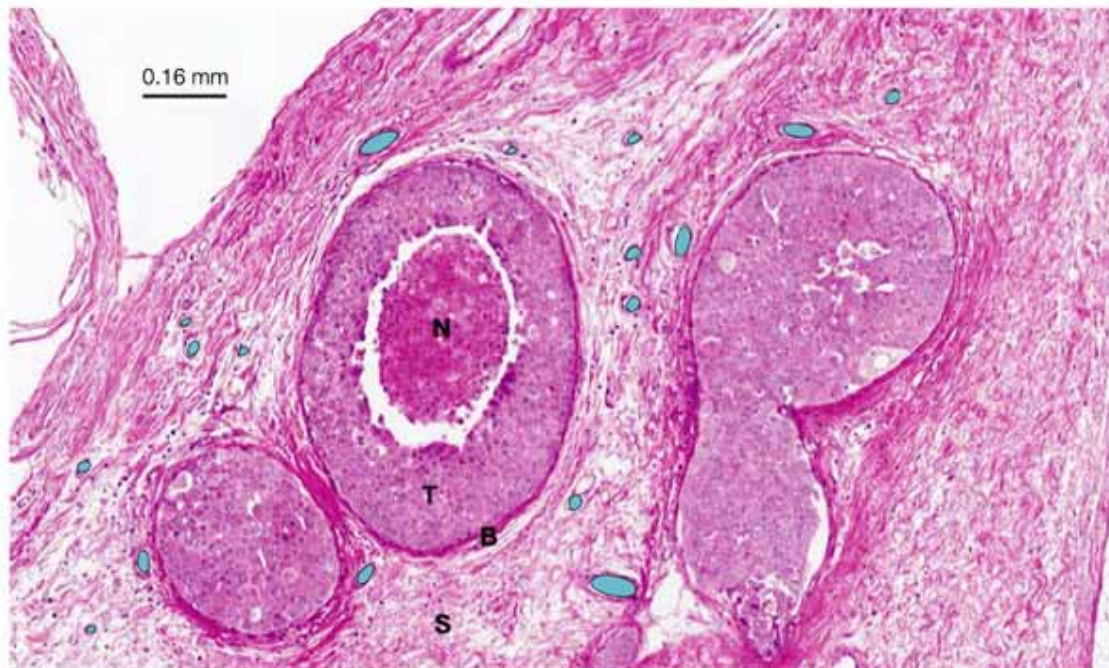
1.3 Evolució de les cèl·lules tumorals cap a un fenotip glucolític

És ben sabut que la respiració anaeròbica és molt menys eficient que l'aeròbica. Mentre que la respiració anaeròbica produeix només 2 mols d'ATP per molècula de glucosa, la respiració aeròbica completa en produeix 36. A més, la producció d'ions d'hidrogen per la glucòlisi provoca una acidificació de l'espai extracel·lular (Schornack and Gillies, 2003) que pot acabar causant dany tissular, degut a la mort cel·lular i a la degradació de la matriu extracel·lular. Però, tot i això, i per molt contradictori que pugui semblar, l'alteració del metabolisme de la glucosa és un dels principals avantatges de les cèl·lules canceroses. Per què, doncs, els tumors evolucionen cap a un fenotip glucolític potencialment tòxic i ineficient?

R. Gatenby i R. Gillies van proposar l'any 2004 que el metabolisme alterat de la glucosa als tumors no només es tracta d'una adaptació a la hipòxia sinó que també confereix uns avantatges de proliferació significatius i necessaris pel fenotip maligne. És a dir, el metabolisme glucídic permet l'adaptació dels tumors a les restriccions ambientals inicials (hipòxia) i, a més, proporciona avantatges proliferatius quan les cèl·lules ja estan plenament transformades.

La lesió pre-maligna, com pot ser un pòlip o un carcinoma *in situ*, està envoltada per un estroma vascular. Aquesta lesió, però, n'està separada físicament per la làmina basal i, per tant, està separada de la seva aportació energètica (de l'oxigen i de la glucosa). D'aquesta manera podem afirmar que l'inici de la carcinogènesi i el desenvolupament del fenotip maligne té lloc en un ambient avascular. Els substrats com l'oxigen i la glucosa, hauran de difondre des dels vasos sanguinis fins a les diferents capes de cèl·lules tumorals atravesant la barrera física que suposa la làmina basal (Fig. 3).

La primera situació limitant que afronten les cèl·lules neoplàstiques és, per tant, la baixa concentració d'oxigen. Models de difusió i estudis empírics demostren que la pressió d'oxigen disminueix més ràpidament que els nivells de glucosa quan recorren la mateixa distància des dels vasos sanguinis fins a les cèl·lules tumorals (Gatenby and Gillies, 2004). En concordança, R. Gatenby i R. Gillies suggereixen que la hipòxia és el factor ambiental que afavoreix el canvi cap al metabolisme anaeròbic (fenotip glucolític) i que permetrà el manteniment de les activitats metabòliques en absència d'oxigen.



Nature Reviews | Cancer

Figura 3. Carcinoma ductal *in situ*. Mostra de biòpsia tenyida amb hematoxilina/eosina. Els vasos sanguinis (punts blaus) es localitzen a l'estroma (S) envoltant el tumor (T). Però el tumor *per se* és avascular i està envoltat per la làmina basal (B). El centre del tumor és necròtic (N). *Nature Reviews Cancer* 4, 891-899 (2004).

Aquesta hipòxia progressiva seleccionarà aquelles cèl·lules que tinguin un metabolisme anaeròbic de la glucosa més actiu, propietat que els permetrà sobreviure millor als episodis d'hipòxia. Al mateix temps, seleccionarà a les que puguin adaptar-se a la disminució del pH extracel·lular degut a la producció de protons per part de la via glucolítica.

Una exposició prolongada de cèl·lules normals a un microambient àcid resulta en necrosis o en apoptosi a través de mecanismes dependents de p53 i de caspasa 3 (Park et al., 1999; Williams et al., 1999). Per tant, una activació constitutiva de la glucòlisi va íntimament lligada a una adaptació als efectes de l'acidosi extracel·lular, com la resistència a l'apoptosi o l'activació de transportadors de membrana per a mantenir el pH intracel·lular.

D'altra banda, les cèl·lules també requereixen un increment de transportadors de glucosa, ja que, a part de l'oxigen, és l'altre substrat limitant.

En resum, l'adaptació local a la hipòxia i al microambient àcid, afavoreix a les cèl·lules tumorals, generant el que es coneix com fenotip glucolític. L'acidificació facilita la invasió tumoral a través de la destrucció de les cèl·lules normals adjacents, degradant la matriu extracel·lular i afavorint l'angiogènesi (Rozhin et al., 1994; Montcourrier et al., 1997).

1.4 El fenotip glucolític de les cèl·lules tumorals

Diferents dades experimentals ens permeten explicar aquest fenotip glucolític, típic de les cèl·lules tumorals, d'entre les quals tenim: la tomografia d'emissió de positrons, els transportadors de glucosa (GLUT), els enzims que formen part de la via glucolítica com l'hexoquinasa (HK), la piruvat quinasa (PK) i la 6-fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), així com l'expressió d'isoenzims típics de teixits embrionaris o poc desenvolupats, que són absents o poc abundants en el teixit normal adult.

- **Tomografia d'emissió de positrons**

En primer lloc, la tomografia d'emissió de positrons (PET) ha demostrat que la majoria de tumors presenten una captació de glucosa que és aproximadament un ordre de magnitud superior a la del teixit normal (Gatenby, 1995). Així, un 90% de tumors primaris i metastàsics presenten un elevat consum de glucosa (Smallbone et al., 2007). També es demostra una correlació directa entre l'agressivitat del tumor i la taxa d'utilització de glucosa (Younges et al., 1996).

- **Transportadors de glucosa**

Per una altra banda, les cèl·lules tumorals presenten una alteració del control de la glucòlisi deguda a un augment del transport de glucosa. Aquest s'associa a l'increment de l'expressió de la família de transportadors de glucosa GLUT (*glucose transporters*) (Macheda et al., 2005). L'estudi de l'expressió de GLUT 1 i GLUT 3 s'ha dut a terme en una gran varietat de tumors, el de pulmó, ovari, mama i colon són els més representatius (Baer et al., 1997; Ogawa et al., 1997; Younes et al., 1997; Haber et al., 1998; Cantuaria et al., 2001; Kang et al., 2002). La sobreexpressió d'aquests transportadors de glucosa també s'ha utilitzat com a paràmetre indicador de baixa taxa de supervivència (Macheda et al., 2005).

- **Hexoquinasa**

A les cèl·lules tumorals s'observa la sobreexpressió de la hexoquinasa II (HK-II) (Rempel et al., 1996; Mathupala et al., 1997). Aquest isoenzim fosforilarà la glucosa amb alta afinitat, atrapant-la a l'interior de la cèl·lula en forma de glucosa-6-fosfat (Glu-6-P). A més a més es pot unir a la membrana mitocondrial (Bustamante and Pedersen, 1977) i ser menys sensible a la inhibició per Glu-6-P (Bustamante and Pedersen, 1980), a diferència d'altres isoenzims de la HK. La HK II també és regulable pels nivells de Glu-1,6-P₂ (Beitner, 1979).

- **Piruvat quinasa**

En les cèl·lules tumorals s'expressa la piruvat quinasa (PK) de tipus M₂ (Ibsen et al., 1983), isoenzim que presenta una menor afinitat pel fosfoenolpiruvat (PEP) i s'inhibeix a unes concentracions menors d'alanina que altres isoenzims de la PK (Schering et al., 1982). La PK-M₂ es troba en forma dimèrica en les cèl·lules tumorals, però, sota certes condicions pot tetrameritzar i passa a tenir més afinitat pel PEP i presentar una major activitat. La conversió de dímer a tetràmer està regulada primerament per la síntesi de determinats aminoàcids com l'alanina o la serina i la d'intermediaris de la glucòlisi com la Fru-1,6-P₂ (Fig. 2) (Fister et al., 1983).

- **6-fosfofructoquinasa-1**

La 6-fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) és un dels enzims que catalitza una reacció allunyada de l'equilibri i converteix la fructosa-6-fosfat (Fru-6-P) a Fructosa 1,6-bisfosfat (Fru-1,6-P₂). L'elevat flux glucolític de les cèl·lules tumorals també s'acompanya de l'elevada activitat de la PFK-1. Aquesta s'ha observat a diferents línies cel·lulars de càncer i en teixits de tumors primaris *in situ* (Hennipman et al., 1988; Sanchez-Martinez and Aragon, 1997).

Aquestes i d'altres modificacions presents en les cèl·lules tumorals fan que, en presència de suficient glucosa, presentin uns nivells de glucòlisi molt alts, tot i la presència d'oxigen (Fig. 2).

1.5 L'enzim 6-fosfofructoquinasa-1

La taxa de flux glucolític és controlada a diferents nivells pels següents mecanismes: disponibilitat de substrats, concentracions i característiques enzimàtiques, efectors al·lostèrics i modificacions covalents dels enzims reguladors.

La PFK-1 és un enzim multimodulat que presenta regulació al·lostèrica per múltiples efectors i metabòlits de la via. Aquesta regulació la realitzen dos substrats de la reacció, l'ATP i la Fru-6-P, a més d'un seguit d'efectors negatius (citrat, Glicerol-3-P) i positius (com l'AMP) que reforcen l'acció dels substrats. L'ATP actua com a efector al·lostèric negatiu, mentre que la Fru-6-P allibera l'enzim d'aquesta inhibició per l'ATP.

A principis de la dècada dels 80, durant l'estudi de l'acció del glucagó en la gluconeogènesi hepàtica, el grup del professor H.G. Hers va descobrir la Fructosa 2,6-bisfosfat (Fru-2,6-P₂) i es comprovà que era l'activador al·lostèric més potent de la PFK-1 (Van Schaftingen et al., 1980a; Van Schaftingen et al., 1980b; Pilkis et al., 1981a; Uyeda et al., 1981; Van Schaftingen et al., 1981).

Els primers estudis realitzats sobre el paper de la Fru-2,6-P₂ mostraven que desenvolupa una doble funció, ja que d'una banda augmenta l'afinitat de la PFK-1 per la Fru-6-P i, d'altra banda, allibera a l'enzim de la inhibició per l'ATP. També augmenta l'afinitat de la PFK-1 i de la Fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1), que catalitza el pas de Fru-1,6-P₂ a Fru-6-P, per l'AMP. L'AMP activa la PFK-1 i inhibeix la FBPasa-1 (Pilkis et al., 1981b; Van Schaftingen and Hers, 1981; Van Schaftingen et al., 1981). Així doncs, els canvis en la concentració d'aquest metabòlit regulen l'activitat de la PFK-1 en tots els teixits glucòlisi-depenents. Indirectament, regulen la intensitat i la direcció de la glucòlisi i la gluconeogènesi amb aquest doble efecte sobre la PFK-1 i la FBPasa-1. Aquestes propietats de la Fru-2,6-P₂ li confereixen un paper clau en el control del pas de Fructosa 6-fosfat a Fructosa 1,6-bisfosfat. Des del seu descobriment en fetge de rata l'any 1980, s'ha trobat en totes les espècies eucariotes estudiades.

1.6 La Fru-2,6-P₂ en cèl·lules proliferants i tumorals

De la comparació de la concentració de Fru-2,6-P₂ en línies cel·lulars tumorals amb els valors del teixit normal se'n desprèn una doble realitat: en alguns casos és la mateixa, com succeeix en les cèl·lules d'hepatoma de rata (HTC) (Loiseau et al., 1985) o en les de tumors ascítics d'Ehrlich (Bosca et al., 1985b); mentre que en d'altres és clarament superior, com s'observa en les cèl·lules HeLa (Mojena et al., 1985), les cèl·lules HT29 d'adenocarcinoma de còlon (Denis et al., 1986), les de carcinoma de pulmó de Lewis (Miralpeix et al., 1990) o en les cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica (Colomer et al., 1987).

Així mateix, s'han realitzat estudis en què es determina el paper de la Fru-2,6-P₂ en l'activació del flux glucolític en cèl·lules proliferants o tractades amb agents mitogènics. Fibroblasts humans tractats amb sèrum i insulina demostren la correlació entre l'estimulació de la producció de lactat amb un augment en la concentració de Fru-2,6-P₂ (Bruni et al., 1983; Farnararo et al., 1984). De la mateixa manera, l'estimulació de la glucòlisi observada en fibroblasts embrionaris de pollastre en resposta a concentracions mitogèniques d'insulina i d'èsters de forbol també es correlaciona amb un augment de la concentració de Fru-2,6-P₂ (Bosca et al., 1985a). Paral·lelament, la transformació de fibroblasts embrionaris de pollastre amb retrovirus que contenen els oncògens *v-src* o *v-fps*, també provoca una inducció dels nivells de Fru-2,6-P₂, així com una estimulació del flux glucolític i de la proliferació cel·lular (Bosca et al., 1986). Tot i que aquest efecte té lloc per una via diferent a la dels èsters de forbol (Marchand et al., 1992). D'altra banda, Kole i col·laboradors demostren que la concentració de Fru-2,6-P₂ en fibroblasts Rat-1 es triplica com a resultat de la transformació induïda per l'oncogen Ras (Kole et al., 1991a).

En altres línies cel·lulars establertes s'han trobat resultats equivalents. Cèl·lules HT29 d'adenocarcinoma de còlon humà estimulades amb èsters de forbol o insulina presenten un augment en el consum de glucosa, dels nivells de Fru-2,6-P₂ i de la producció de lactat (Denis-Pouxviel et al., 1990). El factor de creixement epidèrmic (EGF) incrementa els nivells de Fru-2,6-P₂ en cèl·lules A431 d'adenocarcinoma humà (Baulida et al., 1992). En fibroblasts swiss-3T3, l'estimulació de diferents vies mitogèniques (PKC, cAMP i insulina) produeixen un augment de la concentració intracel·lular de Fru-2,6-P₂ (Dalmau et al., 1994).

Tots aquests resultats posen de manifest una correlació entre els nivells de Fru-2,6-P₂ i la taxa glucolítica en diferents condicions on s'estimula la proliferació cel·lular. D'aquesta manera, ens permeten destacar la importància d'aquest metabòlit en la regulació de la glucòlisi i, més concretament, en el paper que pot jugar en sistemes proliferants.

1.7 L'enzim 6-fosfofructoquinasa-2/fructosa 2,6-bisfosfatasa

La concentració de la Fru-2,6-P₂ depèn de l'activitat d'un grup d'enzims designats sota el nom de 6-fosfofructoquinasa-2/fructosa 2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2). S'encarreguen de catalitzar la síntesi i degradació de la Fru-2,6-P₂ i, per tant, de regular d'una forma crítica el metabolisme de carbohidrats (Pilkis et al., 1995; Rider et al., 2004).

El balanç entre l'activitat 6-fosfofructoquinasa-2 (PFK-2), que sintetitza la Fru-2,6-P₂ a partir de Fru-6-P i ATP, i l'activitat Fructosa 2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2), que degrada la Fru-2,6-P₂ en Fru-6-P i el fosfat inorgànic, és el que acaba determinant la concentració d'aquest metabòlit.

Les activitats PFK-2 i FBPasa-2 copurifiquen en una proteïna de 110 kDa formada per dues subunitats de 55 kDa cadascuna. Cada monòmer presenta les dues activitats en la mateixa cadena polipeptídica comportant-se com un enzim homodimèric i bifuncional, anomenat 6-fosfofructoquinasa-2/Fructosa 2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2) i que presenta el domini quinasa en el N-terminal de la proteïna i el bisfosfatasa en el C-terminal (Fig. 4) (El-Maghrabi et al., 1982; Pilkis et al., 1995; Okar et al., 2001).

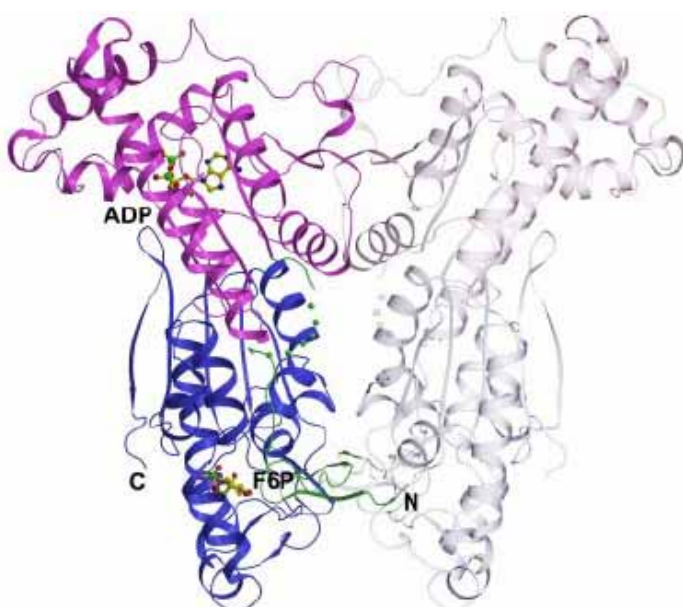


Figura 4. Estructura tridimensional del dímer PFK-2/FBPasa-2 de l'isoenzim ubic. El domini quinasa es representa de color lila, al centre catalític és on es troba unit l'ADP. El domini bisfosfatasa està representat en blau i al centre catalític s'hi representa unida la Fructosa 6-fosfat (Kim et al., 2006b).

La importància que té la Fru-2,6-P₂, en el control del metabolisme dels carbohidrats, fa que la regulació de les dues activitats encarregades de sintetitzar-lo i degradar-lo hagin d'estar molt relacionades i compenetrades per adaptar els nivells de Fru-2,6-P₂ a les necessitats que la cèl·lula o el teixit té en cada moment.

Les propietats d'aquest enzim bifuncional van ser descrites per primera vegada en fetge i es va comprovar que l'activitat PFK-2 es troba inhibida per citrat, PEP i sn-glicerol-3-fosfat, a concentracions fisiològiques d'aquests metabòlits en l'hepatòcit, i activada per la Fru-6-P. Contràriament, l'activitat FBPasa-2 és estimulada per sn-glicerol-3-fosfat i nucleòsids trifosfats i està inhibida per la Fru-6-P (Bartrons et al., 1983; Rousseau and Hue, 1993). A més a més, aquest enzim es fosforila en la Ser-32 en resposta a glucagó per acció de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (PKA). Aquesta fosforilació en el N-Terminal de la proteïna produeix un canvi conformacional en el dímer (Okar et al., 2001) que comporta una disminució de l'activitat quinasa i un augment de la bisfosfatasa (Bartrons et al., 1983; Stewart et al., 1986; Exton, 1987). L'efecte contrari té lloc amb la defosforilació de l'enzim en resposta a insulina (Pilkis, 1988; Nishimura et al., 1994) (Fig. 5).

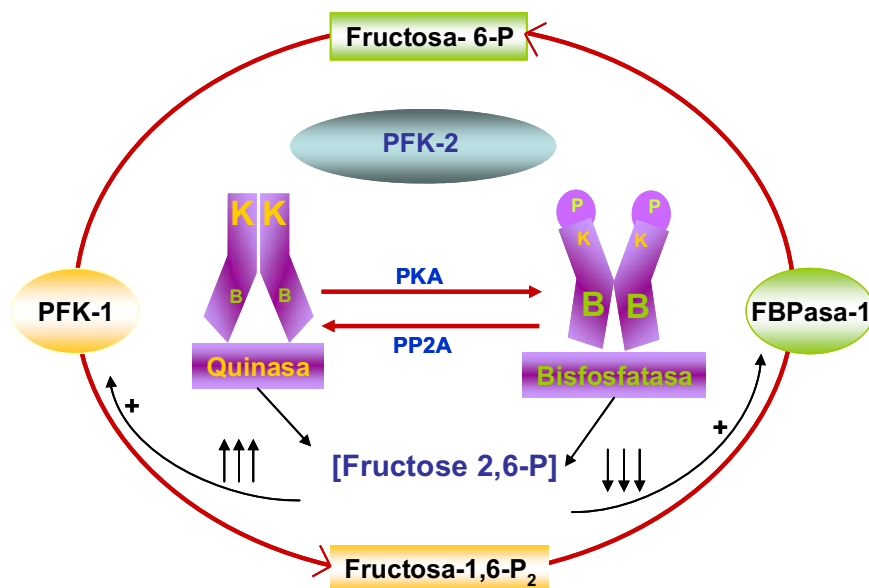


Figura 5. Activitat de la 6-fosfructoquinasa-2/Fructosa 2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2) en fetge. Quan l'activitat bisfosfatasa és elevada, la concentració de Fru-2,6-P₂ disminueix i per tant es facilita el pas de Fru-1,6-P₂ a Fru-6-P. Quan l'activitat predominant és la quinasa, la concentració de Fru-2,6-P₂ augmenta i s'activa de forma al·lostèrica la PFK-1 i, conseqüentment, el flux glucolític.

Tot i que la concentració de la Fru-2,6-P₂ depèn de l'activitat relativa de PFK-2/FBPasa-2 en tots els teixits, la importància que té aquest metabòlit en el control del metabolisme dels carbohidrats no és igual en tots ells. Així, mentre que la relació

entre la concentració de Fru-2,6-P₂ i la regulació del flux glucolític i gluconeogènic és clara en fetge, en teixits com el múscul esquelètic, el testicle o el cervell passa a tenir un paper permissiu, mantenint la PFK-1 en estat actiu, tot i la concentració d'inhibidors al·lostèrics (ATP). En aquells teixits on la glucòlisi és la principal font d'energia, la funció prioritària d'aquest metabòlit és mantenir la via permanentment activa (Hue and Rider, 1987; Pilkis, 1988; Hue et al., 1990; Ventura et al., 1991).

El grau de complexitat que suposa la regulació dels nivells de Fru-2,6-P₂ en cada teixit i condició fisiològica, expliquen l'existència de diferents isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2 capaços d'adaptar-se a la cèl·lula o teixit i respondre eficientment a les possibles demandes.

1.8 Isoenzims de la família PFK-2/FBPasa-2

Des de la descoberta de la isoforma de PFK-2/FBPasa-2 de fetge de rata, s'han descrit més isoformes localitzades originalment en múscul esquelètic (Darville et al., 1989), cor (Darville et al., 1991), cervell (Ventura et al., 1992; Watanabe et al., 1994; Ventura et al., 1995), testicle (Sakata et al., 1991; Manzano et al., 1999), així com un isoenzim denominat "F-type" clonat a partir de cèl·lules FTO2B d'hepatoma de rata (Dupriez et al., 1993), molt semblant a les isoformes de fetge i múscul. També s'ha identificat un nou isoenzim a cor que únicament difereix en el C-terminal de la isoforma descrita anteriorment (Vidal et al., 1993). I la isoforma ubiqua clonada a partir d'una llibreria de cDNA de cervell fetal i que és present en tots els teixits estudiats (Manzano et al., 1998). Aquesta isoforma també va ser clonada a partir de placenta (Sakai et al., 1996) i de cèl·lules tumorals T47D de càncer de mama (Hamilton et al., 1997). Per últim, la isoforma induïble, descrita per Chesney i col·laboradors, que només difereix en l'extrem C-terminal amb l'isoenzim ubic (Chesney et al., 1999; Navarro-Sabaté et al., 2001).

Tot i que l'estructura del centre catalític dels diferents isoenzims es troba molt conservada, presenten diferències en la relació quinasa:bisfosfatasa (Taula 1), així com diferències en la capacitat de ser fosforilades per les proteïnes quinases que regulen la seva activitat (Taula 1). Possiblement aquestes variacions són degudes a les diferències en la seqüència dels extrems N- i C-terminals que confereixen canvis estructurals a la proteïna.

Com s'ha assenyalat anteriorment, l'isoenzim de fetge es fosforila per PKA com a resposta a glucagó, però la PKA no actua només disminuint l'activitat quinasa sinó que augmenta la fosfatasa (Bartrons et al., 1983). En el cas de la PFK-2 de cor, la PKA l'activa per fosforilació a la Ser-466 (Kitamura et al., 1988). Aquesta Ser-466 s'ha descrit juntament amb la Ser-483 com a necessàries per a l'activació de l'isoenzim per acció de la insulina via PI3K (Lefebvre et al., 1996) i de l'adrenalina (Rider et al., 1992). Experiments in vitro mostren que és PKB qui fosforila i activa la PFK-2 de cor boví a les serines 466 i 483 (Deprez et al., 1997), en resposta a insulina, mentre que es tracta de PKA qui duu a terme l'acció de l'adrenalina (Rider et al., 1992). Aquest mateix isoenzim també és substrat de la PKC, el qual fosforila les serines 84, 466 i 475 (Rider et al., 1992) i Thr 476 (Kitamura et al., 1988), però encara no està clar el paper fisiològic d'aquestes fosforilacions.

La glucòlisi al cor també s'estimula quan l'aportació d'oxigen és insuficient. La caiguda de la concentració d'ATP paral·lela a l'augment d'AMP, activa AMPK (Hardie et al., 1998), que estimula la glucòlisi incrementant la translocació de GLUT 4 i activant la PFK-2 de cor per fosforilació a la serina 466 (Marsin et al., 2000). De manera que la Ser-466 de l'isoenzim de cor, coincideix com a lloc de fosforilació per PKA, PKB, PKC i AMPK.

L'AMPK és un regulador metabòlic que es troba a totes les cèl·lules eucariotes. S'activa quan augmenta la relació AMP:ATP (com passa durant la hipòxia o durant la falta d'aportació de nutrients) i actua com un sensor de l'estat energètic de la cèl·lula i sobre les vies biosintètiques de glicogen (Carling et al., 1989; Young et al., 1996), d'àcids grassos, colesterol (Carling et al., 1989) i de fosfocreatina (Ponticos et al., 1998) de diferents teixits (fetge, teixit adipós i múscul esquelètic). També s'ha demostrat que l'AMPK regula l'activació de dos gens supressors de tumors. La identificació del TSC2 (supressor tumoral) com a substrat directe de l'AMPK pot explicar perquè l'activació d'aquesta quinasa inhibeix la síntesi proteica (Inoki et al., 2003). La TSC2 és un dels regulador negatius de la proteïna quinasa mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que estimula el creixement cel·lular i la síntesi proteica com a resposta a factors de creixement i a nutrients (Wullschleger et al., 2006). Tots aquests efectes que tenen com a conseqüència la disminució del consum d'ATP i l'augment paral·lel de la seva producció, tenen lloc per la fosforilació directa, activació i inactivació d'enzims claus d'aquestes vies.

L'isoenzim ubic (uPFK-2) i l'isoenzim induïble (iPFK-2) contenen un mateix lloc de fosforilació per AMPK, la Ser-461 (Marsin et al., 2000; Bando et al., 2005), que

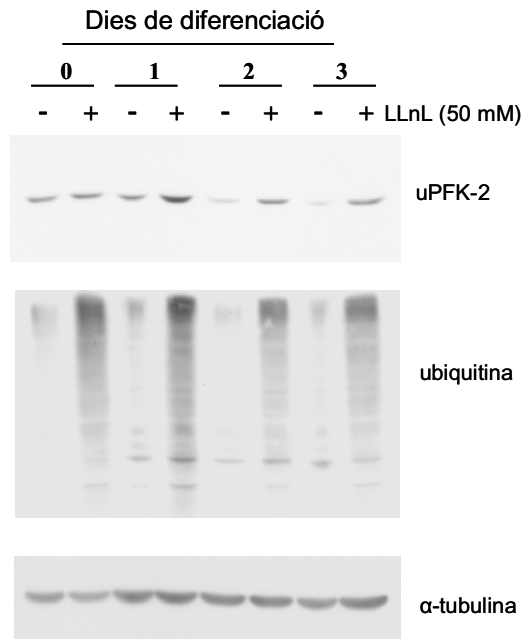


Figura 7. La via de degradació ubiquïtina-proteasoma està involucrada en la regulació d'uPFK-2. Els extractes totals de cèl·lules C2C12 de diferents dies de diferenciació es van incubar amb (+) o sense (-) 50 μ M de LLnL durant 8 h per ser analitzats per *Western blot*. S'utilitza l'anticòs contra la ubiquïtina com a control de l'inhibició del proteasoma, i l'anticòs contra α -tubulina s'utilitza com a control de càrrega.

1.9 Gens que codifiquen per la família d'isoenzims PFK-2/FBPasa-2

Tots els isoenzims PFK-2/FBPasa-2 identificats fins al moment estan codificats per quatre gens independents que reben el nom de *pfkfb1*, *pfkfb2*, *pfkfb3* i *pfkfb4*. Les dades aportades per la seqüenciació del genoma humà semblen indicar que no queda cap nou gen de la PFK-2/FBPasa-2 per descriure, però el que encara està per veure és si s'han descrit tots els isoenzims que codifiquen aquests quatre gens o encara queden variants obtingudes per *splicing* alternatiu que no s'han identificat.

El gen *pfkfb1* codifica per les isoformes originalment identificades a fetge, múscul i la isoforma fetal. El gen *pfkfb2* codifica per l'isoenzim identificat a cor i ronyó. El gen *pfkfb3* codifica pels isoenzims de cervell, placenta i teixit adipós, actualment anomenat ubic, i per l'induïble. I per últim, el gen *pfkfb4* que codifica per l'isoenzim de testicle (Taula 1).

GEN	LOCALITZACIÓ AL CROMOSOMA	RELACIÓ QUINASA:BISFOSFATASA	ISOENZIMS IDENTIFICATS FINS AL MOMENT (PROTEÍNA)	FOSFORILACIONS PER:
PFKFB1	Human Xp11.21	2.5 (determinat a fetge de rata) 0.4 (determinat a múscul de rata)	IPFK-2 (fetge) mPFK-2 (múscul) fPFK-2 (fetal)	PKA
PFKFB2	Human 1q31	1.8 (determinat a cor boví)	hPFK-2 (cor)	PKA, PKC, PKB, AMPK
PFKFB3	Human 10p14-p15	710 (determinat a placenta humana) 3.1 (determinat a cervell boví)	uPFK-2 (cervell, placenta i ubic) iPFK-2 (induïble)	PKA, PKC, AMPK
PFKFB4	Human 3p21-p22	0.9 (determinat a testicle humà) 4.9 (determinat a testicle de rata)	tPFK-2 (testicle)	

Taula 1. Gens de la família PFK-2. Relació quinasa:bisfosfatasa, quinases que els fosforilen, i quins isoenzims codifica cada gen.

Però tot i tenir cada isoenzim el nom del teixit on es va identificar originalment, ara se sap que vàries isoformes es poden coexpressar en un mateix teixit (Minchenko et al., 2003) i que a cada teixit el paper de la isoforma pot variar depenent de la relació quinasa:bisfosfatasa que tingui. Així, per exemple, els isoenzims codificats pels gens *pfkfb1*, *pfkfb2* i *pfkfb4* presenten una relació quinasa:bisfosfatasa molt semblant, mentre que el producte del gen *pfkfb3* mostra una activitat bisfosfatasa marcadament inferior, té un quocient quinasa:bisfosfatasa de 710:1 (Taula 1) (Sakakibara et al., 1997). Aquest quocient li atorga un paper principalment glucolític, ja que el balanç a favor de l'activitat quinasa és molt marcat, de manera que la concentració de Fru-2,6-P₂ resultant és elevada i, conseqüentment, l'enzim PFK-1 està activat afavorint la via glucolítica front la gluconeogènica.

Com s'ha descrit anteriorment, la Fru-2,6-P₂ té un paper clau en l'alta taxa glucolítica que presenten les cèl·lules proliferants i les tumorals. Diversos estudis realitzats correlacionen la inducció de la proliferació o la transformació oncogènica amb un augment dels nivells d'aquest metabòlit i de la producció de lactat. En tots aquests treballs també s'observa un augment de l'activitat quinasa de la PFK-2/FBPasa-2. Aquests resultats han estat obtinguts en diferents línies cel·lulars i sota diferents estímuls (Taula 2).

Així doncs, l'augment d'expressió de PFK-2/FBPasa-2 es correlaciona amb l'augment de la concentració cel·lular de Fru-2,6-P₂ en sistemes proliferants.

Paral·lelament, la inducció de la proliferació per agents mitogènics o transformació oncogènica es correlaciona amb la producció de lactat i una alta taxa glucolítica. En relació amb aquesta situació, es van sumar esforços per tal de determinar quin dels isoenzims de la família PFK-2 era el responsable d'aquest efecte en sistemes proliferants.

TIPUS CEL·LULAR	ESTÍMUL	NIVELLS FRU-2,6-P ₂	ACTIVITAT PFK-2
Fibroblasts	Sèrum, Insulina, PMA, EGF, AMPc Oncogens: <i>v-src</i> , <i>v-fps</i> , <i>Ras</i>	↑	↑
Limfòcits	PDB, IL-4 PMA	↑ ↑	↔ ↑
HT-29	Insulina, PMA	↑	↑
A431	EGF	↑	↑
Hepatòcits: fetals, adults	PMA PMA	↑ ↔	↑ ↔

Taula 2. Nivells de Fru-2,6-P₂ i activitat PFK-2 en diferents línies cel·lulars. Representació del comportament de la concentració de Fru-2,6-P₂ i de l'activitat PFK-2 quan s'indueix la proliferació de diferents línies cel·lulars per acció d'estímuls diferents. Les HT29 són cèl·lules d'adenocarcinoma de còlon i les A431 són cèl·lules d'adenocarcinoma humà. La fletxa simple representa augments de la concentració o de l'activitat, la fletxa doble s'utilitza quan aquests no varien. La taula s'ha elaborat a partir dels resultats de: (Bruni et al., 1983); (Farnararo et al., 1984); (Bosca et al., 1985b); (Bosca et al., 1986); (Bruni et al., 1986); (Denis et al., 1986); (Bruni et al., 1987); (Bosca et al., 1988); (Denis-Pouxviel et al., 1990); (Colomer et al., 1991); (Kole et al., 1991a); (Baulida et al., 1992); (Cascales et al., 1992); (Marchand et al., 1992); (Dalmau et al., 1994).

S'ha demostrat que, tot i la coexpressió de diferents isoenzims de la família PFK-2 en cèl·lules epitelials humanes i en fibroblasts de ratolí, el producte del gen *pfkfb3* és el que té l'activitat quinasa més elevada i, pot determinar una alta concentració intracel·lular de la Fru-2,6-P₂ (Sakakibara et al., 1997), mantenint així un elevat flux glucolític. Aquest gen seria, doncs, un dels responsables del fenotip glucolític i explicaria bona part dels resultats obtinguts prèviament. Per exemple, els observats per Hue l'any 1993, on es demostrava l'activació d'un isoenzim PFK-2/FPBasa-2 en models de proliferació hepàtica (Hue and Rousseau, 1993) que no tenia activitat bisfosfatasa.

Hamilton i col·laboradors van demostrar, l'any 1997, la presència del mRNA del gen *pfkfb3* en diferents línies cel·lulars de càncer de mama i la seva ràpida inducció amb l'ús d'anàlegs de progesterona, suggerint que aquest gen pot desenvolupar una funció important en la progressió del càncer de pit (Hamilton et al., 1997). Paral·lelament, tant el mRNA del gen *pfkfb3* com la seva proteïna es van trobar sobreexpressats en diferents línies cel·lulars de leucèmia i adenocarcinoma en comparació amb les cèl·lules normals (Chesney et al., 1999; Atsumi et al., 2002). Altres estudis realitzats al nostre laboratori identificaven la presència del mRNA d'aquest gen a línies cel·lulars de càncer com les HeLa (càncer de cèrvix) i les HT 29 d'adenocarcinoma de còlon (Navarro-Sabaté et al., 2001; Riera et al., 2002; Calvo et al., 2006) demostrant així la seva importància en aquestes cèl·lules altament transformades (Taula 3).

Identificació del mRNA del gen <i>pfkfb3</i> en línies cel·lulars transformades	
Càncer de cèrvix	HeLa
Adenocarcinoma de colon o colorectal	HT 29, SW 480 i SW 620
Hepatoma humà	Hep3B
Càncer de mama	T47D, MCF 7, MDAMB 330, MDAMB 231, MDAMB 134, MDAMB 157 i BT 549
Leucèmia o limfoma	HL 60, K 562, Raji i MOLT 4
Càncer de pulmó	A 549
Melanoma	G 361
Sobreexpressió sota condicions d'hipòxia a cèl·lules transformades	Hep3B i SW 620

Taula 3. mRNA del gen *pfkfb3* identificat a diferents línies cel·lulars de càncer.

La confirmació de què el gen *pfkfb3*, i més concretament l'isoenzim ubic (uPFK-2), està involucrat en la viabilitat i proliferació cel·lular es va realitzar amb la inducció de la silenciació del seu RNA (Calvo et al., 2006) i amb la utilització d'un inhibidor específic de PFK-2, *N*-bromoacetiletanolamina fosfat i els seus anàlegs (Hirata et al., 2000). Així doncs, la línia cel·lular HeLa es va transfectar amb el siRNA contra el producte del gen *pfkfb3* i es va observar una disminució de la viabilitat cel·lular, un retard en la progressió del cicle cel·lular i la inhibició de la capacitat de creixement per ancoratge, és a dir, la disminució de la capacitat de formació de focus

en un cultiu semisòlid. Aquesta capacitat és conseqüència de la transformació (Calvo et al., 2006). Resultats semblants s'observen amb l'ús dels inhibidors específics de l'activitat quinasa (PFK-2), obtenint una disminució del creixement tumoral (Hirata et al., 2000).

Aquests resultats permeten postular que l'isoenzim codificat pel gen *pfkfb3* és un dels responsables d'induir la glucòlisi en sistemes proliferants.

1.10 Qui regula la glucòlisi en el creixement i progressió tumoral?

Considerant la importància de la glucòlisi en el creixement i progressió tumoral, se'ns planteja la pregunta: Qui la regula en aquestes condicions?

S'han descrit diferents oncògens (com Ras i Myc) i quinases de senyalització (com Akt) que de per si activen la glucòlisi a cèl·lules transformades. Ras, per exemple, regula la captació de glucosa i la glucòlisi a cèl·lules neoplàsiques (Blum et al., 2005; Vizan et al., 2005). La transfecció de l'oncogen Ras a cèl·lules de fibroblast Rat-1, provoca l'increment d'activitat de l'enzim 6-fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), incrementant la concentració de la Fructosa 2,6-bisfosfat (Kole et al., 1991a). A més a més, recentment, s'ha demostrat que l'expressió de l'enzim uPFK-2 és necessària pel control del flux glucolític de les cèl·lules transformades amb Ras (Telang et al., 2006). Myc també promou el metabolisme de la glucosa i, a més, les cèl·lules transformades amb c-Myc són susceptibles a l'apoptosi induïda per la privació de carbohidrats (Shim et al., 1998; Osthus et al., 2000).

D'altra banda, Akt pot activar la glucòlisi sense incrementar la fosforilació oxidativa (Garber, 2006). L'Akt mobilitza els transportadors de glucosa a la superfície de la membrana cel·lular, per tal d'augmentar la captació de la glucosa, i senyala a la hexoquinasa II (HK II) que s'uneixi a la membrana mitocondrial. D'aquesta manera assoleix un accés preferent a l'ATP generat i elimina els efectes inhibitoris de la glucosa-6-fosfat (Bustamante and Pedersen, 1977). A més a més, l'Akt provoca una estimulació de la glucòlisi dosi-depenent. En línies cel·lulars de glioblastoma humà (LN299 i LN18) les diferents taxes de metabolisme de la glucosa observades es correlacionen amb l'activitat de l'Akt. La inhibició de l'activació d'Akt a les cèl·lules LN18 impedeix l'increment de l'utilització de glucosa, mentre que l'activació d'Akt a les cèl·lules LN299 les transforma en cèl·lules amb elevats nivells de glucòlisi aeròbica. Akt promou directament la utilització de la glucosa per part de les cèl·lules proliferants sense incrementar el consum d'oxigen (Elstrom et al., 2004).

Un altre regulador transcripcional del metabolisme tumoral és p53, que s'estabilitza i activa l'expressió dels seus gens diana en resposta a estrès cel·lular (activació d'oncògens o dany al DNA). Els gens diana generen una sèrie de respostes cel·lulars per a apaivagar l'estrès. Aquestes inclouen la reparació del DNA, la parada de cicle cel·lular, la senescència i l'apoptosi (Vousden and Lu, 2002). Recentment s'ha descrit un nou producte de p53: TIGAR (en anglès *TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*). Aquest gen, induït per p53, comparteix semblances amb les seqüències funcionals del domini bisfosfatasa dels gens de la família PFK-2/FBPasa-2 i, quan és activat, provoca una disminució dels nivells de Fru-2,6-P₂ bloquejant la glucòlisi i dirigint els substrats a la ruta de les pentoses fosfat per tal de produir NADPH i Ribosa 5-P (Bensaad et al., 2006). Una conseqüència important de la ruta de les pentoses fosfat i de l'increment de la generació de NADPH és un augment dels nivells de glutatió (GSH), protegint així les cèl·lules dels radicals lliures. El bloqueig del gen TIGAR fa que les cèl·lules siguin extremadament sensibles a l'estrès o dany al DNA i entrin ràpidament en apoptosi. Es pot hipotetitzar, doncs, que la funció de TIGAR podria ser la de dirigir la glucosa cap a la síntesi de nucleòtids i altres productes importants per la reparació de les lesions del DNA. Durant l'oncogènesi, les cèl·lules que acumulen defectes en la via de p53, tenen la glucòlisi plenament activa i, per tant, les restriccions del creixement tumoral es perden.

A part dels oncògens i de les quinases, existeix un factor de transcripció decisiu en el metabolisme de carbohidrats en situacions de baixa pressió d'oxigen. Es tracta del factor induïble per hipòxia 1 (HIF-1), que activa l'expressió dels seus gens diana en condicions de baixa concentració d'oxigen. Aquests gens diana estan involucrats en angiogènesi, transport d'oxigen, glucòlisi, captació de glucosa, senyalització per factors de creixement, apoptosi, invasió i metàstasi (Fig. 8) (Semenza, 2001).

HIF-1 és una proteïna dimèrica formada per dues subunitats, α i β . Les dues són membres de la família de factors de transcripció bàsic hèlix-*loop*-hèlix Per/Arnt/Sim (bHLH-PAS) (Wang et al., 1995). HIF-1 α dimeritza amb HIF-1 β via el domini bHLH i part del PAS, i un cop el complex està format s'uneix al DNA per aquest mateix domini bHLH (Jiang et al., 1996), activant la transcripció dels gens diana gràcies als dos dominis de transactivació localitzats a la zona C terminal de la subunitat HIF-1 α anomenats N-TAD i C-TAD (Pugh et al., 1997). Aquests dominis de transactivació permetran la interacció amb coactivadors.

Mentre HIF-1 β s'expressa de forma constitutiva, HIF-1 α , sota condicions de normòxia, és hidroxilada als residus 402 i 564 pels enzims específics proli hidroxilases (PHD). De manera que HIF-1 α serà reconeguda per la proteïna von Hippel-Lindau (VHL), una E3 lligasa, i es degradarà pel proteasoma (Maxwell et al., 2001). Paral·lelament, el factor inhibidor de HIF-1 (FIH) hidroxila l'asparragina 803 per tal d'inhibir l'activitat transcripcional (Peet and Linke, 2006). Com que les reaccions d'hidroxilació necessiten la presència d'oxigen, ferro i 2-oxoglutarat, les HIF-1 α hidroxilases no funcionen en condicions d'hipòxia. Conseqüentment, VHL no pot marcar HIF-1 α perquè sigui ubiquïtinitzada. Això permet una acumulació d'aquesta subunitat a la cèl·lula, la translocació al nucli i la dimerització amb HIF-1 β i seguidament la unió als elements de resposta a HIF (HRE) que es troben a la seqüència de DNA dels gens diana (Jaakkola et al., 2001).

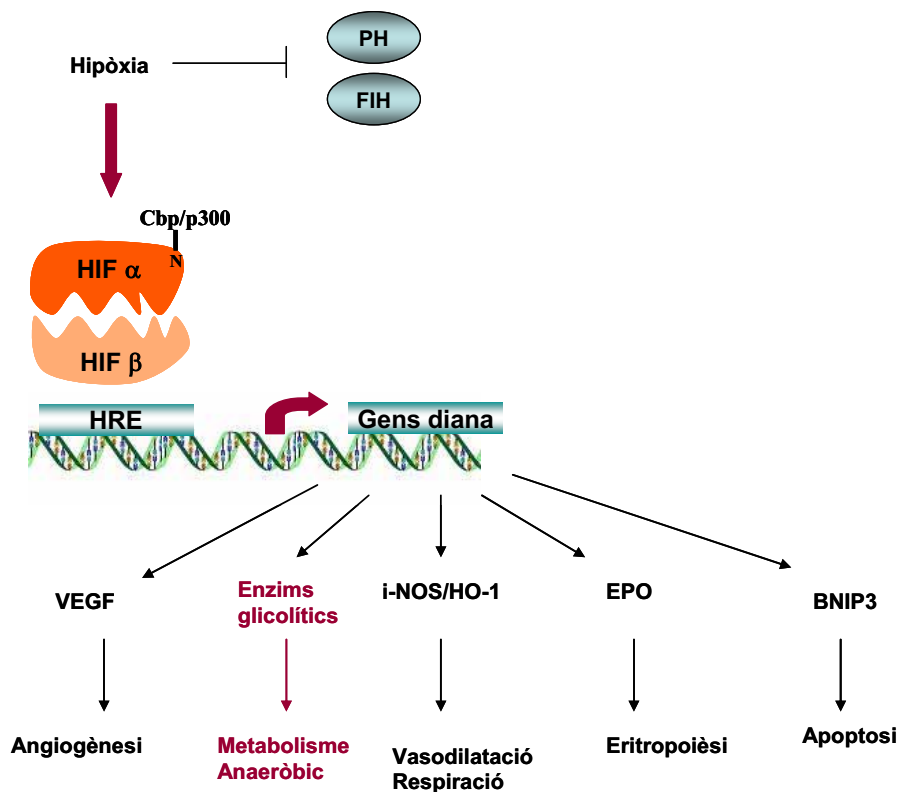


Figura 8. Gens diana de HIF-1. El factor de transcripció HIF-1 reconeix l'element de resposta a hipòxia (HRE) dels seus gens diana, regulant la seva transcripció. Aquests inclouen gens involucrats en l'angiogènesi, el metabolisme aeròbic, la vasodilatació i reparació, l'eritropoïesi i l'apoptosi.

De totes maneres, a banda de la hipòxia existeixen diferents mecanismes per a establir la subunitat HIF-1 α (Chan et al., 2002). Per exemple, els productes finals de la glucòlisi, com el lactat i el piruvat, s'acumulen com a conseqüència de

l'efecte Warburg i són capaços de promoure l'estabilitat de HIF-1 α (Lu et al., 2002) i per tant la seva acumulació i conseqüent unió amb HIF-1 β .

Els estudis inicials de Gregg Semenza i col·laboradors van confirmar que l'exposició a un 1% d'oxigen a cèl·lules humanes d'hepatoblastoma (Hep3B) activava la transcripció d'eritropoetina (EPO) (Goldberg et al., 1991) per acció del factor HIF-1. També, van definir la seqüència consens per aquest factor de transcripció com la 5'-TACGTGCT-3' (Wang and Semenza, 1993a; Wang and Semenza, 1993c). Seguidament, demostraren que la via de transducció de senyals després del tractament amb 1% d'oxigen, clorur de cobalt (CoCl₂) o deferoxamina (DFO) era la mateixa (Wang and Semenza, 1993b). Més tard, però, van comprovar que cèl·lules que no expressaven EPO també podien induir l'activitat de HIF-1 com a resposta a l'exposició a un 1% d'oxigen, com per exemple HeLa (cèl·lules de carcinoma cervical), cèl·lules d'ovari de hámster, C2C12 (mioblasts) i Rat-1 fibroblasts (Wang and Semenza, 1993c) o amb DFO i CoCl₂ en el cas de les HeLa i a les d'ovari de hámster (Wang and Semenza, 1993b). A més, aquesta inducció es podia bloquejar amb cicloheximida. Tot això els va fer pensar que HIF-1 podria transactivar altres gens a més a més de l'eritropoetina (Maxwell et al., 1993), així que van hipotetitzar la regulació transcripcional, per HIF-1, en situació d'hipòxia, de gens que codifiquen enzims glucolítics (Semenza et al., 1994). Concretament, van estudiar l'expressió de tres gens glucolítics: aldolasa A (ALDA), fosfoglicerat mutasa (PGK-1) i piruvat quinasa (PKM), i van corroborar la seva inducció per CoCl₂, DFO i 1% d'O₂ i la necessitat de la seva síntesi de nou (Semenza et al., 1994). Dos anys més tard van poder determinar que HIF-1 activava la transcripció de ALDA, enolasa-1 (ENO-1) i lactat deshidrogenasa A (LDHA) mitjançant la unió a dos HREs separats per 4-10 parells de bases (Fig. 9). De tots els seus estudis realitzats amb gens glucolítics van poder concloure que un HRE funcional consistia en dos llocs d'unió seguits pel factor de transcripció (Semenza et al., 1996).

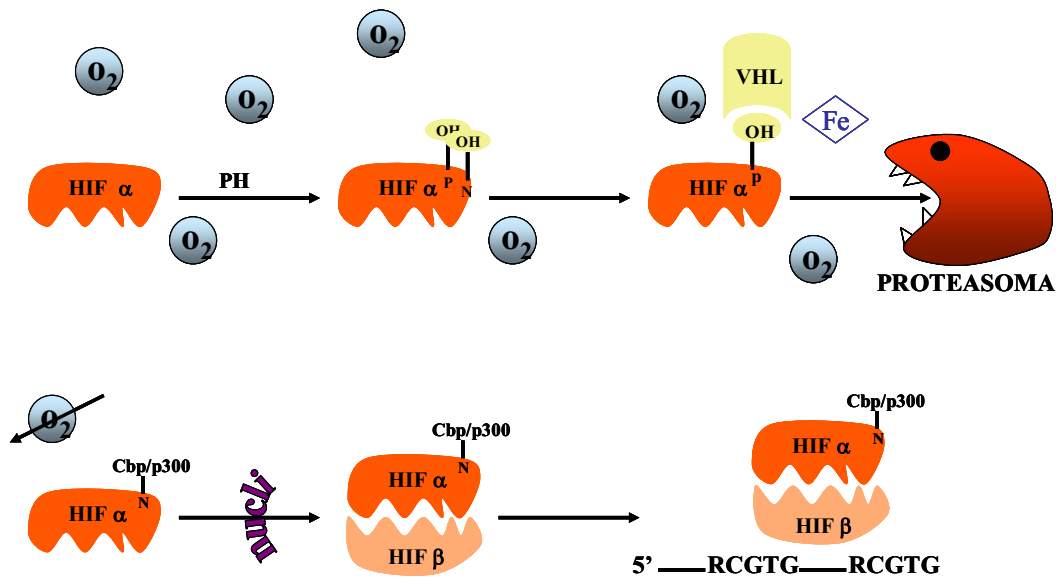


Figura 9. Unió de HIF-1 al seu HRE dels gens diana en condicions d'hipòxia. Quan l'oxigen està present al medi HIF-1 α és degradat via proteasoma, però en condicions d'hipòxia HIF-1 α s'acumula i es trasloca a nucli on s'hibrida amb la subunitat HIF-1 β i reconeix la seva seqüència consens dels gens diana que codifiquen per enzims glucolítics.

Una de les famílies d'enzims involucrats en el metabolisme de carbohidrats i activada per hipòxia és la dels isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2 (Minchenko et al., 2003). La concentració del mRNA del gen *pfkfb3* s'incrementa per hipòxia, CoCl_2 i quelants de ferro en cèl·lules Hep3B (hepatoma humà), MEF (fibroblast embrionics de ratolí) i en cèl·lules de carcinoma renal deficientes en VHL (Minchenko et al., 2002). Aquest increment també s'observa a diferents òrgans de ratolí tractat durant 6 hores en un atmosfera d'hipòxia (Minchenko et al., 2003). Així doncs, el mRNA del gen *pfkfb3* incrementa de forma significativa a pulmó, ronyó, fetge, cervell, cor i testicle en condicions d'hipòxia respecte el seu valor normal (Taula 4) (Minchenko et al., 2003). Aquest increment és dependent del factor de transcripció HIF funcional i independent de la cadena respiratòria mitocondrial (Minchenko et al., 2002).

	PFKFB3 NORMÒXIA	PFKFB3 HIPÒXIA
PULMÓ	●	↑
RONYÓ	●	↑
FETGE	●	↑
CERVELL	●	↑
COR	●	↑
TESTICLE	●	↑
MÚSCUL	●	↔
PÀNCREES	●	*
MELSA	●	*

Taula 4. Expressió del mRNA del gen *pfkfb3* a diferents òrgans de ratolí sota una atmosfera de normòxia o hipòxia. Els òrgans marcats amb * no han estat estudiats en situació d'hipòxia. La fletxa simple indica l'increment del mRNA en condicions d'hipòxia i la fletxa doble indica que en el múscul no es produeix increment.

1.11 El gen *pfkfb3*

El gen *pfkfb3* es localitza al cromosoma 10 humà a la regió p14-p15 (Fig. 10) (Manzano et al., 1998).

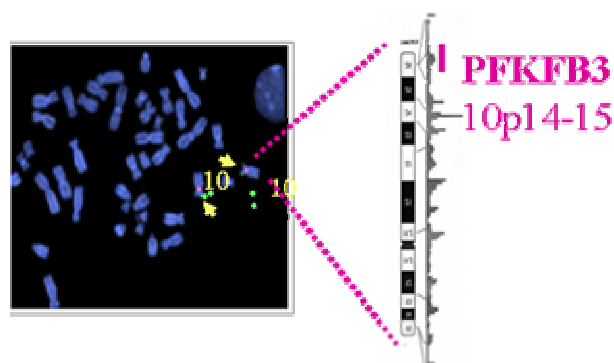


Figura 10. Localització del gen *pfkfb3* amb la tècnica d'hibridació *in situ*.

Està format per 19 exons (Navarro-Sabaté et al., 2001) els quals per *splicing* alternatiu transcriuen com a mínim per 6 mRNAs (Fig. 11) (Kessler and Eschrich, 2001). Només dues proteïnes s'han identificat d'aquests sis mRNAs, la induïble (iPFK-2), que conté 16 exons (Chesney et al., 1999) i la ubiqua (uPFK-2) que conté

15 exons i es diferencia de la induïble per *splicing* alternatiu de l'exó 16 (Manzano et al., 1998). El missatger d'aquests dos isoenzims únicament difereix en les 23 bases que corresponen a l'exó 16, això suposa una modificació de la pauta de lectura de l'isoenzim induïble introduint un codó de parada, de manera que les proteïnes resultants difereixen en el C-terminal, però tenen el mateix pes molecular (Fig. 11) (Navarro-Sabaté et al., 2001).

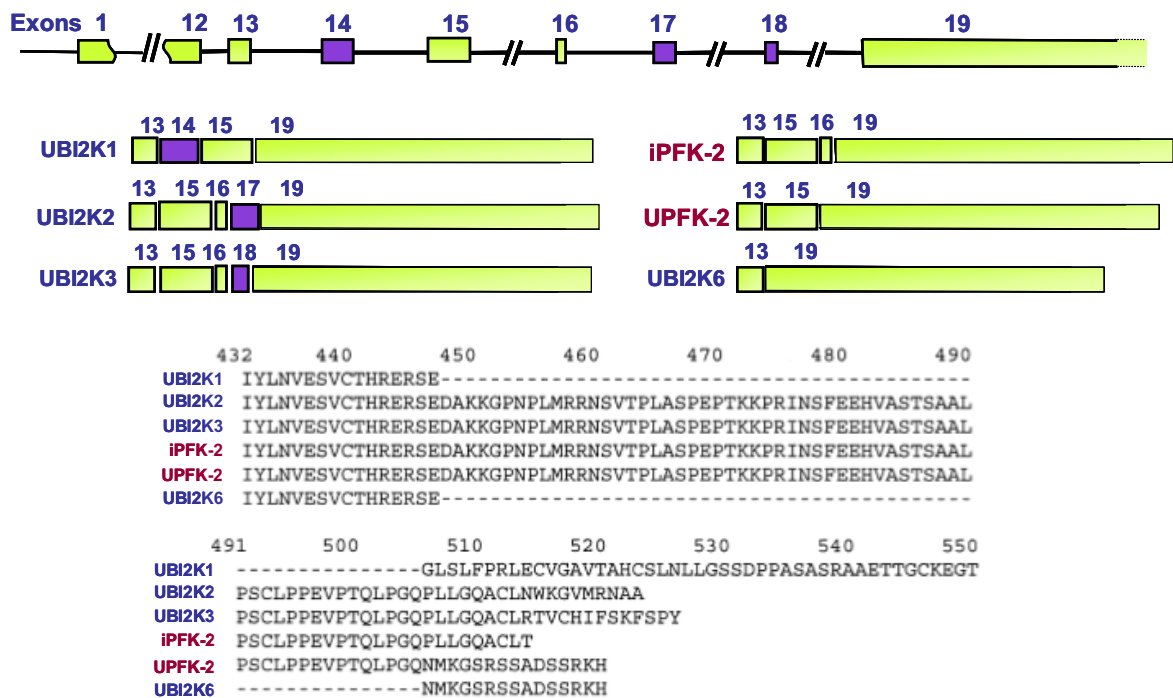


Figura 11. Estructura del gen *pfkfb-3*. Estructura cromosòmica del gen, dels mRNA transcrits per *splicing* alternatiu i la seqüència proteica.

El patró dels diferents *splicings* del gen *pfkfb3* es va estudiar en línies cel·lulars de tumor humà (com les HepG2, HCT15, MCF7, U937 i Jurkat) realitzant un anàlisi per RT-PCR. Només dues variants del gen *pfkfb3* estaven presents en les línies estudiades, la uPFK-2 (anomenada també placenta PFK-2 o PGR-1) i la UBI2K6 (Bando et al., 2005). El mateix anàlisi es va realitzar examinant l'expressió dels mRNA transcrits pel gen *pfkfb3* en mostres de carcinoma humà de còlon. Es va veure que l'expressió d'uPFK-2 era significativament més elevada en les mostres de carcinoma que en les mostres controls (Bando et al., 2005). Però aquest increment del producte del gen *pfkfb3* també s'ha observat en molts altres tumors humans per hibridació *in situ*, essent els nivells especialment elevats en les cèl·lules neoplàsiques de càncer de pròstata, de mama, d'ovari i de tiroides (Atsumi et al., 2002). Les cèl·lules neoplàsiques, de tots aquests tumors, expressen elevats nivells del producte

del gen *pfkfb3* de forma constitutiva quan es comparen amb les cèl·lules de teixits normals (Atsumi et al., 2002).

Bando i col·laboradors suggereixen que la fosforilació de la serina 461 (Ser 461) del producte del gen *pfkfb3* juga un paper important en l'activació de la glucòlisi d'aquests teixits tumorals (Fig. 6). La proteïna del gen *pfkfb3* està altament fosforilada en carcinomes de còlon i de pit quan es comparen amb les cèl·lules epitelials dels corresponents teixits normals (Bando et al., 2005). La Ser-461 és un lloc consens de fosforilació per AMPK (Marsin et al., 2002). L'AMPK és important pel desenvolupament de la tolerància a la depleció de nutrients a les cèl·lules canceroses (Marsin et al., 2002) i la seva activació en àrees anòxiques pot estimular la glucòlisi fosforilant la uPFK-2.

Veient la importància del gen *pfkfb3* en el control de la glucòlisi i consegüentment en el creixement i progressió tumoral, és interessant l'estudi de la caracterització i regulació del seu promotor.

L'equip de Ryuzo Sakakibara van localitzar el lloc d'inici de transcripció a la posició 329 respecte el codó d'inici de traducció. Aquesta regió de 329 nucleòtids és molt rica en G i C (Fig. 12), aproximadament un 75% de la seqüència conté aquestes bases (Fukasawa et al., 2000). Les zones 5'UTR (*Untranslated regions*) de més de 100 nucleòtids i amb un elevat contingut en G i C es localitzen en mRNAs que codifiquen per a factors de creixement, receptors de membrana i en alguns protooncògens (Fukasawa et al., 2000).

La caixa TATA es localitza entre les posicions -23/-32 (Fig. 12), prenent com a referència la posició +1 d'inici de transcripció (Fukasawa et al., 2000; Navarro-Sabaté et al., 2001). Aquesta caixa TATA (TTTAAA) identificada utilitzant la base de dades TFSEARCH és atípica però s'ha descrit en altres gens (Sugiura, 1999).

Al voltant de la caixa TATA s'identifiquen quatre regions amb la seqüència consens d'unió al factor de transcripció SP1 (aquestes sigles corresponen al nom en anglès *specific protein 1*): dos elements SP1 es troben a les posicions -191 i -187, i uns altres dos a les posicions -98 i -83 (Fig. 12). També es localitzen varies regions d'unió a AP2 (*Activator protein 2*) i diverses *E-boxes* (Navarro-Sabaté et al., 2001). SP1 pot activar la transcripció a través de diferents mecanismes, funcionant com un element basal de promotor o com un activador de transcripció, depenent del context del promotor (Fry and Farnham, 1999). La proteïna AP2 s'ha relacionat amb l'activació transcripcional com a resposta a dos vies de transducció de senyal, una que involucra els èsters de forbol i la proteïna quinasa activada per diacilglicerol C, i l'altre implica la

En aquest treball hem volgut centrar l'atenció en la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*. L'estudi dels factors de transcripció que s'uneixen al promotor del gen *pfkfb3* i la localització dels seus elements de resposta, ens aportarà coneixement en el control de la glucòlisi en sistemes proliferants, així com en el desenvolupament, creixement i progressió tumoral. La localització dels elements de resposta ens pot indicar possibles dianes terapèutiques per a la cura o pal·liació de diferents estats patològics.

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat aprofundir en els coneixements de la regulació del gen *pfkfb3* i, al mateix temps, en els mecanismes que activen la via glucolítica en sistemes proliferants. L'estudi s'ha dut a terme en dos tipus de sistemes: *in vitro*, amb l'ús de línies cel·lulars tumorals i *in vivo*, amb l'ús de ratolins diabètics.

Hem desglossat els objectius d'aquesta tesi en 4 blocs:

1. Clonatge i caracterització del promotor del gen *pfkfb3*.
2. Regulació transcripcional del gen *pfkfb3* pel factor induïble per hipòxia (HIF).
3. Regulació transcripcional del gen *pfkfb3* per l'anàleg de progesterona Organon 2058.
4. Expressió del gen *pfkfb3* en el fetge de ratolins diabètics.

RESULTATS

CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN *PFKFB3*

INTRODUCCIÓ

El descobriment de la Fru-2,6-P₂ i del seu paper com activador de l'enzim PFK-1 va induir l'estudi del paper d'aquest metabòlit en el control del flux glucolític, tant en sistemes proliferants com en cèl·lules tumorals. Diferents autors correlacionen la inducció de la proliferació cel·lular amb un augment de la concentració de la Fru-2,6-P₂ i de l'activitat PFK-2 (taula 2 de la introducció), responsable de la síntesi i degradació d'aquest metabòlit. Aquest increment es relaciona amb l'augment de la concentració de lactat com a conseqüència de l'activació de la glucòlisi.

Dels diferents isoenzims de la família PFK-2/FBPasa-2, s'ha demostrat que el producte del gen *pfkfb3* és el que té l'activitat quinasa més elevada i, per tant, pot generar altes concentracions de Fru-2,6-P₂ (Sakakibara et al., 1997). A més a més, el clonatge de la isoforma ubiqua, a partir d'una llibreria de cDNA de cervell fetal (Manzano et al., 1998) i, paral·lelament, a partir de cèl·lules derivades de càncer de mama (Hamilton et al., 1997), feia pensar en una implicació d'aquest isoenzim en sistemes proliferants. Aquesta idea es va veure confirmada per hibridació *in situ* del producte del gen *pfkfb3* en mostres de càncers humans (Atsumi et al., 2002) i per l'estudi del mRNA dels diferents *splicings* del gen *pfkfb3* en línies cel·lulars de tumors humans i en mostres de carcinoma humà de còlon (Bando et al., 2005).

Tots aquests precedents generaven l'interès per l'estudi de la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*. De manera que, per a dur a terme aquest estudi i, conseqüentment, per a aprofundir en el coneixement del control de la via glucolítica, era necessari el clonatge de diferents fragments de la seqüència 5' UTR del gen, a vectors d'expressió luciferasa.

Prèviament a l'inici d'aquesta tesi, el nostre grup havia realitzat la clonació dels primers 1198 nucleòtids de la regió 5' UTR al plasmidi d'expressió luciferasa pGL2basic (Navarro-Sabaté et al., 2001). Es varen basar en la seqüència del còsmid CRI-JC2015 (Zheng et al., 1994), que contenia el cDNA de la isoforma ubiqua, per a dissenyar els diferents oligonucleòtids que van permetre l'amplificació, per PCR, des de la posició +292 a la -1198 del gen *pfkfb3* (Fig. 1.1).

Clonatge i caracterització

F5'/-1198

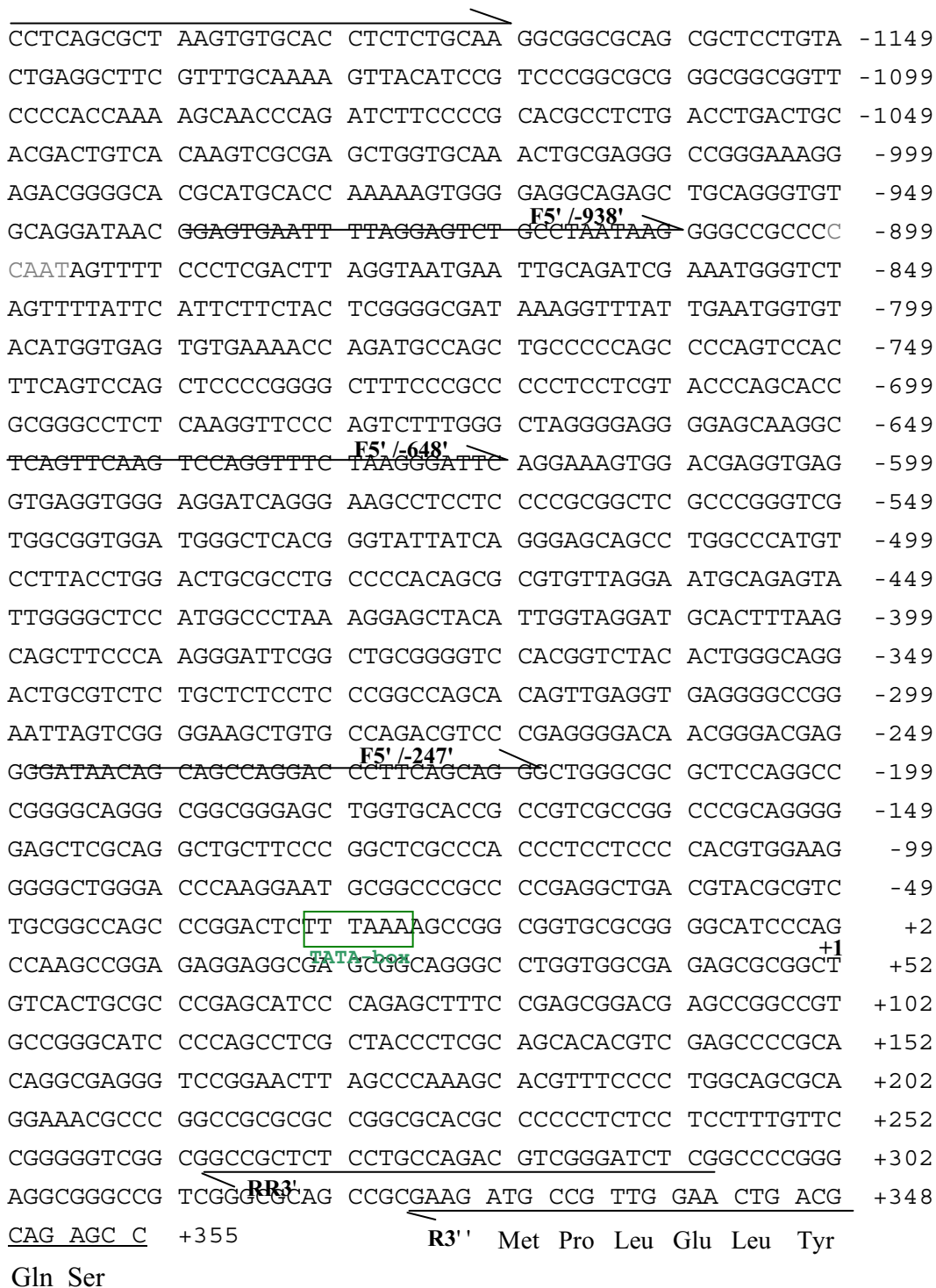


Figura 1.1. Seqüència 5' UTR del gen *pfkfb3* compresa entre la posició -1198 a la +355 . Es marquen els oligonucleòtids dissenyats per a l'amplificació de la zona compresa entre el nucleòtid -1198 al +292. La posició marcada com a +1 correspon a l'inici de transcripció.

Els fragments amplificats es van clonar al plasmidi d'expressió luciferasa pGL2basic i a partir d'aquest es van obtenir altres construccions amb fragments més curts de la regió 5' (Navarro-Sabaté et al., 2001). En resum, es partia de 6 construccions anomenades segons la posició d'inici de la seqüència de nucleòtids de

la regió 5' que contenen: *pfkfb3*/-1198, *pfkfb3*/-938, *pfkfb3*/-648, *pfkfb3*/-247, *pfkfb3*/-148 i *pfkfb3*/-55 (Fig. 1.2). A més a més, també es va obtenir una última construcció de la qual es va suprimir la seqüència de 148 nucleòtids on està localitzada la caixa TATA, *pfkfb3*/Sac100.

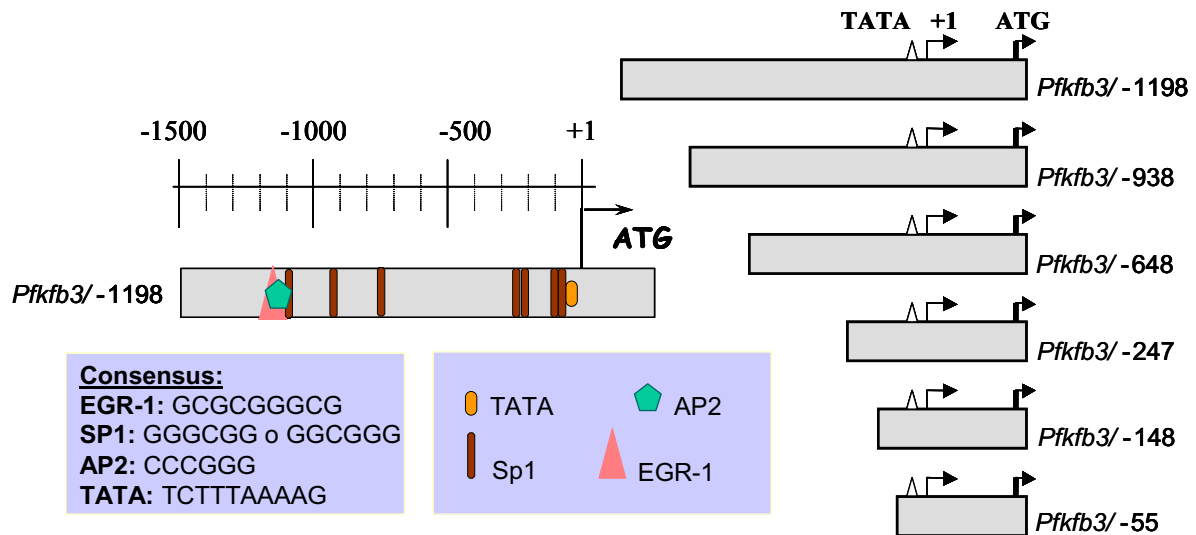


Figura 1.2. Esquema de la bateria de construccions obtingudes en la clonació de la regió 5' del gen *pfkfb3* humà. Estan representats els possibles elements de resposta per la proteïna SP1 (*specific protein 1*), la proteïna AP2 (*activator protein 2*), i EGR-1 (*early growth response 1*). També està representada la caixa TATA.

Un cop varen tenir clonats els diferents fragments de la regió 5' del gen, es van identificar possibles llocs d'unió pels factors de transcripció: SP1, AP2 i EGR-1 (Fig. 1.2) i es va posar de manifest l'existència de la caixa TATA (explicat a l'apartat 1.11 de la introducció).

L'estudi d'aquests primers 1198 nucleòtids va demostrar, analitzant l'activitat luciferasa, la implicació de factors com els èsters de forbol (PDB), l'AMPc (amb l'ús de Forskolin/IBMX) i el sèrum en la seva regulació transcripcional (Fukasawa et al., 2000; Navarro-Sabaté et al., 2001). També va permetre, per una banda, comprovar la hipòtesi de que els increments en l'activitat luciferasa podien ser deguts a la seqüència consens EGR-1 (*early growth factor 1*), identificada en el promotor del gen, i per altra, establir la unitat promotora bàsica (*minimal unit promoter*) dins de la regió de -148 nucleòtids respecte l'inici de transcripció.

Tot i tenir fins a 1198 nucleòtids de la regió 5' UTR del gen *pfkfb3*, clonats al plasmidi pGL2basic, el primer objectiu que ens vàrem plantejar, per començar la tesi, va ser l'amplificació de la regió d'estudi fins a 3566 nucleòtids. D'aquesta manera,

podríem assolir una àrea de promotor molt més gran i, per tant, tindríem més possibilitats a l'hora d'avaluar els factors de transcripció que regulen el gen *pfkfb3*.

1.1 Clonatge de la seqüència de -3566 nucleòtids de la regió 5' UTR del gen *pfkfb3* en el plasmidi d'expressió luciferasa pGL2basic

Per tal d'aprofundir en l'estudi de la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*, vam obtenir diferents fragments de la regió 5' UTR per a clonar-los al vector d'expressió de luciferasa pGL2basic. Per aquest propòsit, es van realitzar amplificacions per PCR del còsmid CRJ2015, el qual conté una extensa regió de més de 10 kb a l'extrem 5' del gen *pfkfb3*. La construcció de major grandària obtinguda incloïa 3566 nucleòtids de la regió 5' del gen i la vàrem anomenar *pfkfb3/-3566*. A partir d'aquesta i per delecions creixents se'n van obtenir dues més: de -2494 i -1408 nucleòtids respecte l'inici de transcripció i anomenades *pfkfb3/-2494* i *pfkfb3/-1408*, respectivament.

Per a l'obtenció del fragment de 3566 nucleòtids es van utilitzar els oligonucleòtids: *Fw3661* 5'-GAACGTTTTAACCTGGCTATGGCTGGCACA-3' (localitzat entre la posició -3661 a la -3632) i *revoligo* 5'-CGTCTCCTTTCCCGGCCCTCGCAGTTT-3' (localitzat entre la posició -994 a la -1020) (Fig. 1.3), d'aquesta manera s'amplificà per PCR un fragment de 2667 nucleòtids. A partir d'aquest fragment i per reamplificació amb els oligonucleòtids *BgIII-Fw* 5'-GGAGTTAGATctCATTGGCTGGCAC-3' (localitzat entre la posició -3572 a la -3548) i el mateix *revoligo*, s'aconseguí un fragment de 2578 nucleòtids amb la nova diana de restricció per l'enzim *BgIII* (Fig. 1.3).

```

CTAATGAGCA ACTTCTGATT GCTCCCAGAC TACCATGCTT GTCACCTCAC -3699
TCTCTCTGGG GCAGCGGGTA GGTCCCTAGCT TGGTTTGAAC GTTTTAACCT -3649
GGCTATGGCT GGCACAGGAT CACGGAAATG CGGTTGCTTG TGTTTGTGTG -3599
TACAGCAGCA TTTGGAAGCA CTGGTAGGAG TTAGATGACA TTGGCTGGCA -3549
CAGAAGTGTG GGAACAAAGG TGATCCTGGA GAAAAACCAC TCCACTGTCC -3499
TCTCAAGGCT GGACCGAGCT CAGTGAATTC AGCTATGTGA GCACCTCACC -3449
AGGCACTTGC TTTTTTTTTT TTCTTTTTTT GTGACAGGGT CTCACTCTGT -3399
CACCCCAGGC TGGAGTGCAA TGGTGCAATC ACAGCTCACT GCAACCTCTG -3349
CCTCCTGGGC TCAGGTGATC CTCCCACCTC AGTCTCCAAA ATAACCTGGGA -3299
CCACAGGTGC GAGCCACCAT GCCCAGCTAT TTTTAAATTT TTTTTTTTTT -3249
TTTTTTTTTT TTTGCAGAGA TGGGGTTTCA TGTTGCCAG GCTGGTCTCT -3199

```

TAACCTCTGA	GCTCAAGCAA	TCCGTCCGCC	TGAGCCACCC	AAAGTGCTGG	-3149
GATTACAGGT	GCGAACCCT	GCACTGGCCA	GGATCATTTT	CAATAATTGC	-3099
CCTGCTAATG	TCTCATTCTA	CTCACGGAAG	GTCCTTCTCT	GACCTTTCCT	-3049
TCCCAAACAG	CTCAATTGTT	CTAGGTGAGT	CTGAATCACA	GCCTGATCAG	-2999
CGGCTAAATT	AGGATTCCAC	TCAGCACCCCT	GGGGTTAGGG	TGGCCCTATA	-2949
ATGAGTCTCC	TAGGGAGCTA	GCTATCTGCG	TCCGTGTCAA	GCAGAAGGGA	-2899
AAAACAAAA	CAAACCAACA	AAAACCCCAG	CAAACCTCTGC	TCCTAATTGG	-2849
CTTTCTTCTT	TGATCTCTGA	CCTGGTTCCT	TGACTACTCT	AATCTCAACT	-2799
CCCTTTACTT	CTTCCCATAA	AGCAAGTGGG	GTTGACTAGG	TAGTCTTGAA	-2749
GTTTCCTTCT	ATCTTTCATA	GTTTCTAGGA	CCATGACCTA	GGAGAAATCA	-2699
TCAATCTGCG	CTAGCCTTGG	TGTTATTGTA	GCTGTAAAAG	AATCATCGTA	-2649
TTAGAGGAAC	ATTTACGTTA	TTGGGAGCGT	TTTCTGAAGG	GCCGCCTTTG	-2599
TGATACCCAG	GTTAGTAGGA	GGGAAGTTGG	CCAAGCCCTA	GTTGGACATT	-2549
TGGGGTGAAG	ATGGGGCATT	AGCAGAGCTA	GGGAATGAGT	TAGGAGGATG	-2499
TCCAAACTAG	TAAACTCGGA	ACCAGTAAAT	TACCAGAATA	CAGTTGCAGT	-2449
TGGGTTGTTT	ATAAGTGATT	TTGTAGTGAA	GCAGTTTCAT	CTCTCATGAG	-2399
GGCTCTACCC	TAACCTACCT	GGGGCTGTAA	AGGCTGCCAG	GAGTTCTAGC	-2349
TGGCCATTAA	AAAAACAAAA	ACAGGTGTGC	ATTCGTCCTT	GCTCCCACGC	-2299
ACTCCCAGTT	TGCACTTAGA	TGTAAGGAGC	GGGGCGGGGG	GGGCGGGGGG	-2249
TGGTGGTGGG	GCGGGGATTG	AGTTAACTTC	CTTTTGCCTG	CTGCAGAGCA	-2199
AGTGCAGGAG	GCGAATGGGG	GAAGAACATA	GTCTTCCCTC	TAGACTCGGA	-2149
ACGCGTTATT	GACAGACAGG	AAAAGTGCCC	GGTCTGCGAA	AGTTCAGCTG	-2099
GACCTCCGGG	ACATCAACTC	CCTGTGCCCT	AAGAGCTGAC	CGCTGTCAGA	-2049
TGCGTTATCT	AGGTCAAGAG	ATGAATGATG	TGCCGCTGCT	GGGGCAGACG	-1999
CCGTCTCTCT	GCTCTCCCTG	TGAGCTGAAA	CCAGCAGTGT	TTGCAAGCTT	-1949
GTAGGGAGTG	TGGAAGAAGG	CCCCCTGGTC	CGCTTGCCCTC	GCCTGTACGT	-1899
GTGCAAATC	GGTGGGCAAG	CAGCGGGCGC	GCAGGTGCAC	CGTCATTCCC	-1849
CAGGAACCGC	GGGCGCTCTT	TGCAGGGGTG	CAGCCGCTCT	CCCCGCGCGC	-1799
AGCCTACAGC	CCTCCCCGAC	CCCCGCGAAC	CCCAGGGCGG	GAACTCGTCC	-1749
CGGTGGCGCG	GGCGCTCGCT	GCCTGCTGTT	TCCCTCTTCG	GGTCAGCCCA	-1699
CTCTTATTTT	AGGAGTGGAG	TGGGACTCTC	CCCTGGGCGT	TTAGGGTGTC	-1649
GCCTCTGGCA	TGTGCTCCCA	CTGCAGAAAA	CAAGTCCAAA	TGCAACGCAT	-1599
CGGGTTTCTG	AACAGCCGCC	AGAGCGCGGA	AACCAGACCG	TCAGCAAAGC	-1549
TGTCGCGGGG	ACAGGGGCTC	TGAGAGGGCG	GCGCGGGGGG	CGGGGTGCCG	-1499
GAGTGGGGGT	CGAGGCGGGG	GGGGGAGTGG	GGGTCGAGGC	GTGGGGGAGG	-1449
GTGGCGGGGC	ACAGGCCAGG	TGGCCGATGT	TGCGCGTTCC	GGGGCCCCTC	-1399
GGCAGGCGGC	GGGTCGGGAG	GAGTGGAGGC	CCGGGTGGGG	CGGGCGCGCG	-1349

Clonatge i caracterització

```
GGGCGGGAGC AGCCCCGGTC GCCGCCTGGG CGCGGGCGCC CTCCTGTGG -1299
AGCATGCGGG ACGTGAGCGA CGTGTGGCAG CCTCTGCGCA GACTTTTCCG -1249
CCGCGGTGTA GTTTTACAGC AGCGCCGCCT TCCCTCCAAT CACAGCCCAG -1199
CCTCAGCGCT AAGTGTGCAC CTCTCTGCAA GGCGGCGCAG CGCTCCTGTA -1149
CTGAGGCTTC GTTTGCAAAA GTTACATCCG TCCCGGCGCG GCGGCGGTT -1099
CCCCACCAA AGCAACCCAG ATCTTCCCG CACGCCTCTG ACCTGACTGC -1049
ACGACTGTCA CAAGTCGCGA GCTGGTGCAA ACTGCGAGGG CCGGAAAGG - 999
AGACGGGGCA CGCATGCACC AAAAAGTGGG GAGGCAGAGC TGCAGGGTGT - 949
```

Bgl II (restriction site highlighted in green box, between AG and ATCT)

Rev oligo (arrow pointing to the reverse primer sequence GAGGCAGAGC)

Figura 1.3. Seqüència 5' UTR del gen *pfkfb3* compresa entre la posició -3748 i la -949. Es marquen els oligonucleòtids dissenyats per a la construcció del plasmidi *pfkfb3/-3566*.

Aquest fragment nou, de 2578 nucleòtids, es va clonar a un plasmidi TOPO-TA. Un cop clonat, s'obtingué el fragment desitjat de 2490 nucleòtids tallant, amb l'enzim de restricció *BglII*. Aquest nou fragment correspon a la zona entre els nucleòtids -3566 a -1076 (Fig. 1.3) del promotor *pfkfb3* i és el que finalment es va clonar a la construcció *pfkfb3/-1198*, al qual prèviament se li havia eliminat la zona de solapament de 122 nucleòtids (Fig. 1.4). Aquesta construcció final és la que contenia fins a la posició -3566 de la regió 5' del gen *pfkfb3*: *pfkfb3/-3566*. Els plasmidis *pfkfb3/-2494* i *pfkfb3/-1408*, es varen aconseguir per delecions de l'anterior, utilitzant les dianes *Xho* i *Apal* del *polylinker*, respectivament, i de les posicions -2494 per la construcció *pfkfb3/-2494* i -1408 per la *pfkfb3/-1408*. Totes les construccions es van seqüenciar per a comprovar la clonació correcta i per a confirmar que en el procés d'amplificació per PCR i posterior clonació no s'hagués produït cap mutació en la seqüència original (Fig. 1.4).

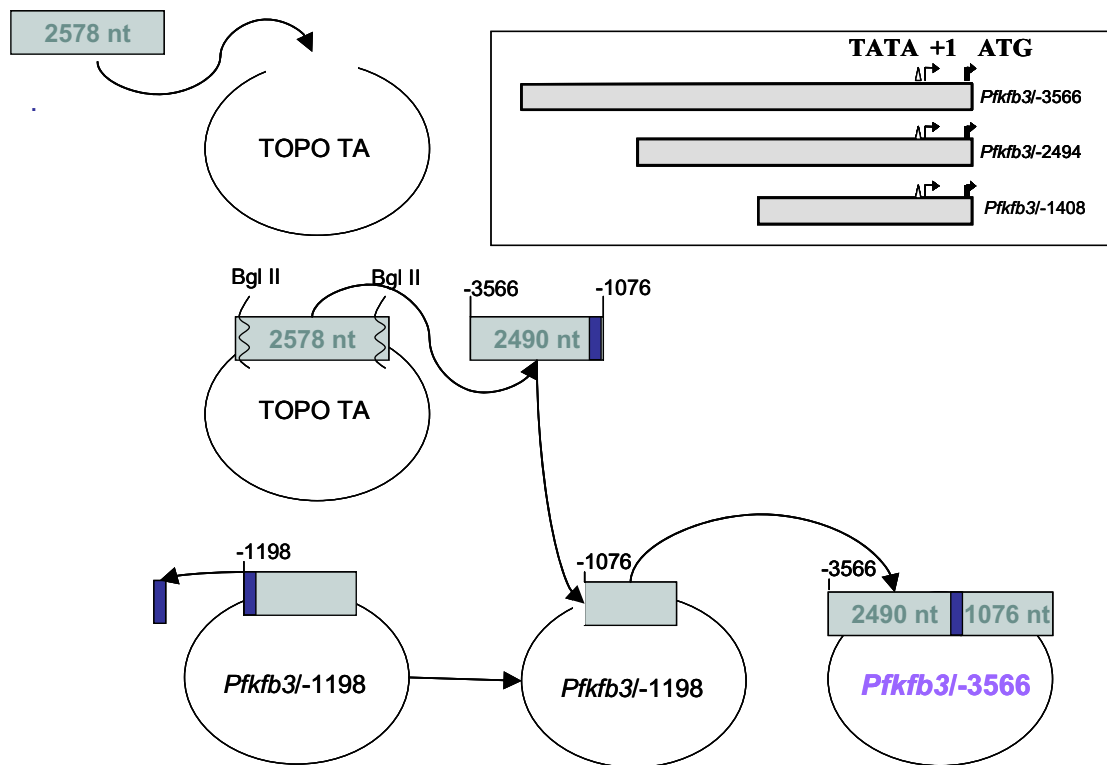


Figura 1.4. Esquema d'obtenció de la construcció *pfkfb3*-3566. Els rectangles corresponen als fragments de la regió 5' UTR, i el número de nucleòtids que forma cada fragment està escrit a l'interior. També es pot observar l'esquema dels tres fragments obtinguts.

1.2 Caracterització del fragment de 3566 nucleòtids de la regió 5' UTR del gen *pfkfb3*.

Paral·lelament al clonatge del nou fragment *pfkfb3*-3566 i la posterior deleció per obtenir els plasmidis *pfkfb3*-2494 i *pfkfb3*-1408, es va realitzar una anàlisi exhaustiva d'aquesta regió, compresa entre la posició -3566 fins l'ATG d'inici de traducció. Es van utilitzar tres tipus de programes d'anàlisi de promotor: el TransFac, l'Alibaba i el MatInspector. Tots ells van revelar la presència de possibles llocs d'unió per a factors de transcripció interessants per a la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*. De les possibles seqüències consens volem destacar les del receptor d'estrògens (ER), elements de resposta a hipòxia (HRE), element de resposta a factors de creixement (EGR), *specific protein 1* (SP-1), el factor de transcripció oncogènic (E2F-1), l'element de resposta a progesterona (PRE), la CCAAT/*enhancer binding protein* (c/EBP) i el *nuclear factor* κ B (NF κ B), entre d'altres (Fig. 1.5).

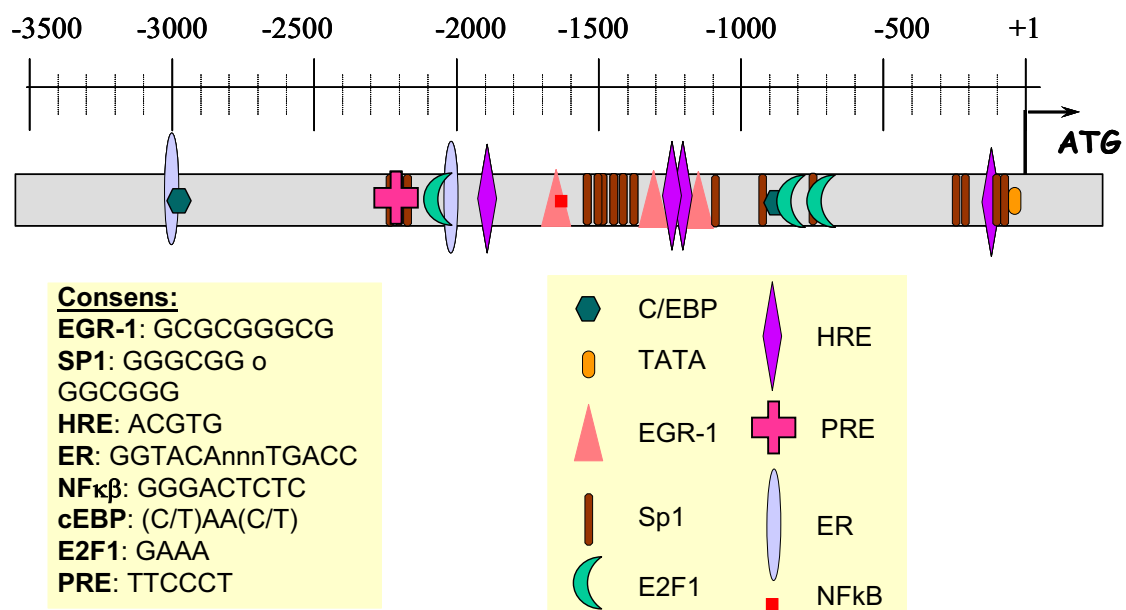


Figura 1.5. Possibles elements reguladors del promotor del gen *pfkfb3*.

DISCUSSIÓ

El gen *pfkfb3*, tal i com s'ha comentat anteriorment, té un paper essencial en la regulació de la via glucolítica. És per això que la primera part d'aquesta tesi s'ha centrat en l'obtenció d'una ampla zona d'estudi de la regió 5' UTR d'aquest gen.

Vam clonar la regió que engloba des del nucleòtid -3566 fins a l'ATG d'origen de la traducció a un vector d'expressió luciferasa pGL2basic (*pfkfb3/-3566*). A partir d'aquest, i per deleccions creixents, es van obtenir dos construccions més anomenades *pfkfb3/-2494* i *pfkfb3/-1408*. Aquestes construccions ens permetran aprofundir en l'estudi de la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*.

Fins aleshores, s'havia estudiat la resposta dels primers -1198 nucleòtids d'aquesta regió 5' del gen, demostrant una regulació de la transcripció per èsters de forbol (PDB), AMPc (amb l'ús de Forskolin/IBMX) i sèrum (Navarro-Sabaté et al., 2001).

Aprofundint en l'estudi de la regulació transcripcional del gen, hem localitzat, a la regió que conté els -3566 nucleòtids, possibles seqüències consens per a factors de transcripció (Fig. 1.5), utilitzant tres programes d'anàlisi de promotor. D'entre totes les possibles seqüències d'unió trobades, ens van interessar particularment els HRE, els PRE i E2F-1, donat que a la bibliografia prèvia, ja s'havien relacionat amb la regulació del gen *pfkfb3* o altres gens de la mateixa família. Així, per exemple, diferents autors han relacionat la hipòxia amb l'increment del mRNA del gen *pfkfb3* i dels altres membres de la família PFK-2/FBPasa-2 (Minchenko et al., 2002; Minchenko et al., 2003) a part d'estar també vinculada amb la sobreexpressió de molts enzims glucolítics (Semenza et al., 1996). La progesterona també s'ha relacionat amb l'augment d'expressió del producte del gen *pfkfb3* i aquest gen s'ha clonat a partir de cèl·lules de càncer de mama després del seu tractament amb un anàleg de progesterona (Hamilton et al., 1997). Per altra banda, també vam trobar interessants les possibles seqüències consens per al factor de transcripció E2F-1, ja que aquest s'ha relacionat amb la regulació transcripcional de la PFK-2 fetal via PI3K (Fernandez de Mattos et al., 2002).

En resum, el clonatge de la regió compresa entre el nucleòtid -3566 i l'ATG d'inici de traducció ens permetrà aportar noves dades sobre la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*.

EL PROMOTOR DEL GEN *PFKFB3* CONTÉ ELEMENTS DE RESPOSTA
PEL FACTOR INDUÏBLE PER HIPÒXIA 1 (HIF-1)

INTRODUCCIÓ

La conversió de les cèl·lules a un fenotip glucolític, per a satisfer les necessitats energètiques, és una característica de la resposta a hipòxia. Un dels mediadors de la resposta a les baixes pressions d'oxigen és el factor de transcripció induïble per hipòxia (HIF). Aquesta proteïna s'ha trobat activada en una llarga llista de càncers humans (Ke and Costa, 2006).

L'estabilització de la subunitat α del factor de transcripció HIF (prèviament descrit a l'apartat 1.10 de la introducció) condueix a la inducció de l'expressió de múltiples gens relacionats en l'adaptació a la hipòxia, com són els gens involucrats en la formació de vasos (angiogènesi), l'aport d'oxigen (eritropoesi) i a la producció d'energia (metabolisme anaeròbic). Molts dels gens diana per a HIF-1, relacionats amb el metabolisme, promouen l'adaptació cel·lular a la baixa accessibilitat d'oxigen, incrementant la captació de glucosa del medi i augmentant el flux glucolític. Així doncs, diferents gens que codifiquen per a enzims relacionats en la via glucolítica i en el transport de glucosa s'activen per baixa pressió d'oxigen: l'aldolasa A, la fosfoglicerat quinasa 1, la piruvat quinasa M, la lactat deshidrogenasa A, la fosfofructoquinasa L o el transportador de la glucosa 1 (Glut-1).

El flux glucolític està regulat a diferents nivells, entre d'altres el cicle fútil Fructosa-6-fosfat/Fructosa 1,6-bisfosfat, catalitzat per l'enzim 6-fosfofructoquinasa-1/Fructosa 1,6-bisfosfatasa, la regulació del qual depèn principalment del metabòlit Fru-2,6-P₂. Aquest factor és l'activador al·lostèric més potent de la quinasa i l'inhibidor de la bisfosfatasa. Sabent que l'encarregat de catalitzar la síntesis i degradació de la Fru-2,6-P₂ és l'enzim bifuncional 6-fosfofructoquinasa-2/Fructosa 2,6-bisfosfatasa i que una de les isoformes que codifica per aquest enzim s'ha trobat sobreexpressada en diferents càncers (*pfkfb3*), vam pensar que HIF podria estar regulant la transcripció del gen *pfkfb3*. És per aquest motiu que es va voler estudiar la resposta del gen *pfkfb3* al factor de transcripció induïble per hipòxia 1 (HIF-1).

Abans de començar aquesta tesi s'havia descrit l'augment d'expressió del gen *pfkfb3* en diverses línies cel·lulars transformades i de diferents orígens tissulars (Hamilton et al., 1997; Chesney et al., 1999; Navarro-Sabaté et al., 2001; Atsumi et al., 2002; Riera et al., 2002). Però donat que aquest gen s'havia identificat per primera vegada en cervell (Ventura et al., 1995), es va considerar d'especial interès iniciar aquest treball en cèl·lules de glioblastoma humà (T98G), on utilitzant la tècnica de *western blot* el nostre laboratori havia confirmat la presència de la proteïna uPFK-2.

2.1. Efectes de la hipòxia química i fisiològica en l'expressió de l'enzim uPFK-2 en cèl·lules de glioblastoma humà

Un cop corroborats els nivells basals d'expressió de la proteïna uPFK-2 en cèl·lules de glioblastoma humà, es van voler determinar els possibles efectes de la hipòxia sobre l'expressió del gen *pfkfb3* en aquets tipus cel·lular (T98G). Per dur a terme aquest estudi es van fer créixer les cèl·lules en condicions d'hipòxia fisiològica utilitzant un incubador amb un 2% d'oxigen. Alhora, també es van triar tres agents químics que mimetitzen els efectes de la hipòxia fisiològica per poder simular de manera rutinària els mateixos efectes sense dependre de l'incubador. Aquests són: el clorur de cobalt (CoCl_2 , un metall de transició), la deferoxamina (DFO, un quelant de ferro) i la dimetiloxalilglicina (DMOG, un inhibidor competitiu de l'oxoglutarat). Aquests agents basen el seu efecte en la inhibició de l'activitat de les HIF-1 proliil hidroxilases, les quals necessiten ferro i oxigen per a realitzar la seva activitat. Aquest enzim hidroxila les prolines 564 i 402 de la subunitat HIF-1 α , de manera que HIF-1 és reconegut i degradat pel proteosoma. Quan es bloqueja l'acció de les proliil hidroxilases, la subunitat α del factor de transcripció no es degrada i pot passar al nucli on s'uneix amb la subunitat β i és aleshores quan el complex HIF-1 es pot unir a la seqüència consens del promotor (Fig. 9 de la introducció).

A la figura 2.1 es mostra per anàlisi de *western blot* l'expressió de la proteïna uPFK-2 (codificada pel gen *pfkfb3*) i de la subunitat HIF-1 α del factor de transcripció, a diferents temps (3, 6 i 9 h) i enfront a diferents condicions (basal, hipòxia al 2% d'oxigen, DFO i CoCl_2). Els resultats verifiquen l'acumulació de la subunitat HIF-1 α al llarg del temps en condicions d'hipòxia al 2% o sota els tractaments amb DFO i CoCl_2 . No obstant, els valors més elevats de la proteïna s'obtenen amb la hipòxia fisiològica, arribant al màxim a les 6 hores. Paral·lelament, s'observa un augment significatiu de l'isoenzim uPFK-2 a les 3 i 6 hores de tractament amb hipòxia fisiològica o utilitzant els agents químics que la mimetitzen, respecte el seu valor basal (normòxia).

Aquests resultats ens indiquen que tant la hipòxia al 2% d'oxigen com els agents químics que la mimetitzen produeixen un increment dels nivells de uPFK-2 en les cèl·lules de glioblastoma T98G quan es comparen amb el seu valor basal (normòxia).

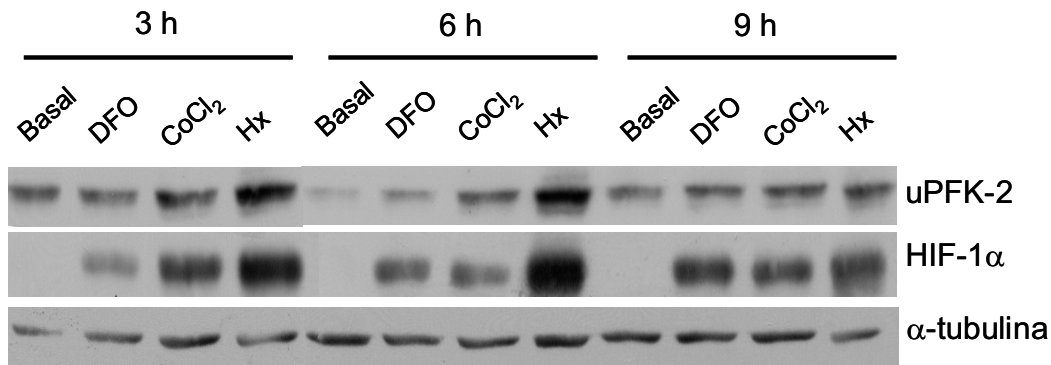


Figura 2.1. Expressió de HIF-1 α i uPFK-2 en cèl·lules de glioblastoma humà

Western blot contra uPFK-2 i HIF-1 α d'extractes totals de cèl·lules T98G mantingudes en normòxia (basal) o incubades durant 3, 6 i 9 h en presència de 200 μ M de DFO, 200 μ M de CoCl₂ o hipòxia al 2% d'oxigen (Hx). L'anticòs contra α -tubulina s'utilitza com a normalitzador de càrrega.

Un cop corroborada la relació entre l'acumulació de la subunitat HIF-1 α i l'increment d'expressió de la proteïna uPFK-2 en situacions d'hipòxia, es van iniciar els passos per a determinar si els augments d'expressió proteica provenien d'un augment de transcripció del gen *pfkfb3*. Per tal d'observar una correlació entre l'augment de proteïna amb el del seu mRNA es va realitzar una PCR en temps real. Es van utilitzar les mostres del RNA obtingut a partir de les cèl·lules cultivades en hipòxia al 2% d'oxigen a 0, 3 i 6 hores. L'experiment es va realitzar utilitzant una sonda contra el cDNA del gen *pfkfb3* humà i com a control positiu de resposta a hipòxia s'utilitzà una sonda contra el cDNA del gen Glut-1, un dels gens diana per a HIF-1 (Michiels et al., 2001). S'observa a la figura 2.2 que tant Glut-1 com *pfkfb3* tenen un patró molt semblant de resposta a hipòxia a nivell de mRNA. A les 3 hores d'exposició es detecta per ambdós mRNAs unes quatre vegades d'inducció respecte el basal (normòxia), i a les sis hores aquest augment ja és gairebé de 10 cops d'inducció.

Aquests resultats ens indiquen que la hipòxia regula el gen *pfkfb3*, incrementant els nivells de proteïna i de mRNA en aquest tipus cel·lular. L'augment de mRNA ja s'havia descrit prèviament a una línia cel·lular d'hepatoma humà, Hep-3B (Minchenko et al., 2002).

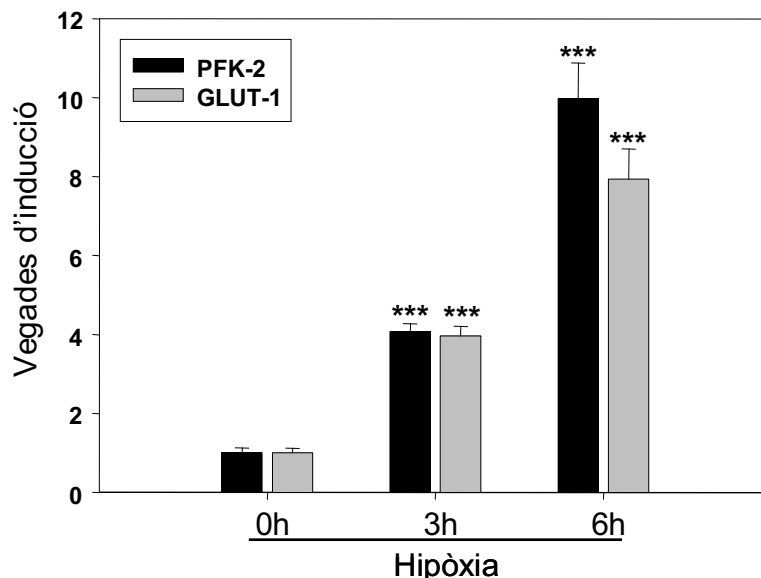


Figura 2.2. Expressió del mRNA del gen *pfkfb3* en cèl·lules de glioblastoma humà sota una atmosfera d'hipòxia. PCR a temps real per a analitzar el mRNA obtingut a partir de cèl·lules T98G després de 0, 3 i 6 h d'hipòxia al 2% d'O₂. Les barres negres representen les mostres del RNA de *pfkfb3*, les grises representen les mostres del RNA de GLUT-1. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció *versus* 0 h d'hipòxia (normòxia). Els resultats s'han normalitzat amb *TATA box binding protein* (n=3 per condició). Els resultats són estadísticament significatius (p<0.001) comparant el tractament amb hipòxia amb la condició de normòxia.

Seguidament, per tal de poder avaluar un efecte directe d'HIF sobre el gen *pfkfb3* endogen, es va estudiar l'expressió proteica d'aquest gen a les cèl·lules de glioblastoma humà U87, les quals la presència de la subunitat HIF-1 α s'inhibia per RNA d'interferència (siRNA).

Les cèl·lules U87, prèviament transfectades amb el siRNA d'HIF-1 α , o bé amb un vector buit com a condició control, es van posar sota tractament d'hipòxia real (2% oxigen) o en presència de dimetiloxalilglicina (DMOG) durant 16 hores. Passat el temps de tractament es van recollir els extractes cel·lulars totals i es va analitzar la presència d'uPFK-2 i d'HIF-1 α per *western blot*. Com es pot observar a la figura 2.3, les cèl·lules transfectades amb el RNA d'interferència, on no s'activa el factor HIF-1, no es detecta pràcticament expressió d'uPFK-2, independentment de l'ambient en el que s'han incubat: normòxia, hipòxia o sota tractament amb DMOG. Per altra banda, i tal com s'esperava pels resultats previs, els extractes obtinguts de les cèl·lules transfectades amb el vector buit expressen un increment significatiu d'uPFK-2 com a resposta a la hipòxia o al tractament amb dimetiloxalilglicina. Aquests resultats permeten confirmar la correlació entre la inhibició de l'expressió d'HIF-1 α i la disminució dels nivells d'uPFK-2.

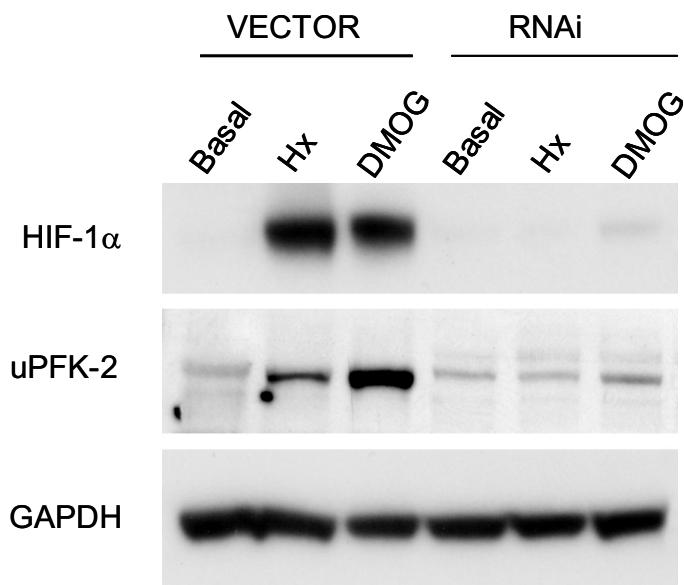


Figura 2.3. Western blot contra uPFK-2 (producte del gen *pfkfb3*) i HIF-1 α dels extractes cel·lulars de U-87. Les cèl·lules es van transfectar amb siRNA de HIF-1 α o amb el vector buit i seguidament es van exposar a 16 h d'hipòxia al 2% d'O₂ (Hx), a dimetiloxalilglicina (DMOG) o es van mantenir en normòxia (condició basal). Com a normalitzador de càrrega es va utilitzar l'anticòs contra gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH).

Tots els resultats mostrats fins al moment apunten a un paper important de la subunitat HIF-1 α en la regulació de l'expressió del gen *pfkfb3* endogen a cèl·lules de glioblastoma humà en situació d'hipòxia.

2.2. Resposta dels plasmidis d'expressió luciferasa, amb diferents deleccions de la regió 5' del promotor del gen *pfkfb3*, al tractament amb deferoxamina i clorur de cobalt

D'acord amb els resultats obtinguts, i per tal d'aprofundir en la possible regulació transcripcional del gen *pfkfb3* pel factor HIF-1, ens vam centrar en l'anàlisi de la regió promotora del gen. Els resultats obtinguts prèviament demostraven la presència de possibles elements de resposta a hipòxia (HRE) a la regió 5' UTR del gen (Fig. 2.4). Per a determinar si alguna d'aquestes possibles seqüències consens d'unió al factor HIF-1 identificades podia ser responsable de la regulació de la transcripció del gen sota condicions hipòxiques, es va dur a terme la transfecció transitòria de les construccions del promotor, abans descrites, a cèl·lules T98G.

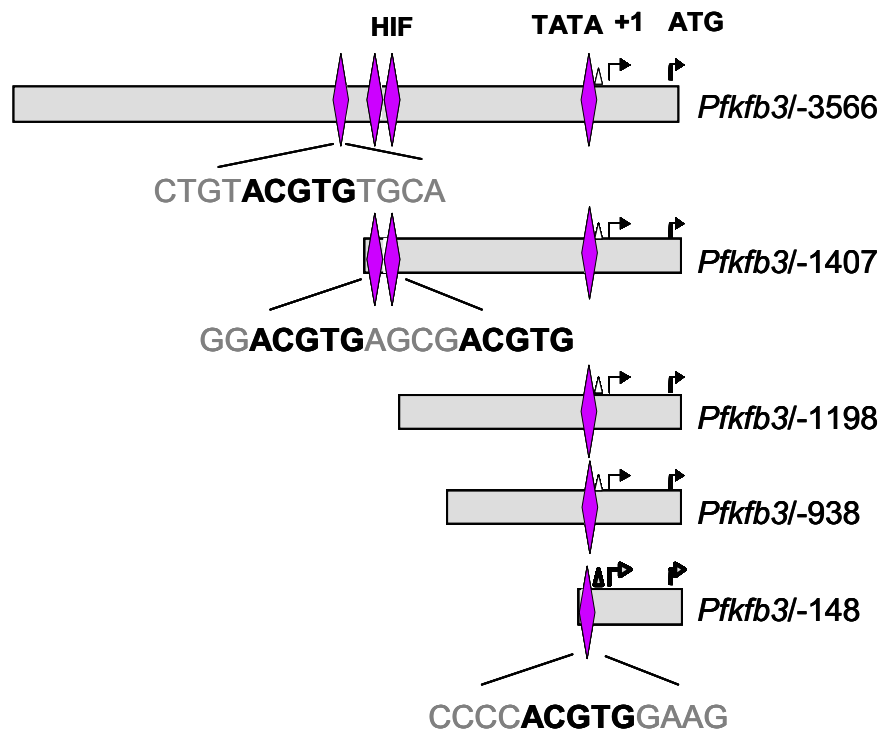


Figura 2.4. Esquema dels diferents fragments del promotor del gen *pfkfb3* clonats al vector d'expressió luciferasa pGL2basic. El diagrama mostra les diferents llargades de la regió 5' del promotor del gen humà *pfkfb3* i en rombes violetes els possibles llocs d'unió pel factor de transcripció HIF-1, les seqüències exactes estan descrites a sota.

De tots els mètodes de transfecció utilitzats, va ser el de la polietilenimina (PEI) el més eficient. Així doncs, després de la transfecció dels diferents plasmidis amb l'agent PEI, les cèl·lules es van sotmetre als tractaments de DFO o CoCl_2 .

Amb l'extracte de cèl·lules obtingut es mesurava l'activitat luciferasa. El resultat s'expressava com a vegades d'inducció d'activitat luciferasa del plasmidi d'estudi, sota tractament amb deferoxamina o clorur de cobalt, respecte al nivell basal d'activitat d'aquella mateixa construcció sense tractament (la qual assignàvem el valor 1). Per poder comparar entre diferents construccions es corregien els resultats d'eficiència de transfecció de cada constructe amb els corresponents valors de β -galactosidasa obtinguts.

Tal i com es mostra a la figura 2.5, l'activitat luciferasa de cèl·lules transfectades amb els plasmidis *pfkfb3/-3566* i *pfkfb3/-1407*, tractades amb els agents mimetitzants de la hipòxia, és significativament més elevada que la que s'obté amb els fragment més petits de 1407 nucleòtids (*pfkfb3/-1198*, *pfkfb3/-938* i *pfkfb3/-148*). Així doncs, es van quantificar 25 i 15 vegades d'inducció per les construccions *pfkfb3/-*

3566 i *pfkfb3/-1407*, respectivament, després del tractament amb DFO. Pel que fa al tractament amb clorur de cobalt, s'observaren 59 i 37 vegades d'inducció per les mateixes construccions, respectivament. No es van trobar diferències significatives d'activitat entre aquests dos fragments més llargs que, com indica la seva nomenclatura, contenen com a mínim 1407 nucleòtids de la regió 5'UTR.

Els resultats obtinguts per la resta de construccions són valors molt menors que els anteriors. El plasmidi *pfkfb3/-1198* dona 3 i 3.5 vegades d'inducció després del tractament amb deferoxamina o clorur de cobalt, respectivament. Finalment, després del tractament amb el quelant de ferro DFO, les construccions més petites, *pfkfb3/-938* i *pfkfb3/-148*, produeixen un 50 i 30% respectivament de l'activitat luciferasa observada per les seves condicions basals. Resultats molt semblants s'obtenen sota el tractament amb clorur de cobalt, donant així un 90% en el fragment de 938 parells de bases i 1.6 vegades d'inducció en el fragment més petit. Aquests tres últims fragments tampoc són significativament diferents entre ells.

Quan es van analitzar detingudament els resultats obtinguts amb els diferents fragments de promotor del gen *pfkfb3* es va deduir que les construccions *pfkfb3/-3566* i *pfkfb3/-1407* tenen en comú la regió entre els nucleòtids -1279 i -1288 (on es localitzen dos possibles elements de resposta a hipòxia, figura 2.4). Tenint en compte aquesta dada i que els resultats d'activitat luciferasa obtinguts pels fragments menors de 1407 nucleòtids (*pfkfb3/-1198*, *pfkfb3/-938* i *pfkfb3/-148*) no són estadísticament significatius quan es comparen amb el basal, podem descartar els primers 5' -1198 nucleòtids com a responsables de la resposta a hipòxia.

De manera semblant, es va poder determinar que la possible seqüència consens per a HIF localitzada al -1902 (només present al plasmidi *pfkfb3/-3566*) no seria rellevant per a la resposta fisiològica a la hipòxia ja que no es van detectar diferències estadísticament significatives entre els fragments *pfkfb3/-3566* i *pfkfb3/-1407* (Fig. 2.5).

En conjunt, aquests resultats focalitzaven l'atenció en la regió compresa entre els nucleòtids -1279 i -1288, que contienien, en tàndem, les dues seqüències consens d'unió al factor de transcripció HIF-1 i restaven importància a totes les altres possibles seqüències, tant la que es localitzava dins els primers 5' -1198 nucleòtids com la possible seqüència consens per a HIF localitzada al -1902.

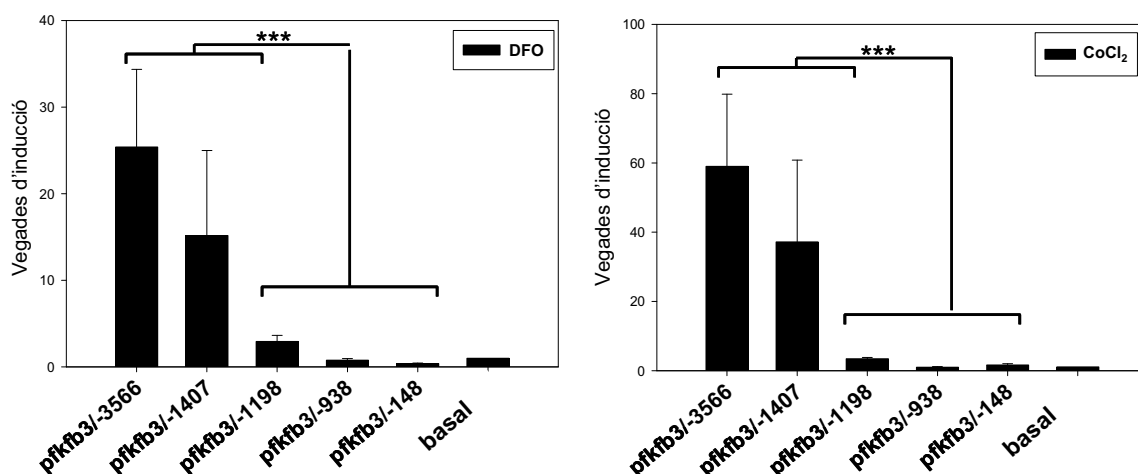


Figura 2.5. Activitat luciferasa de les diferents construccions de la regió 5' UTR del gen *pfkfb3* com a resposta a hipòxia química. Les diferents construccions i 60 ng del vector d'expressió β -galactosidasa es van transfectar de forma transitòria a cèl·lules T98G. Les cèl·lules es van incubar durant 16 hores amb DFO o CoCl_2 o mantingudes amb DMEM. Les transfeccions es van realitzar com a mínim per triplicat, i es van fer les mitjanes dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. A cada experiment, les dades individuals es van calcular com una mitjana de com a mínim triplicats i es van expressar com la relació de l'activitat luciferasa del promotor respecte l'obtinguda per la β -galactosidasa en el mateix lisat cel·lular. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció comparades amb la seva corresponent condició basal (normòxia). *Pfkfb3*/-3566 i *pfkfb3*/-1407 tenen una activitat luciferasa estadísticament significativa ($p < 0.001$) respecte les construccions més petites de 1407 nucleòtids. Cap diferència significativa es va observar entre les construccions *pfkfb3*/-3566 i *pfkfb3*/-1407, ni entre les *pfkfb3*/-1198, *pfkfb3*/-938 i *pfkfb3*/-148.

2.3. Efecte de la sobreexpressió exògena del factor induïble per hipòxia al promotor del gen *pfkfb3*

En un següent pas es va estudiar l'efecte de la sobreexpressió exògena del factor de transcripció HIF-1. Es volia observar si aquesta sobreexpressió podia produir uns efectes estimuladors, sobre el promotor, semblants a aquells observats sota el tractament d'hipòxia química. Per a poder dur a terme aquests experiments es van utilitzar dos plasmidis d'expressió, el pcDNA3-HA-HIF α (401 Δ 603) i el pcDNA3-HIF1 β . El primer, té tot el domini de degradació depenent d'oxigen deletat, de manera que les prolii-hidroxilases no porten a terme la seva hidroxilació i per tant la subunitat α no és reconeguda pel proteasoma per a ésser degradada. Així, s'obté una expressió constitutiva de la subunitat α i, creiem, que s'aconsegueixen assolir nivells de factor de transcripció actiu iguals als que s'assolirien en condicions d'hipòxia.

Es van cotransfectar les cèl·lules T98G amb la construcció *pfkfb3*/-3566, ja que tal com s'ha vist en resultats anteriors conté les dos possibles seqüències consens per

al factor HIF-1, i amb les construccions pcDNA3-HA-HIF α (401 Δ 603) i/o pcDNA3-HIF1 β i 60 ng de β -galactosidasa com a control de transfecció (Fig. 2.6). Les cèl·lules cotransfectades es van tractar amb CoCl₂ en les condicions que vàrem considerar oportunes. Per una banda, volíem comparar els resultats obtinguts amb un control positiu d'hipòxia i, per altra, volíem observar si la cotransfecció del factor HIF-1 α constitutivament actiu amb HIF-1 β regulava el promotor d'una manera semblant a la transfecció d'HIF-1 β i sota tractament amb CoCl₂ (el qual ens estaria activant la subunitat HIF-1 α endògena).

A la figura 2.6 es mostra les vegades d'inducció d'activitat luciferasa obtingudes al transfectar la construcció *pfkfb3*/-3566, comparant-la amb les obtingudes en diferents condicions d'activació del factor de transcripció HIF, bé per cotransfecció de la subunitat α constitutivament activa o bé per simulació d'hipòxia amb CoCl₂. Les diferents combinacions demostren que l'activació del promotor *pfkfb3* és major que la basal només pel fet de cotransfectar-li la subunitat β (7 cops d'inducció). Quan aquesta mateixa cotransfecció s'exposa a tractament amb clorur de cobalt, les vegades d'inducció incrementen a gairebé 30. Però els valors més elevats s'obtenen al cotransfectar la construcció *pfkfb3*/-3566 amb la construcció que conté la subunitat α constitutivament activa o amb la cotransfecció del factor HIF-1 complet (α i β). No obstant, no s'observa un sinergisme quan es cotransfecten les dues subunitats del factor de transcripció. Això ens fa pensar que els nivells endògens d'expressió de HIF-1 β són ja suficients per unir-se a la subunitat HIF-1 α , constitutivament activa, transfectada i junts provocar l'estimulació del promotor *pfkfb3*.

Podem observar com els resultats obtinguts amb la transfecció de la construcció de HIF-1 α (31 vegades d'inducció) són més elevats que els que s'obtenen activant la subunitat de forma endògena amb CoCl₂ (13 cops d'inducció), i pràcticament iguals als valors que s'obtenen amb la transfecció de la subunitat β sota tractament amb CoCl₂.

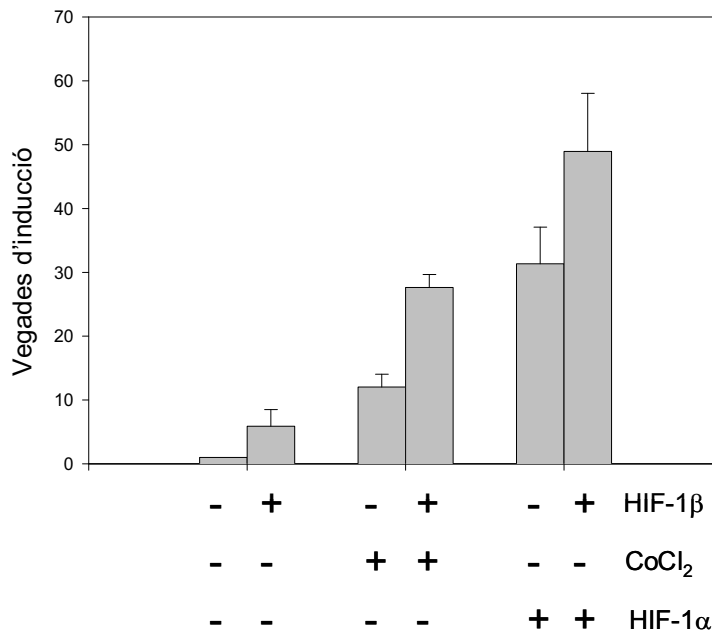


Figura 2.6. Efectes de la sobreexpressió de HIF-1α exogen al fragment de promotor *pfkfb3*/-3566. Les cèl·lules T98G es van transfectar de forma transitòria amb la construcció *pfkfb3*/-3566. Quan s'indica, les cèl·lules es van co-transfectar amb 330 ng de pCDNA3-pARNT (HIF-1β) o amb la mateixa quantitat de p(HA)HIF-1α(401Δ603) (HIF-1α). La quantitat final de DNA transfectat es va mantenir sempre a 1 μg afegint vector buit en cas necessari. Es va canviar el medi quatre hores després de la transfecció, les cèl·lules es van cultivar amb medi lliure de sèrum i amb la presència o absència de 200 μM de CoCl₂ durant 16 h. Les transfeccions es van realitzar com a mínim per triplicat i es va realitzar la mitjana dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. A cada experiment, les dades individuals es van calcular com una mitjana de com a mínim triplicats i es van expressar com la relació de l'activitat luciferasa del promotor respecte l'obtinguda per la β-galactosidasa en el mateix lisat cel·lular. Els resultats són la mitjana de com a mínim tres experiments i s'expressen com a vegades d'inducció comparades amb la condició basal (normòxia) del vector *pfkfb3*/-3566.

Amb aquests resultats podem concloure que, tant l'expressió endògena com exògena del factor de transcripció HIF-1, activa la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*.

2.4 Buscant l'element de resposta a hipòxia funcional al promotor del gen *pfkfb3*

Tenint en compte tots els resultats anteriors, es va delimitar com a zona d'estudi per a la seqüència consens de HIF al promotor del gen *pfkfb3*, la regió compresa entre els nucleòtids -1269 al -1297 (5'GCATGCGGG**ACGTGACGCACGTG**TGGCAG 3'). Tal i com ja s'ha mencionat anteriorment, aquesta regió conté dos possibles seqüències consecutives de resposta a hipòxia (marcades amb negreta). Per aquest motiu, es va dissenyar un

oligonucleòtid que contenia aquesta regió de 29 nucleòtids i es va clonar en un plasmidi d'expressió luciferasa que conté la unitat mínima promotora del gen c-fos. A aquesta construcció se l'anomenà 29Wt-cfos. Paral·lelament es va dissenyar un oligonucleòtid amb els mateixos 29 nucleòtids però al qual s'havia incorporat dues mutacions just a la possible seqüència d'unió a HIF (5'GCATGCGGGAAATTGACGCAAATTGTGGCAG 3'). A aquesta construcció se l'anomenà 29Mut-cfos

Es varen transfectar cèl·lules T98G amb aquestes construccions en presència o absència del tractament amb hipòxia química (DFO i CoCl_2) (Fig. 2.7) i es va mesurar l'activitat luciferasa. Com a normalitzador de l'eficiència de transfecció es va utilitzar la β -galactosidasa.

Tal i com es mostra a la figura 2.7, tot i que els dos vectors tinguin una expressió molt semblant en condicions basals (deguda a l'expressió de luciferasa produïda per la unitat mínima promotora del gen c-fos), el plasmidi 29Wt-cfos mostra una inducció de 294 i 330 d'activitat luciferasa sota el tractament de DFO i CoCl_2 , respectivament, respecte el basal. Mentre que, tal i com s'esperava, la construcció que conté la seqüència d'unió a HIF mutada pràcticament no respon a DFO i CoCl_2 . Aquest resultat ens indica la importància d'aquesta zona per a la unió al factor HIF-1 i la conseqüent resposta a hipòxia i més concretament de la seqüència de nucleòtids -ACGTG-

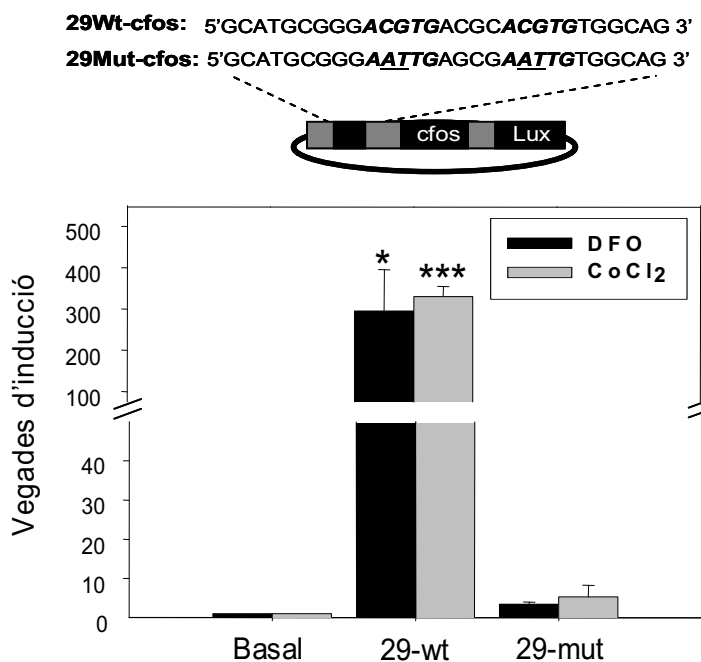


Figura 2.7. Activitat luciferasa de la regió del promotor del gen *pfkfb3* que conté dos seqüències consens per HRE. Esquema de la regió de 29-nt salvatge i mutada (nucleòtids subratllats) subclonada al vector pGL2basic que conté la unitat mínima promotora del gen c-fos. Les cèl·lules T98G es van incubar amb medi sol o suplementat amb 200 μM de CoCl_2 o 200 μM de DFO. Les transfeccions es van realitzar com a mínim per triplicat, i es va realitzar la mitjana dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. Les dades individuals es van calcular com una mitjana de com a mínim triplicats i es van expressar com la relació de l'activitat luciferasa del promotor respecte l'obtinguda per la β -galactosidasa en el mateix lisat cel·lular. Els resultats s'expressen en vegades d'inducció respecte la condició basal.

Per a corroborar que els elements de resposta a hipòxia estan localitzats a les posicions -1279 i -1288, respecte l'inici de transcripció del gen *pfkfb3*, es va realitzar una altra aproximació, aprofitant que es disposava d'una línia de fibroblasts embrionaris de ratolí (mEF) deficient pel gen HIF-1 α .

Així, es van cultivar i transfectar amb les construccions 29Wt-cfos i 29Mut-cfos, tant la línia cel·lular salvatge (mEF/HIF(+)) com la línia mEF deficient en el gen HIF-1 α (mEF/HIF(-)). Després de la transfecció es va dur a terme el tractament amb CoCl₂ i 16 hores després es va observar l'activitat luciferasa. Els resultats obtinguts d'aquest experiment es mostren a la figura 2.8. Tal i com es podia preveure, després de transfectar les dues construccions a les cèl·lules mEF salvatges, el plasmidi 29Wt-cfos responia al tractament d'hipòxia química, mostrant 16 vegades d'inducció respecte a la condició basal, mentre que la construcció mutada 29Mut-cfos era incapaç de donar valors de luciferasa per sobre dels nivells basals. Per contra, cap de les dues construccions mostrava activitat luciferasa per sobre l'expressió basal en ésser transfectades en la línia cel·lular mEF/HIF(-), la qual cosa corroborava la necessitat de la presència del factor de transcripció HIF per a produir una inducció del promotor del gen *pfkfb3*.

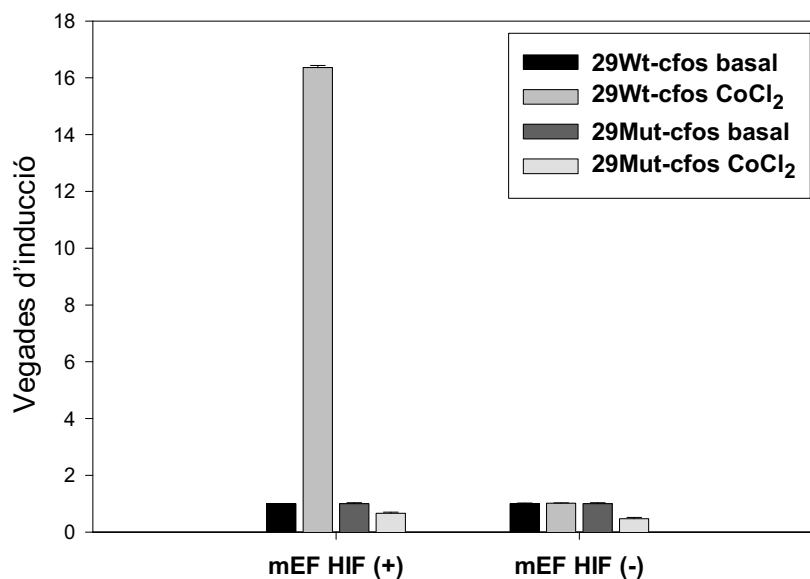


Figura 2.8. Activitat luciferasa de la regió del promotor del gen *pfkfb3* que conté dos seqüències consens per HRE a cèl·lules HIF-1 α negatives. Les construccions 29Wt-cfos i 29Mut-cfos es van transfectar de forma transitòria a les cèl·lules mEF. L'activitat luciferasa d'ambdós tipus cel·lulars es va mesurar després d'una incubació amb 200 μ M de CoCl₂ o amb DMEM sol durant 16 h. Les transfeccions es van realitzar com a mínim per triplicat i es va realitzar la mitjana dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. A cada experiment, les dades individuals es van calcular com una mitjana de com a mínim triplicats i es van expressar com la relació de l'activitat luciferasa del promotor respecte l'obtinguda per la β -galactosidasa en el mateix lisat cel·lular. Els resultats s'expressen en vegades d'inducció respecte la condició basal.

A més a més, utilitzant aquestes mateixes línies cel·lulars es va realitzar l'estudi de l'activitat transcripcional del promotor del gen *pfkfb3* amb el plasmidi *pfkfb3/-3566*.

Es va transfectar de forma transitòria el vector *pfkfb3/-3566* a ambdues línies cel·lulars: mEF/HIF(-) i a les mEF/HIF(+) i les cèl·lules es van exposar a un ambient d'hipòxia o es van mantenir en un ambient de normòxia. L'activitat luciferasa mesurada 16 hores més tard va indicar un increment substancial a les cèl·lules mEF/HIF(+), mentre que no es va observar cap increment significatiu, sota les mateixes condicions d'hipòxia, per a les cèl·lules mEF/HIF(-) (Fig. 2.9).

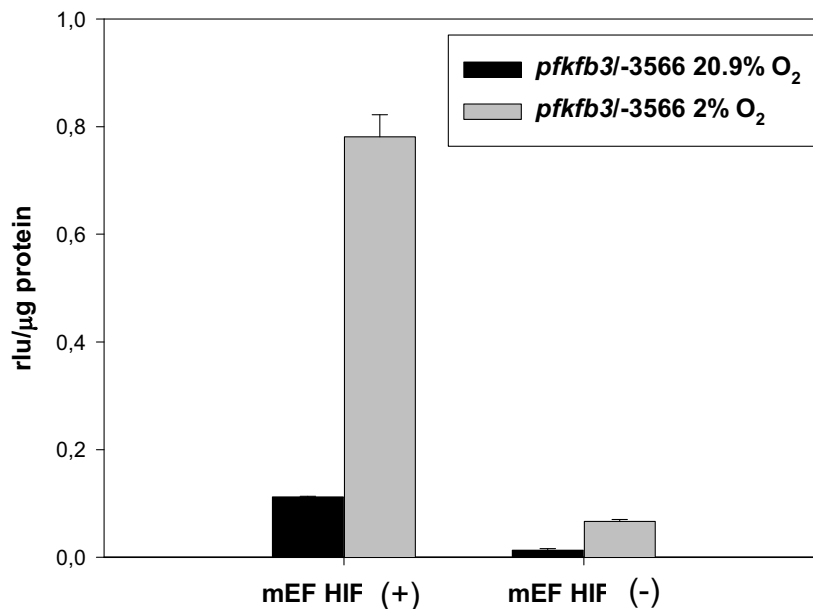


Figura 2.9. Inducció del promotor *pfkfb3* en cèl·lules embrionàries de fibroblasts de ratolí (mEF) wild type (HIF (+) o delecionades (HIF(-)). El vector d'expressió *pfkfb3/-3566* es va transfectar de forma transitòria a les cèl·lules HIF (+) i HIF (-). Després d'una incubació de 16 h amb normòxia o hipòxia al 2% d'O₂ es va mesurar l'activitat luciferasa. Aquesta activitat es va expressar en rlu (unitats relatives de luciferasa) /μg de proteïna.

El conjunt d'aquests darrers resultats apunten la necessitat del factor de transcripció HIF-1 per a la resposta a hipòxia del gen *pfkfb3* i que possiblement aquesta estarà regulada per la presència dels dos HRE consecutius a les posicions -1279 i -1288.

2.5. HIF-1 s'uneix als elements de resposta a hipòxia localitzats a les posicions -1279 i -1288 del promotor del gen *pfkfb3*

Fins ara havíem demostrat la implicació de HIF-1 en la regulació del gen *pfkfb3* sota un ambient d'hipòxia, i delimitat la possible regió de promotor que podia respondre al factor de transcripció. Ens faltava verificar la unió directa de HIF-1 als dos HRE consecutius del promotor del gen *pfkfb3* i per poder-ho fer es varen emprar dues tècniques. En primer lloc, es va realitzar un assaig de retardament en gel (EMSA) utilitzant els mateixos oligonucleòtids 29Wt i 29Mut descrits a l'apartat anterior. En segon lloc, es va realitzar un experiment d'oligoprecipitació, utilitzant els mateixos dos oligonucleòtids però prèviament biotinilats.

L'assaig de retardament en gel es va portar a terme amb extractes totals de cèl·lules T98G que sobreexpressaven les subunitats HIF-1 α i HIF-1 β donat que s'havien transfectat de manera transitòria amb els vectors HIF α (401 Δ 603) i HIF-1 β . Tal i com es veu a la figura 2.10. apareix un doblet de bandes característic quan s'utilitza la sonda salvatge corresponent a la seqüència exacte del promotor del gen *pfkfb3* (línia 2), mentre que no s'observa cap banda quan la sonda marcada amb 32 P que s'utilitza és la que té les seqüències consens mutades (línia 4) o en condicions de normòxia (línia 1).

Aquests resultats, suggereixen que hi ha una unió DNA-proteïna específica en situacions d'hipòxia. Es va poder demostrar que la proteïna d'aquesta unió és HIF-1 perquè, tal i com es mostra a la línia 3 de la figura, després d'incubar els extractes totals amb anticòs contra la subunitat HIF-1 β és veu una banda en retardament. Indicant, així, la unió del complex DNA-proteïna a l'anticòs.

Amb aquests resultats podem afirmar que HIF-1 s'uneix a la seqüència del promotor del gen *pfkfb3*: 5'GCATGCGGG**ACGTG**ACGC**ACGTG**TGGCAG 3'.

Com a control positiu de l'assaig de retardament en gel es van utilitzar els mateixos extractes cel·lulars amb HIF-1 sobreexpressat, per tal de veure que una seqüència HRE ja descrita, seguia el mateix patró que la del promotor del gen *pfkfb3*, en absència i presència d'anticòs. Es va utilitzar com a sonda marcada la seqüència 5' GCCCT**ACGTG**CTGTCTCA 3' del promotor del gen EPO-1. Tal i com s'esperava, es va detectar un doblet (línia 5) semblant a l'obtingut amb l'altra sonda i el complex DNA-proteïna es retarda amb l'utilització de l'anticòs HIF-1 β .

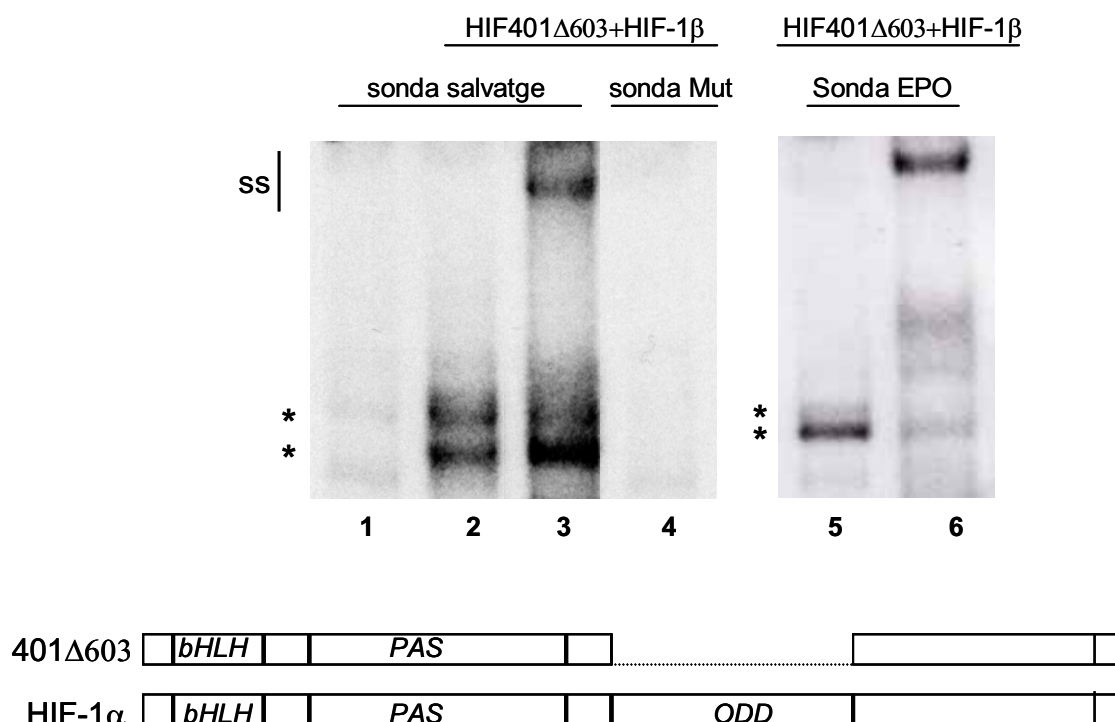


Figura 2.10. Especificitat de la unió d'HIF-1 a les seqüències HRE del promotor del gen humà *pfkfb3*. Les cèl·lules T98G es van transfectar amb p(HA)HIF-1α(401Δ603) i pARNT (HIF-1β) (línies 2-6) o es van mantenir amb DMEM suplementat amb 10% de sèrum (línia 1). Quatres hores després de la transfecció les cèl·lules es van mantenir 48 h amb DMEM 10% sèrum. Els extractes cel·lulars totals es van preparar i analitzar per l'assaig de retardament en gel utilitzant una sonda marcada amb ³²P les possibles seqüències consens per a HRE del promotor del gen *pfkfb3* (5'GCATGCGGG**ACGTG**ACGC**ACGTG**TGGCAG 3'; -1269/-1297). L'assaig de *supershift* es va realitzar amb l'anticòs anti-HIF-1β (línies 3 i 6). L'oligonucleòtid 29Mut es va utilitzar com a sonda a la línia 4 (5'GCATGCGGG**AATTG**ACGC**AATTG**TGGCAG 3'). La sonda EPO-1 es va utilitzar a les línies 5 i 6 (5' GCCCT**ACGTG**GCTGTCTCA 3').

Com a segona aproximació es va realitzar un assaig d'oligoprecipitació on es van utilitzar extractes totals de cèl·lules T98G després de 6 hores de normòxia, hipòxia o tractament amb CoCl₂. Com es pot observar al *western blot* (Fig. 2.11), els extractes totals de cèl·lules tractades amb hipòxia fisiològica i química contenen HIF-1α. Aquesta subunitat també es detecta en els extractes prèviament passats per la columna d'estreptavidina-sefarosa. Això ens demostra que la sonda biotinitalada de 29 nucleòtids (corresponent al HRE i el qual s'uneix a la columna) forma un complex amb el factor de transcripció HIF-1. De manera que l'eluït de la columna està format per l'HRE del promotor del gen *pfkfb3* biotinitalat i pel factor de transcripció que reconeix la seva seqüència consens. Per altra banda no es detecta senyal en aquells extractes incubats en condicions de normòxia.

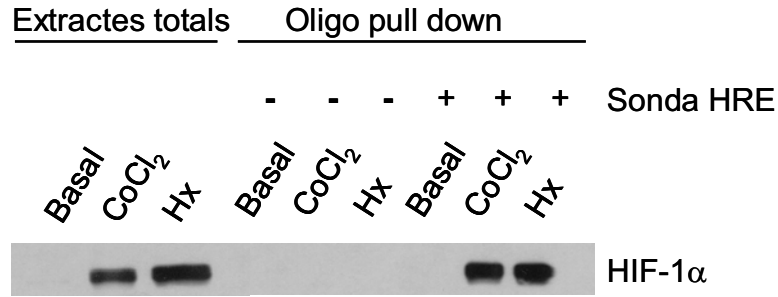


Figura 2.11. Oligoprecipitació del complex HRE-HIF-1 α . Els extractes cel·lulars de T98G tractats durant 16 h amb hipòxia 2% d'O₂, CoCl₂, o normòxia (basal) es van incubar amb la sonda biotinilada HRE (5'GCATGCGGG**ACGTG**ACGC**ACGTG**TGGCAG 3'). La unió DNA-proteïna es va precipitar utilitzant boles d'estreptavidina-sefarosa durant 1 hora. El precipitat que es va recollir es va analitzar per *western blot* utilitzant l'anticòs anti-HIF-1 α .

Tenint en compte els resultats obtinguts, podem afirmar que HIF-1 s'uneix a la seqüència de l'element de resposta a hipòxia o HRE localitzada entre els nucleòtids -1297 a -1269 del promotor del gen *pfkfb3* sota condicions d'hipòxia.

DISCUSSIÓ

L'habilitat d'adaptar-se a diferents concentracions d'oxigen és molt important per a la majoria de cèl·lules. La primera adaptació a la hipòxia la va descriure Louis Pasteur, coneguda com "efecte Pasteur", que significa que les cèl·lules frenen la fermentació en presència d'oxigen. Anys més tard, Hans Krebs va demostrar que es produïa com a conseqüència de la regulació de la PFK-1 pel citrat (Krebs, 1972).

El canvi fenotípic de les cèl·lules canceroses afavorint la glucòlisi ha estat molt estudiat al llarg del temps i va prendre un nou impuls al descobrir-se un dels mecanismes que permet incrementar l'expressió d'enzims glucolítics: l'estabilització de la subunitat α del factor de transcripció induïble per hipòxia (HIF-1) (Semenza et al., 1996). El factor HIF-1 és un integrador crític de l'adaptació cel·lular a la hipòxia, tant és així que les cèl·lules que no tenen la subunitat HIF-1 α presenten alteracions fisiològiques significatives en el metabolisme energètic (Seagroves et al., 2001).

Degut a l'efecte que té HIF-1 en la regulació dels enzims glucolítics, ràpidament es va pensar que es tractava d'un mediador de l'efecte Warburg, el qual indica que les cèl·lules tumorals presenten una elevada activitat glucolítica, tant en presència com en absència d'oxigen (Warburg, 1930).

Estudis previs del grup de G. Semenza demostraven que en condicions d'hipòxia hi havia una inducció de l'expressió de gens que codifiquen per alguns enzims glucolítics i que contenen al seu DNA possibles seqüències d'unió a HIF-1 (Semenza et al., 1996). Els resultats obtinguts de l'anàlisi de 3566 nucleòtids del promotor del gen *pfkfb3* posen en evidència la presència de possibles elements de resposta a hipòxia (HRE), que podrien explicar la inducció descrita que s'observa del gen sota condicions de baixa pressió d'oxigen (Minchenko et al., 2002; Minchenko et al., 2003). L'assaig d'activitat luciferasa senyala que la resposta més elevada a la hipòxia prové dels vectors *pfkfb3/-1407* i *pfkfb3/-3566*, donant a entendre que els que contribueixen majoritàriament a la resposta són els nucleòtids per sobre de la posició -1407.

Estudis precedents descriuen que els llocs HRE dels gens que codifiquen per enzims glucolítics com l'enolasa, la lactat deshidrogenasa A i la fosfoglicerat mutasa-B estan formats per un parell de HRE consecutius separats per 4-10 parell de bases (Semenza et al., 1996). Els nostres resultats indiquen que entre els -1407 i -3566 nucleòtids existeixen 3 possibles elements de resposta a HIF. Un d'ells, el de la posició -1902, no té un paper significatiu en la resposta a hipòxia, doncs només està

localitzat al plasmidi *pfkfb3*/-3566 i quan aquest vector i el *pfkfb3*/-1407 s'exposen a hipòxia no es troben diferències significatives en activitat luciferasa. Tenint en compte aquest fet i que els HRE trobats en altres enzims glucolítics estan formats per dues seqüències consecutives, ens vam centrar específicament en la regió de -1269 a la -1297, on es localitzen les altres dues possibles seqüències consens separades per 4 nucleòtids (Fig. 2.4). La implicació directe dels possibles llocs d'unió pel factor de transcripció HIF-1 localitzats entre els nucleòtids -1269 i -1297 es va analitzar amb experiments de transfecció, utilitzant les noves construccions 29Wt-cfos i 29Mut-cfos del promotor del gen humà *pfkfb3* a les línies cel·lulars T98G de glioblastoma humà. La construcció salvatge presentava una elevada resposta a hipòxia en aquest tipus cel·lular, mentre que no s'observava cap tipus d'efecte sota les mateixes circumstàncies pel plasmidi 29Mut-cfos. Paral·lelament es van estudiar aquestes mateixes construccions a una línia cel·lular de fibroblast de ratolí, mEF, on el gen que codifica per HIF-1 α està deletat (Seagroves et al., 2001). Degut a la pèrdua de la subunitat α , cap dels constructes va respondre als agents que mimetitzen la hipòxia. Tampoc va respondre el plasmidi *pfkfb3*/-3566 en aquestes mateixes cèl·lules deficientes en HIF-1 α en condicions d'un 2% d'oxigen. Això demostra, no només, la necessitat d'una subunitat HIF-1 α activa per a la regulació del gen *pfkfb3* en situació de baixa pressió d'oxigen, sinó que també atorga un paper essencial a la seqüència localitzada entre els nucleòtids -1269 i -1297.

La unió d'HIF-1 a les seqüències HRE del promotor es va corroborar amb l'assaig de retardament en gel i amb oligoprecipitació. Les bandes de retardament en gel es van detectar per aquells extractes on s'havia sobreexpressat per transfecció transitòria HIF α (401 Δ 603) i HIF-1 β . També es va detectar la banda de súper retardament quan els extractes es van incubar amb la sonda marcada i l'anticòs anti-HIF-1 β . A més a més, la unió de HIF-1 amb la mateixa seqüència de promotor també es va detectar per *western blot* després de la precipitació amb la columna d'estreptavidina-sefarosa.

Tots aquests resultats demostren que el gen *pfkfb3* és un gen induïble per hipòxia i que s'estimula a cèl·lules altament transformades mitjançant la interacció del factor de transcripció HIF-1 amb les seves seqüències consens localitzades a les posicions -1279 i -1288 del promotor del gen.

Per acabar de confirmar la importància del factor HIF-1 en la regulació del gen *pfkfb3*, es va induir la seva expressió utilitzant els vectors HIF α (401 Δ 603) i HIF-1 β . Els resultats d'activitat luciferasa que s'obtenen del promotor del gen *pfkfb3* són

semblants tant quan es tracten les cèl·lules amb CoCl_2 com quan es cotransfecta amb les construccions HIF α (401 Δ 603) sola o cotransfectada amb HIF-1 β . Les cèl·lules T98G demostren tenir una quantitat suficient de la subunitat β endògena com per a complementar la subunitat α sobreexpressada, aquest resultat està d'acord amb el publicat pel gen enolasa-1 (Semenza et al., 1996).

Les petites diferències que s'observen en condicions d'hipòxia entre els plasmidis *pfkfb3*/-1407 i *pfkfb3*/-3566 (Fig. 2.5), i la petita inducció d'activitat luciferasa que s'observa quan es transfecta el vector *pfkfb3*/-3566 a les cèl·lules mEF/HIF(-) (Fig. 2.9), pot ser deguda a la unió d'altres factors de transcripció a seqüències properes, les quals podrien cooperar per a aconseguir una major inducció del gen en situacions d'hipòxia.

Uns mesos més tard el grup que va clonar el gen *pfkfb3* a partir de placenta (Sakai et al., 1996) va identificar els dos mateixos HRE funcionals a la seqüència del promotor (Fukasawa et al., 2004), confirmant així els nostres resultats. Recentment, també s'ha observat que el gen *pfkfb3* es troba a línies cel·lular de càncer de pàncrees i gàstric i que respon a hipòxia per un mecanisme depenent de HIF-1 α (Bobarykina et al., 2006).

Tot sembla indicar que hi ha una inducció coordinada de diferents enzims glucolítics a les cèl·lules hipòxiques i que es porta a terme via regulació transcripcional per HIF-1. Això implicaria un increment del flux glucolític per tal de maximitzar la generació d'ATP. El paper específic de la hipòxia en la inducció del gen *pfkfb3* deu estar relacionat amb el paper que té aquest gen sobre l'estimulació de l'enzim PFK-1. Aquest enzim normalment és inactiu a les cèl·lules en absència dels seus moduladors al·lostèrics positius. El paper principal de la Fru-2,6-P₂ és alliberar la PFK-1 de la inhibició per ATP, permetent així que la glucòlisi es porti a terme (Ventura et al., 1991).

S'han dissenyat diverses estratègies terapèutiques contra el càncer utilitzant la seqüència HRE identificada en diferents gens diana d'HIF-1 (Marignol et al., 2005). Aquestes es basen en la inclusió del HRE en el cassette d'expressió d'un gen terapèutic d'interès, convertint-l'ho en un gen transcripcionalment regulat per HIF-1. Es tracta d'una estratègia que pretén actuar selectivament al tumor provocant l'expressió d'enzims suïcides (Dachs et al., 1997; Koshikawa et al., 2000; Shibata et al., 2002). L'activació de l'expressió de gens pro-apoptòtics mitjançada per HRE i per

tant per HIF-1 ha donat resultats molt esperançadors en càncer de pit i en glioma (Hernandez-Alcoceba et al., 2001;Marignol et al., 2005).

REGULACIÓ DEL GEN *PFKFB3* PER L'ANÀLEG DE PROGESTERONA
ORGANON 2058

INTRODUCCIÓ

La teràpia habitual del càncer de pit s'ha basat principalment en la supressió de l'acció dels estrògens (Hennighausen and Robinson, 1998; Neville et al., 2002; Kurebayashi, 2005). Tanmateix, aquesta teràpia només és efectiva en una fracció de tots els pacients que pateixen aquest tipus de càncer a més a més, alguns dels pacients que responen inicialment, acaben experimentant una recaiguda i no responen a teràpies antiestrogèniques addicionals (McGuire et al., 1987; Kurebayashi, 2005). El càncer de pit és el segon més comú arreu del món i està classificat com un càncer hormona-depenent, igual que el de pròstata i el d'endometri (Kurebayashi, 2005).

Els estrògens i la progesterona juguen un paper essencial en el desenvolupament normal de la glàndula mamària i en els canvis proliferatius que tenen lloc durant el cicle menstrual, l'embaràs i la lactància. Així com el paper dels estrògens també està clarament relacionat amb el creixement de cèl·lules tumorals, el paper de la progesterona en el càncer de pit no és gaire clar (Lydon et al., 2000; Wiebe et al., 2000). Segons la literatura, la progesterona juga un paper contradictori en aquest tipus de càncer, estimulante, inhibint o inclús sense tenir cap efecte en la proliferació cel·lular (Sutherland et al., 1988; Jeng et al., 1992; Groshong et al., 1997; Dabrosin, 2005). Aquest paper controvertit de l'hormona reflecteix el poc coneixement que es té actualment de la via de senyalització induïda per la progesterona, tot i estar clarament descrita la presència dels seus receptors (PR, *progesterone receptors*) en cèl·lules de càncer de pit (Cianfrocca and Goldstein, 2004; Zhang et al., 2005).

Encara que les raons concretes de l'increment de la glucòlisi aeròbica que es produeix en les cèl·lules canceroses són motiu de debat, no es qüestiona que els productes principals de la glucòlisi, l'ATP i els precursors per a la síntesi d'àcids nucleics i aminoàcids, són essencials per a la ràpida proliferació cel·lular (Horecker and Hiatt, 1958; Boros et al., 1997; Macallan et al., 1998). Les cèl·lules transformades, altament proliferants, expressen de forma constitutiva el mRNA i la proteïna del gen *pfkfb3*, i la inhibició de la seva expressió disminueix el creixement tumoral en models d'experimentació animal (Chesney et al., 1999). En concordança amb aquests resultats, Atsumi i col·laboradors van publicar que el gen *pfkfb3* s'expressa de forma pràcticament ubiqua a les cèl·lules epitelials, essent aquestes un tipus cel·lular que mostra, de forma basal, una elevada glucòlisi i proliferació. Molts tumors sòlids s'originen a partir de la transformació neoplàsica d'aquestes cèl·lules epitelials, com és el cas del pit i pròstata. Aquests tumors, conjuntament amb el de còlon, ovari i tiroides, són els que mostren una activació més elevada del gen *pfkfb3 in situ* (Atsumi et al.,

2002). A més a més, moltes línies cel·lulars de càncer de mama, com les MCF-7, T47D, MDA-MB 231 i MDA-MB-157 presenten nivells elevats del mRNA del gen *pfkfb3* (Hamilton et al., 1997).

Amb aquests antecedents i tenint en compte que el mRNA del gen *pfkfb3* es va aïllar de la línia cel·lular de càncer de mama T47D, sota l'acció d'un anàleg de la progesterona (Organon 2058) (Hamilton et al., 1997), ens vàrem plantejar com a objectiu l'estudi de la resposta del gen *pfkfb3* a aquest progestagen en cèl·lules de càncer de pit T47D.

3.1 Augment d'expressió de l'enzim uPFK-2 per estimulació amb un anàleg de la progesterona

L'Organon 2058 (ORG), 16 α -ethyl-21-hydroxy-19-norpregn-4-en-3,20-dione, és una progesterona sintètica que porta a terme la seva acció interaccionant de forma específica amb els receptors de progesterona (PR-A i PR-B). La línia cel·lular de càncer de mama T47D conté aquests receptors a la membrana nuclear. S'ha observat que l'acció de l'ORG en aquest tipus cel·lular provoca que les cèl·lules facin una ronda de replicació i després quedin arrestades al principi de la fase G₁. Això implica, que els canvis crítics d'expressió de gens regulats per ORG es puguin detectar a temps curts (Hamilton et al., 1997).

Els resultats obtinguts per Hamilton i col·laboradors utilitzant ORG demostraven que la màxima concentració de mRNA del gen *pfkfb3* s'havia detectat entre les 2 i 4 hores de tractament, tornant als nivells basals a les 12 hores. D'aquests resultats experimentals es deduïa, que l'increment del mRNA de *pfkfb3* es produïa abans de l'augment del número de cèl·lules retingudes a fase S, que acostumava a ser a les 10 hores de tractament amb la progesterona sintètica (Hamilton et al., 1997).

Tenint aquestes dades presents, ens vàrem plantejar la realització d'un *western blot* d'uPFK-2 amb extractes proteics de cèl·lules T47D, obtinguts després del tractament amb ORG a diferents temps (0, 1.5, 3 i 5 hores). De fet, Hamilton i col·laboradors només havien descrit canvis a nivell de mRNA i en cap cas aquests s'havien correlacionat amb un augment de proteïna. L'anàlisi proteic revelava un increment d'uPFK-2 a les 1.5 hores, mantenint-se com a mínim fins a les 5 hores (Fig. 3.1.A).

A continuació es va voler determinar si els efectes d'ORG sobre l'expressió del gen *pfkfb3* es produïen a través de la unió al seus receptors, utilitzant un inhibidor competitiu de la unió lligand-receptor anomenat RU 486 (17 β -hydroxy-11 β -(4-methylaminophenyl)-17 α -(1-propynyl)-estra-4,9-diene-3-one). S'observava, després de 5 hores de l'administració simultània d'ORG i el seu antagonista RU, la inhibició de l'expressió d'uPKF-2 induïda per ORG (Fig. 3.1.B).

Podem afirmar, doncs, que la progesterona sintètica ORG regula la concentració d'uPKF-2, mitjançant els receptors de progesterona en cèl·lules de càncer de mama humà (T47D) i que l'activació es manté des de les 1.5 hores de tractament fins almenys 5 hores.

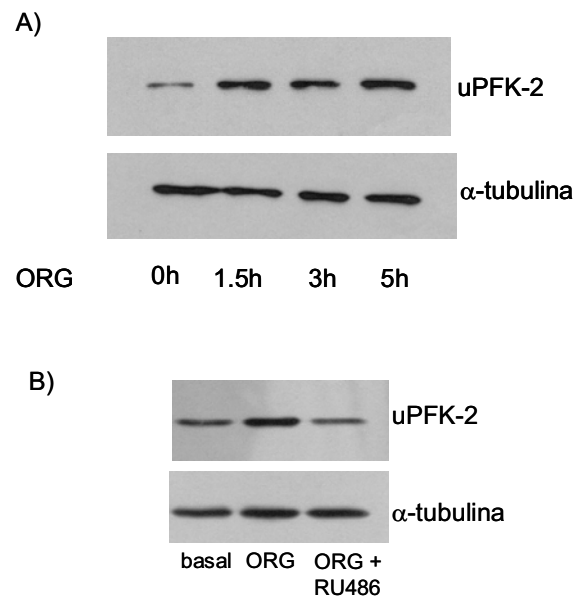


Figura 3.1. Western blot contra uPKF-2 d'extractes proteics totals de cèl·lules T47D sota tractament d'Organon. A) Les cèl·lules s'incuben en medi sense sèrum i amb una concentració de 10 nM d'Organon 2058 durant 1.5, 3 i 5 hores o amb alcohol 96° (0h). Per a cada condició es carreguen 7 μ g de proteïna total. La càrrega es normalitza amb l'anticòs anti-tubulina. B) Les cèl·lules s'incuben durant 5 hores en medi sense sèrum i amb 10 nM d'ORG o amb la mateixa concentració d'ORG i 100 nM de RU. La càrrega es normalitza amb l'anticòs anti α -tubulina.

3.2 Efecte de l'anàleg de progesterona Organon 2058 en l'expressió endògena del mRNA del gen *pfkfb3*

Després d'observar l'increment d'expressió proteica d'uPKF-2 degut al tractament amb ORG, es va voler confirmar, que aquest provingués d'un increment dels nivells del seu mRNA. Per aquest motiu es va utilitzar la tècnica de PCR a temps

real amb una sonda específica contra el cDNA del gen humà *pfkfb3*. Resultats publicats anteriorment indicaven que el cultiu de cèl·lules T47D es realitzava amb un suplement d'insulina (Hamilton et al., 1997). El nostre grup havia vist que la insulina estimulava l'expressió del gen *pfkfb3* per la via de transducció de senyals PI3K-Akt (Riera et al., 2002). De manera que es va realitzar l'experiment amb i sense insulina per tal de veure si aquesta hormona podia modificar els resultats obtinguts amb l'anàleg de progesterona (ORG).

Les cèl·lules T47D es van cultivar amb medi DMEM sense sèrum durant 0, 3, 7 i 24 hores i es van tractar amb insulina o ORG o amb ambdós simultàniament. Després de tres hores de tractament amb ORG es detecta la màxima concentració de mRNA del gen *pfkfb3*, 13 vegades d'inducció respecte el nivell basal. Per altra banda, durant el mateix temps d'exposició a insulina el nivell obtingut de mRNA és 3 vegades superior respecte al basal. A les 7 i 24 hores d'exposició a l'anàleg de progesterona es detecten 4 i 7 vegades d'inducció, respectivament, del mateix ordre que les que es detecten en presència d'insulina, 2.5 i 4.5, respectivament. Pel què fa al tractament simultani d'ORG i insulina no s'observa sinergisme en cap dels punts de l'experiment (Fig. 3.2).

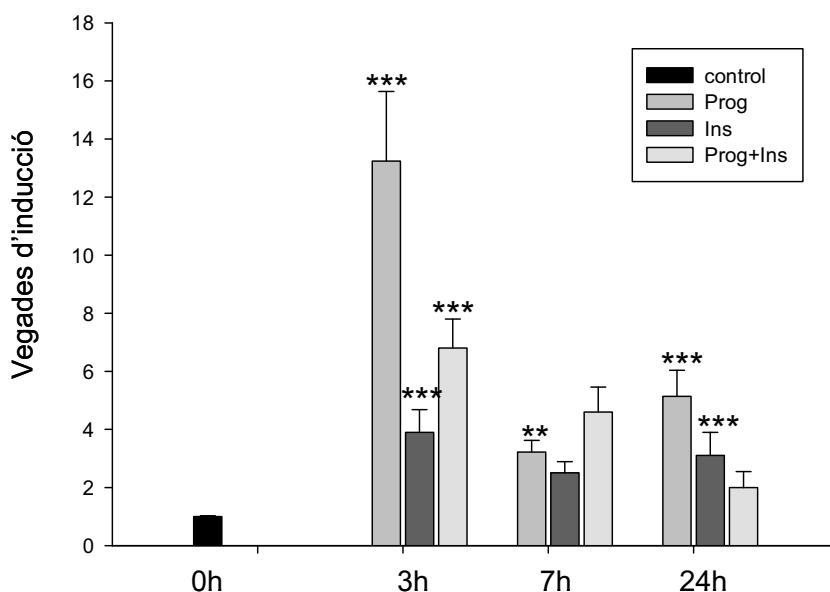


Figura 3.2. Anàlisi del mRNA del gen *pfkfb3* en cèl·lules T47D sota tractament hormonal. PCR a temps real del mRNA obtingut a partir de cèl·lules T47D després de 0, 3, 7 i 24 h de tractament amb 10 nM d'Organon® (prog.), 1 µM Insulina (Ins.), o la combinació de les dues hormones (Prog+Ins). La barra negra representa el contingut del mRNA del gen *pfkfb3* en medi control sense tractament (0h), les diferents tonalitats de gris representen el cDNA del gen *pfkfb3* obtingut sota els tractaments amb hormones. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció *versus* 0 h. Els resultats s'han normalitzat amb *GUS* (n=3 per condició). S'observen efectes estadísticament significatius (p<0.001) dels tractament amb Prog, Ins i Prog+ Ins i a les 3 i 24 h, comparats amb la condició control, p<0.01 en el tractament amb Prog a les 7 h.

Els increments observats en l'expressió del mRNA del gen *pfkfb3* sota el tractament d'ORG són estadísticament significatius respecte al control en tots els temps escollits. El mateix passa amb la insulina, exceptuant el punt de les 7 hores. Però, en el cas del tractament dual ORG i insulina només és significatiu a les 3 hores (Fig. 3.2).

Tenint en compte aquests resultats, podem assegurar que l'ORG, actua incrementant l'expressió del mRNA del gen *pfkfb3* i que l'aplicació conjunta d'ORG i insulina no té un efecte sinèrgic, ans el contrari, s'aconsegueixen nivells significativament més elevats amb el tractament de l'anàleg de progesterona sol.

3.3 Resposta de les diferents deleccions de la regió 5' del promotor del gen *pfkfb3* al tractament amb Organon 2058

Tenint en compte que tant els nivells de proteïna com de mRNA del gen *pfkfb3* augmenten en cèl·lules de càncer de mama quan s'estimulen amb ORG, ens vam plantejar la possibilitat que la regulació de l'expressió del gen *pfkfb3* fos a nivell transcripcional. Resultats inicials obtinguts amb els programes MatInspector, TransFac i Alibaba, mostren un possible element de resposta a progesterona (PRE) a la regió 5' UTR del gen. Aquest es localitza des de la posició -2176 a la -2159 de l'inici de transcripció i la seqüència de nucleòtids és: 5'-AGAACATAGTCT**TTCCCT**-3'. Els nucleòtids subratllats i en negreta corresponen al cor 100% homòleg de les seqüències PRE (Fig. 3.3).

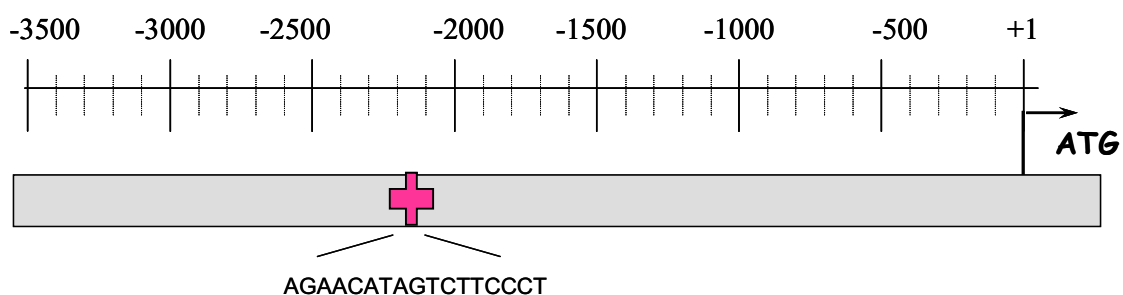


Figura 3.3. Anàlisi de la regió 5' del promotor del gen *pfkfb3*. Possible element regulador de progesterona del promotor del gen *pfkfb3*. La creu correspon a la localització de la seqüència: 5'AGAACATAGTCTTTCCCT 3'.

Es va posar a punt la transfecció de les cèl·lules T47D utilitzant diferents agents. Finalment, les construccions de promotor del gen *pfkfb3* humà es van transfectar amb Lipofectamina 2000, aconseguint un rendiment del 30%. A les 3 hores de transfecció, es va canviar el medi i es van deixar recuperar les cèl·lules durant 16 hores amb medi DMEM amb 10% FBS. Seguidament, després de mantenir-les durant 6 hores amb DMEM sense sèrum, es van incubar en tres condicions diferents. Una amb ORG 10 nM dissolta en etanol absolut; una segona, que s'utilitza com a control positiu, amb 10% FBS i la mateixa quantitat d'etanol absolut que el grup 1, i un control basal de DMEM sense sèrum i amb la mateixa proporció d'etanol absolut que en el control positiu.

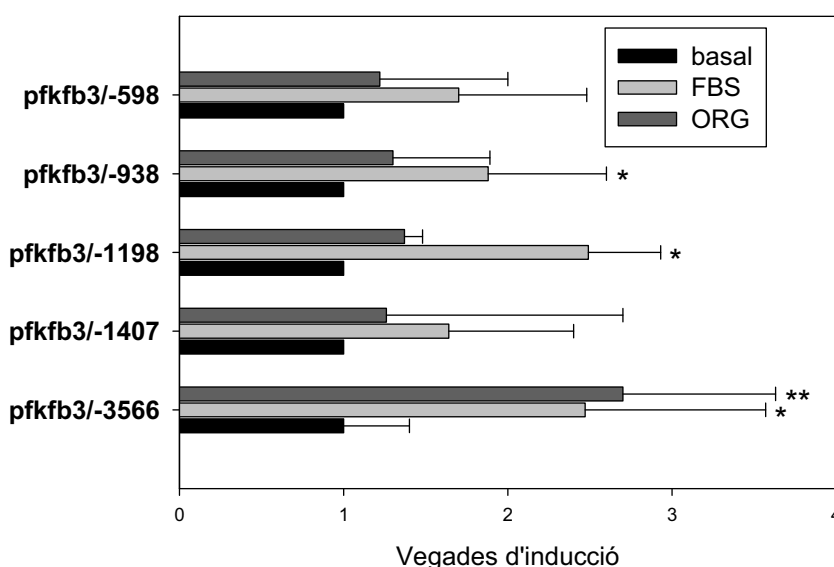


Figura 3.4. Resposta transcripcional dels diferents fragments del promotor del gen *pfkfb3* per acció del progestagen ORG. Les diferents construccions i 60 ng del vector d'expressió β -galactosidasa es van transfectar de forma transitòria a cèl·lules T47D. Les cèl·lules es van incubar durant 16 hores amb 10 nM d'ORG (Prog.), o es van mantenir amb DMEM sense sèrum (basal) o amb DMEM 10% FBS (FBS) com a control positiu. Les transfeccions es van realitzar per duplicat i es van fer les mitjanes dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. A cada experiment, les dades individuals es van calcular com una mitjana de com a mínim triplicats i es van expressar com la relació de l'activitat luciferasa del promotor respecte l'obtinguda per la β -galactosidasa en el mateix lisat cel·lular. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció comparades amb la seva corresponent condició basal. *Pfkfb3*-3566 té una activitat luciferasa estadísticament significativa ($p < 0.01$) en la condició amb Prog. respecte el seu basal. I les construccions *pfkfb3*-3566, *pfkfb3*-1198 i *pfkfb3*-938 tenen una activitat luciferasa estadísticament significativa ($p < 0.05$) en la condició FBS respecte el seu basal.

Com s'observa a la figura 3.4, l'única construcció que presenta un augment significatiu d'activitat luciferasa després del tractament amb ORG, és la *pfkfb3*-3566. Obtenint-se 2.7 vegades d'inducció respecte el basal. Es tracta de l'única

seqüència de promotor clonada que conté el possible PRE. La resta de construccions, després del tractament amb el progestagen, no mostren increments significatius d'activitat luciferasa, doncs s'obtenen valors de 1.3; 1.4; 1.3 i 1.2 per als plasmidis *pfkfb3/-1407*, *pfkfb3/-1198*, *pfkfb3/-938* i *pfkfb3/-598*, respectivament.

Aquest resultat preliminar fan pensar que l'anàleg de progesterona ORG regula la transcripció del gen *pfkfb3* humà, i que en aquesta regulació intervé la zona de promotor localitzada a partir dels -1407 nucleòtids des de l'inici de transcripció.

DISCUSSIÓ

La tomografia d'emissió de positrons (PET) utilitzant la 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxi-glucosa ha demostrat que la majoria de tumors metabolitzen aproximadament 10 vegades més glucosa que els teixits normals, independentment del tipus tumoral (Di Chiro et al., 1982; Yonekura et al., 1982; Bares et al., 1996; Conti et al., 1996). Aquesta taxa de metabolisme glucolític correlaciona directament amb l'agressivitat del tumor (la taxa de creixement, la capacitat d'invasió i el potencial metastàtic) i, en conjunt, amb la morbiditat i la mortalitat del pacient (Walenta et al., 1997; Walenta et al., 2000). El segon càncer més comú arreu del món és el càncer de pit. Es tracta d'un càncer hormona-dependent, on l'acció dels estrògens ha estat ben estudiada. Per altra banda, tot i la identificació dels receptors de progesterona en aquest tipus de càncer, la via de senyalització induïda per aquesta hormona està pendent de caracteritzar. Sabent que el gen *pfkfb3* té un paper essencial en el metabolisme glucolític i que es va aïllar d'un tipus cel·lular de càncer de mama prèviament estimulat amb l'anàleg de progesterona Organon 2058 (Hamilton et al., 1997), es va pensar que part del mecanisme d'acció d'aquesta hormona podria vincular-se amb la regulació del gen *pfkfb3*.

Els nostres resultats indiquen que no només el mRNA del gen respon als estímuls de l'anàleg de progesterona Organon 2058 (ORG), amb unes 13 vegades d'inducció, sinó que també augmenta ràpidament l'expressió proteica. Només 1.5 hores després del tractament amb ORG, s'observa un increment d'expressió de l'enzim uPFK-2. A més a més, podem afirmar que la inducció del gen requereix els receptors de progesterona, doncs l'ús de l'antagonista RU 486, un inhibidor competitiu d'aquests receptors, inhibeix completament l'estimulació del gen *pfkfb3*.

L'anàlisi dels -3566 nucleòtids del promotor realitzat amb els programes informàtics MatInspector, TransFac i Alibaba, descriu una única possible seqüència consens pel receptor de progesterona, des de la posició -2176 a la -2159, i que correspon als nucleòtids : 5'-AGAACATAGTCTTCCCT-3'. L'estudi de l'activitat luciferasa del promotor demostra que la resposta a ORG és estadísticament significativa en el plasmidi que conté aquesta seqüència (*pfkfb3*/-3566), mentre que, els fragments inferiors que no la contenen, no responen al tractament amb l'anàleg de la progesterona. De totes maneres aquests experiments d'activitat luciferasa són preliminars, ja que els resultats obtinguts són la mostra de dos experiments. Per tant, no podem descartar, la possibilitat de que l'increment de mRNA i proteïna observats

amb l'ús del progestagen ORG sigui degut a la suma de l'estimulació de la transcripció i de l'estabilització del seu mRNA. El mRNA del gen *pfkfb3* conté seqüències AUUUA al llarg de la regió 3' UTR (*untranslated*) que comparteix amb diverses citoquines i protooncògens, les quals són senyal d'un mRNA molt inestable i juguen un paper important en la vida mitja del producte del gen (Chesney et al., 1999).

Aquests resultats podrien demostrar que la progesterona pot ser important en l'adquisició del fenotip glucolític en aquelles cèl·lules de càncer de mama que expressen receptors de progesterona.

**SOBREEXPRESSIÓ DEL GEN *PFKFB3* EN EL FETGE DE RATOLINS
DIABÈTICS**

INTRODUCCIÓ

La insulina i el glucagó són dues hormones encarregades de controlar l'homeòstasi de la glucosa en sang. Les cèl·lules β pancreàtiques detecten els nivells de glucosa circulant i alliberen insulina, que disminuirà la glucèmia principalment per l'estimulació del transport actiu de la glucosa a través de les membranes cel·lulars.

Als mamífers, el fetge juga un paper crític en aquesta homeòstasi, mantenint el balanç entre l'absorció i emmagatzemament de la glucosa a través de la glucòlisi i glucogènesi i l'alliberament de glucosa a sang via glucogenòlisi i gluconeogènesi (Shao et al., 2005). El fetge és l'òrgan responsable de convertir l'excés de carbohidrats de la dieta a triglicèrids, permetent acumular aquests compostos en el teixit adipós com a reservori energètic. A més a més, les altes concentracions de carbohidrats produeixen l'activació de gens que codifiquen per a enzims glucolítics i lipogènics involucrats en el seu metabolisme (Dentin et al., 2004).

En períodes de dejuni, les cèl·lules α pancreàtiques alliberen glucagó i el fetge produeix glucosa a partir del glucogen o bé realitzant síntesi *de novo* a partir de precursors com el lactat, el piruvat, el glicerol i l'alanina (gluconeogènesi) (Shao et al., 2005).

Els gens que codifiquen pels enzims involucrats en aquests processos estan controlats a nivell transcripcional per la interacció de diferents hormones, principalment el glucagó, els glucocorticoides i la insulina.

La diabetis tipus I es caracteritza per la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β pancreàtiques, productores d'insulina, per macròfags i cèl·lules T CD4+ i CD8+. Aquesta malaltia afecta a més de 2 milions de persones (Gillespie, 2006) i s'associa a una significativa morbiditat i mortalitat, contribuint alhora al desenvolupament d'altres malalties. L'inici de la diabetis s'acompanya del desenvolupament d'anormalitats bioquímiques i funcionals, incloent-hi alteracions en el metabolisme de carbohidrats, lípids i proteïnes i canvis en l'estat redox (Dhahbi et al., 2003). Aquest estat patològic que es genera és particularment important en el fetge.

Pacients diabètics, tot i seguir un tractament amb insulina, presenten una alteració de la grandària del fetge. Molts d'aquests problemes s'han relacionat amb la hiperglucèmia crònica i les alteracions metabòliques que en resulten. Clínicament, s'observa hepatomegàlia tant en persones diabètiques joves com adultes (Herrman et al., 1999), però el mecanisme involucrat es desconeix.

Un model emprat en animals per a l'estudi de la diabetis tipus I és el que utilitza l'estreptozotocina (STZ) (1-methyl-1-nitroso-3-[2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-3-yl]-urea, figura 4.1), un oxidant que indueix específicament l'apoptosi de les cèl·lules β -pancreàtiques (Szkudelski, 2001).

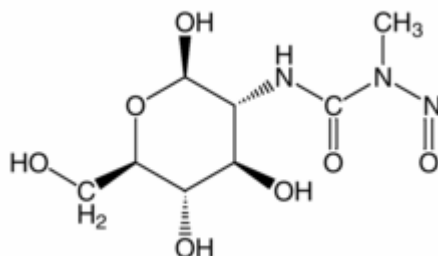


Figura 4.1. Estructura química de l'estreptozotocina.

Aquest model es caracteritza per generar una disminució, gairebé total, dels nivells d'insulina, una hiperglucèmia severa i alteracions de la transducció de senyals dependents d'insulina (Herrman et al., 1999).

A més a més, en rates, la diabetis induïda amb STZ s'associa amb hepatomegàlia, que pot ser deguda a un augment en el nombre de cèl·lules (hiperplàsia), l'augment del tamany cel·lular (hipertròfia) i/o disminució de l'apoptosi (Herrman et al., 1999). Per exemple, es creu que la hipertròfia vascular pot ser la causa de la hipertensió del diabètic (Hulthen et al., 1996). De la mateixa manera, la hipertròfia i la hiperplàsia en d'altres òrgans, com l'epiteli intestinal de rates diabètiques, s'associen amb anormalitats d'absorció (Younoszai and Parekh, 1993).

En ratolins diabètics, generats pel tractament amb STZ, els mecanismes que regulen la divisió cel·lular estan alterats. S'ha descrit que en aquests animals l'hormona de creixement, la qual accelera la regeneració hepàtica, es troba 10 vegades per sobre del seu nivell habitual. Després d'un tractament amb estreptozotocina el nombre de cèl·lules en fase G2 del cicle cel·lular és significativament més elevat respecte el dels ratolins control (no diabètics) (Shankar et al., 2003). Una característica d'aquests animals és que són resistent a l'hepatotoxicitat, probablement degut a aquest sistema de reparació tissular.

La proliferació cel·lular i el creixement tumoral normalment s'acompanyen d'un elevat flux glucolític, doncs permet a les cèl·lules equilibrar la seva demanda energètica i proveir els precursors anabòlics per a la síntesis de nucleòtids. Tal i com s'ha explicat anteriorment, aquest alt flux glucolític està controlat, entre d'altres, per la

6-fosfofructoquinasa-1 sent la Fru-2,6-P₂ el seu major activador al·lostèric. El producte del gen *pfkfb3*, degut a l'alta activitat quinasa, permet obtenir altes concentracions de Fru-2,6-P₂, i així mantenir un elevat flux glucolític. El gen *pfkfb3*, doncs, s'ha relacionat amb proliferació ja que s'ha trobat sobreexpressat en teixits proliferatius, línies cel·lulars transformades i en diferents tumors (Riera et al., 2002; Obach et al., 2004).

Tenint en compte les dades prèvies, l'objectiu que ens vàrem plantejar va ser estudiar la relació del gen *pfkfb3* amb la proliferació i creixement del fetge de ratolins diabètics. Per a dur-ho a terme, vàrem utilitzar ratolins C57/BL6 tractats amb STZ.

4.1. Anàlisi de l'expressió del gen *pfkfb3* al fetge de ratolins amb diabetis induïda per estreptozotocina

La soca de ratolí C57/BL6 s'injectava amb STZ per tal de poder estudiar la diabetis tipus I en aquest model animal. Tal i com s'explica a materials i mètodes, els animals es dejunaven durant 10 hores i seguidament s'injectava via intraperitoneal 100 mg/Kg de STZ. Després de 24 hores de recuperació es realitzava un segon període de dejuni de 10 hores amb la posterior injecció intraperitoneal de la mateixa dosi de STZ. Es controlava la glucèmia i insulinèmia dels ratolins durant els següents quinze dies. Per obtenir el fetge es realitzava una dislocació cervical i el teixit es clampava i congelava amb nitrogen líquid per a l'estudi dels diferents paràmetres.

Després del tractament amb STZ els ratolins C57/BL6 mostraven una elevada glucèmia, >550 mg/dl, i una insulinèmia pràcticament indetectable, <0.15 µg/l (a dia 15 després del tractament). En aquestes condicions i després d'un dejuni de 10 hores, es va analitzar el producte del gen *pfkfb3*, l'enzim uPFK-2, en ratolins control (no diabètics) i en ratolins amb diabetis induïda amb STZ.

Es va realitzar un *western blot* dels extractes de fetge de ratolí diabètic i control (no diabètic). Tal i com es mostra a la figura 4.2.A1, es detecta un augment de l'isoenzim uPFK-2 en el fetge diabètic respecte el control.

Aquest increment observat per l'enzim uPFK-2 no s'obté per la proteïna LPFK-2, inicialment identificada a fetge i codificada pel gen *pfkfb1*, en les mateixes condicions (Fig. 4.2.B1).

Per a corroborar que aquest increment obtingut per a la proteïna uPFK-2 provenia d'un augment dels nivells del seu mRNA es va realitzar una PCR a temps real. Aquesta tècnica es va portar a terme amb les mateixes mostres i es va analitzar tant el mRNA del gen *pfkfb3* com el del gen *pfkfb1*. Els resultats mostren un increment

significatiu, d'aproximadament 9 vegades, del mRNA codificat pel gen *pfkfb3* en fetges diabètics a dia 15 quan es compara amb els fetges de ratolins no diabètics. Per altra banda i, tal com esperàvem, no es detecta cap increment significatiu del mRNA del gen *pfkfb1* en les mateixes condicions (Fig. 4.2.A2 i 4.2.B2).

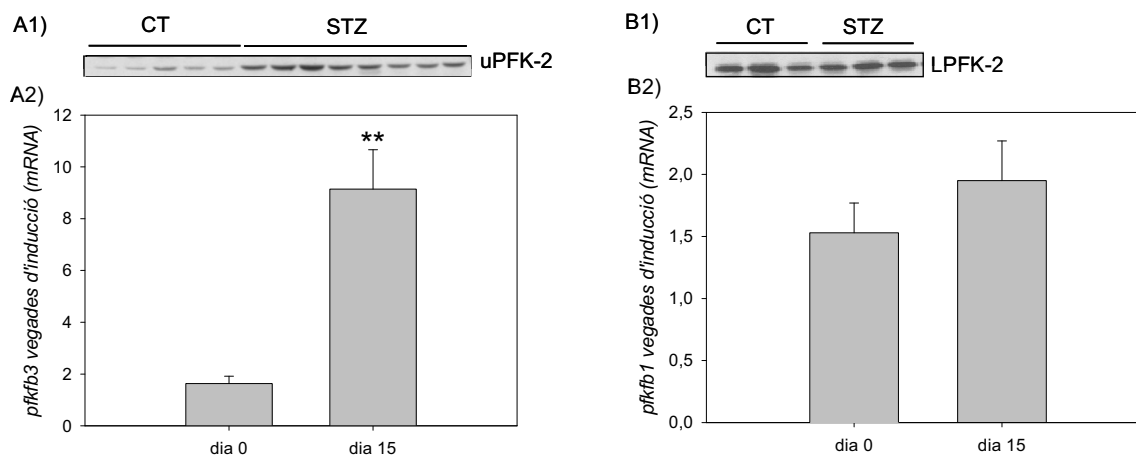


Figura 4.2. Expressió del gen *pfkfb3* i *pfkfb1* en el fetge de ratolins diabètics tractats amb STZ. Western blot d'uPFK-2 (A1) i LPFK-2 (B1) realitzat amb 50 µg d'extracte total de fetge de ratolins controls (CT) i diabètics (STZ) dejunats durant 10 hores. Com a control de càrrega es va optar per a la quantificació proteica. Anàlisi del RNA aïllat del fetge de ratolins control dejunats (dia 0) o diabètics (dia 15) del gen *pfkfb3* (A2) i *pfkfb1* (B2). Les dades representen les vegades d'inducció respecte el valor més baix de dia 0, normalitzat utilitzant la sonda de 18S. S'observen canvis estadísticament significatius entre els valors de la uPFK-2 dels fetges de ratolins diabètics respecte els control ($p < 0.01$, **).

Aquests resultats ens indiquen que, en condicions de dejuni, els fetges de ratolins diabètics presenten una sobreexpressió tant de la proteïna com del mRNA del gen *pfkfb3*, mentre que l'expressió del gen *pfkfb1* es manté constant.

A continuació es va voler valorar si l'augment d'expressió del gen *pfkfb3* era degut a la regulació transcripcional d'aquest. Per tal de realitzar-ho *in vivo*, és a dir, en aquests mateixos ratolins diabètics tractats amb STZ, vàrem dissenyar un experiment que permetia la transfecció del promotor del gen *pfkfb3* al fetge del ratolí. Aquest consistia en l'ús de la tècnica de la transferència gènica per hidrodinàmica del fragment de -3566 nucleòtids del promotor del gen *pfkfb3* clonat al vector d'expressió de luciferasa pGL2basic.

La hidrodinàmica és una tècnica molt eficient que permet transferir DNA a animals *in vivo* i amb una distribució d'aquest preferentment al fetge (Fig. 4.3). S'injecta, per la cua de l'animal, el DNA diluït en un volum de solució salina equivalent

al 10% del pes del ratolí i aproximadament entre un 20% i un 40% de les cèl·lules hepàtiques es transfecten. La hidrodinàmica és un mètode capaç de superar com a mínim tres barreres físiques: la barrera territorial entre la zona d'injecció (vena de la cua) i l'òrgan diana (fetge), la barrera estructural del fetge fenestrat que evita l'accés de les grans molècules als hepatòcits del parènquima, i la barrera de la membrana plasmàtica dels hepatòcits que limita l'entrada de les molècules hidròfiles al citoplasma, especialment les llargues com el DNA, el RNA i proteïnes (Zhang et al., 2004).

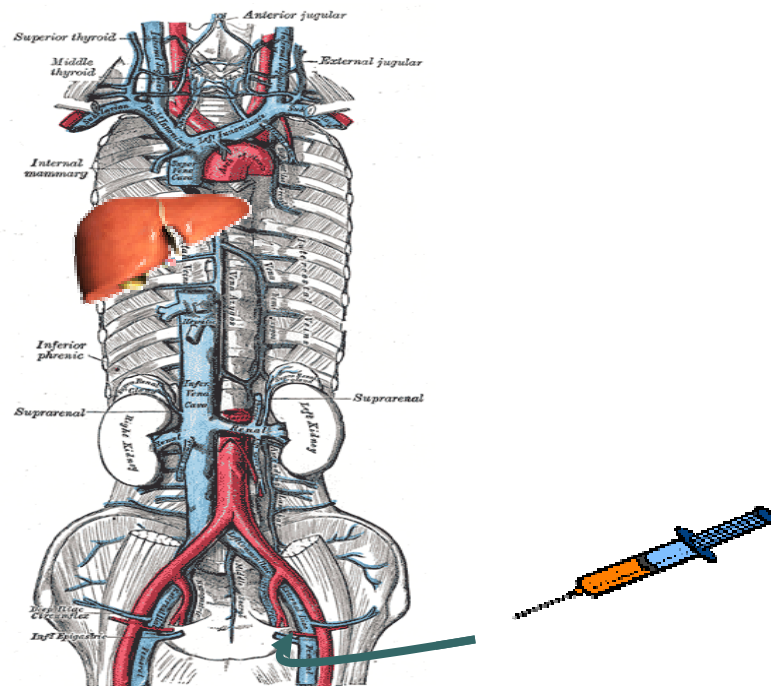


Figura 4.3. Tècnica de transferència gènica per hidrodinàmica.

Es van injectar 30 μg del plasmidi d'expressió luciferasa controlat pel promotor del gen *pfkfb3*, en un volum final de 2 ml amb solució salina com a vehicle. El dia següent de la transfecció, el ratolí es va eutanasiar per dislocació cervical i el lòbul caudal del fetge es va congelar amb nitrogen líquid. Sempre s'agafava el mateix lòbul per a estudiar l'activitat luciferasa, doncs és una manera d'eliminar possibles variacions degudes a la transfecció. Aquest lòbul es va homogeneïtzar amb solució de lisi i es va llegir l'activitat luciferasa al luminòmetre. Tal i com es mostra a la figura 4.4, l'activitat luciferasa dels fetges de ratolins diabètics és significativament més elevada que la que s'obté dels ratolins no diabètics (control). Així doncs, es detecta una inducció de 14 vegades d'activitat luciferasa de la construcció *pfkfb3*-3566 en la condició diabètica quan es compara amb la no diabètica.

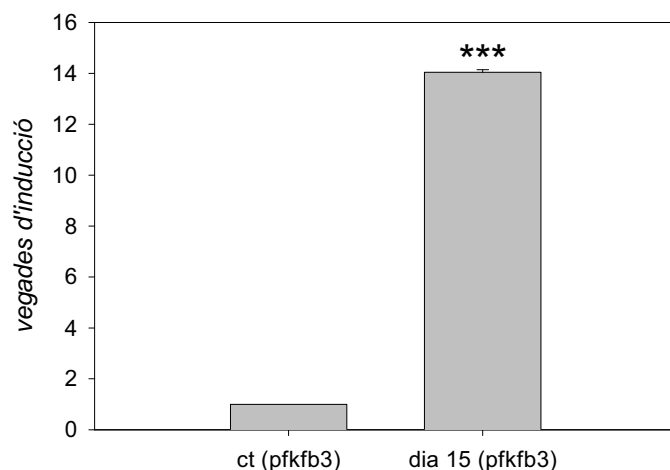


Figura 4.4. Estudi del promotor del gen *pfkfb3*. La transfecció de 30 µg de promotor al fetge dels ratolins es va realitzar per hidrodinàmia. El vector d'expressió luciferasa *pfkfb3*/-3566 es va injectar per la cua del ratolí control (ct *pfkfb3*) i diabètic (dia 15 *pfkfb3*) en un volum final igual al 10% de pes corporal. S'observen efectes estadísticament significatius en l'activitat luciferasa dels fetges dels ratolins diabètics respecte els fetges control ($p < 0.001$, ***).

4.2. Els nivells de Fructosa 2,6-bisfosfat són elevats en el fetge diabètic de ratolins dejunats

Un cop vàrem analitzar que l'increment de proteïna i mRNA concordava amb l'augment de transcripció, vam voler determinar si l'enzim uPFK-2 en animals diabètics era funcional.

El quocient d'activitats dels dominis quinasa i bisfosfatasa de l'enzim PFK-2 és el què determina els nivells de Fru-2,6-P₂. Quan l'activitat quinasa és dominant, com és el cas del producte del gen *pfkfb3*, l'uPFK-2 funciona pràcticament com una quinasa i sintetitza Fru-2,6-P₂. Donat que els resultats anteriors indiquen que l'enzim uPFK-2 està sobreexpressat en el fetge de ratolins diabètics en condicions de dejuni, es va voler analitzar si aquesta sobreexpressió correlacionava amb un increment en els nivells de Fru-2,6-P₂. Tal i com es mostra a la figura 4.5.A, després d'un període de dejuni de 10 hores, la concentració de Fru-2,6-P₂ és significativament més elevada (12 pmols/mg prot.) en ratolins diabètics (dia 15) respecte els ratolins controls (dia 0).

El fet que la concentració de Fru-2,6-P₂ fos més elevada ens va fer pensar en la probabilitat de l'acumulació de lactat al citosol de l'hepatòcit, doncs estariem incrementat el flux glucolític i per tant el pas de piruvat a lactat. Es va analitzar si la producció de lactat correlacionava amb l'increment de la concentració de Fru-2,6-P₂ hepàtica però no es van detectar canvis significatius en aquests nivells (Fig. 4.5.B). A més a més, la concentració de glucosa plasmàtica es mantenia constant (> 550 mg/dl) a partir del dia 4 de la injecció de STZ. Aquests resultats indiquen que en condicions

de dejuni a 15 dies de la injecció de STZ, la concentració de Fru-2,6-P₂ experimenta un increment significatiu, però no podem corroborar un flux glucolític elevat en paral·lel, doncs els nivells de lactat no varien respecte els control.

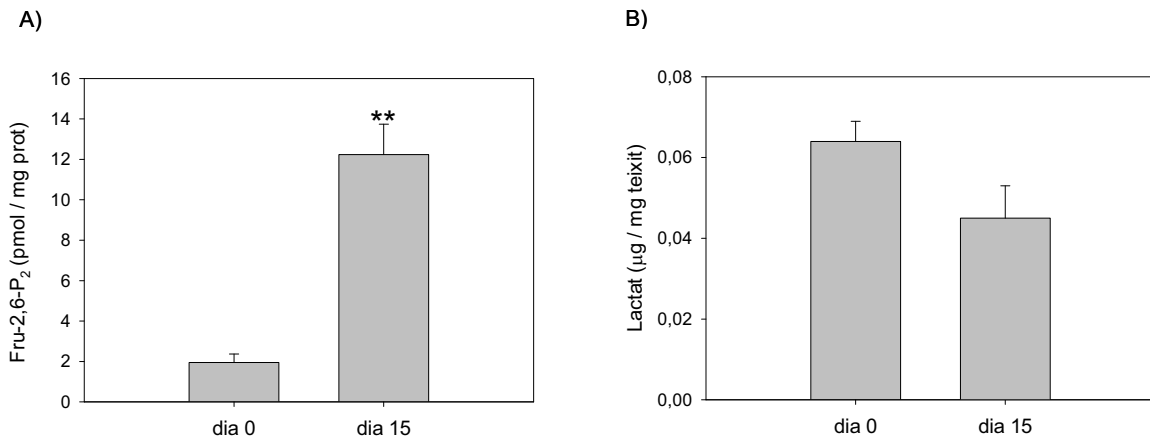


Figura 4.5. Concentracions de Fru-2,6-P₂ i lactat en el fetge de ratolins diabètics.

A) Concentracions de Fru-2,6-P₂ en fetges de ratolins control (dia 0) i diabètics (dia 15). Es van homogeneïtzar 100 mg de fetge i els nivells es van determinar seguint el mètode descrit per Van Schaftingen et al el 1981. Efectes estadísticament significatius de Fru-2,6-P₂ dels fetges diabètics comparats amb els control ($p < 0.01$, **). B) Concentracions de lactat de fetges de ratolins control (dia 0) i diabètics (dia 15). L'anàlisi es realitza a partir de 100 mg de teixit i els resultats s'expressen en µg/mg de teixit.

4.3. Variació temporal de la inducció del gen *pfkfb3* en fetges de ratolins diabètics

Per investigar detalladament el perfil d'inducció de l'enzim uPFK-2 durant el període comprès entre la injecció de STZ i el dia 15, es va ampliar l'estudi fent un seguiment temporal dels animals, analitzant diferents temps a partir del tractament.

Un número representatiu d'animals es van sacrificar als dies 2, 4, 6, 8, 10 i 15 després del tractament amb el tòxic (STZ), d'aquests es recollia el fetge per avaluar tant la concentració d'enzim uPFK-2, com la quantitat del seu mRNA. S'observa, emprant la tècnica de *western blot*, una sobreexpressió significativa i gradual dels nivells d'isoenzim des del dia 6, arribant als valors més alts a dia 10 i 15 (Fig. 4.6.A). El seu mRNA segueix un patró bastant semblant, obtenint-se per PCR a temps real valors significativament més elevats a partir del dia 8 i arribant al seu punt màxim el dia 15 (Fig. 4.6.B).

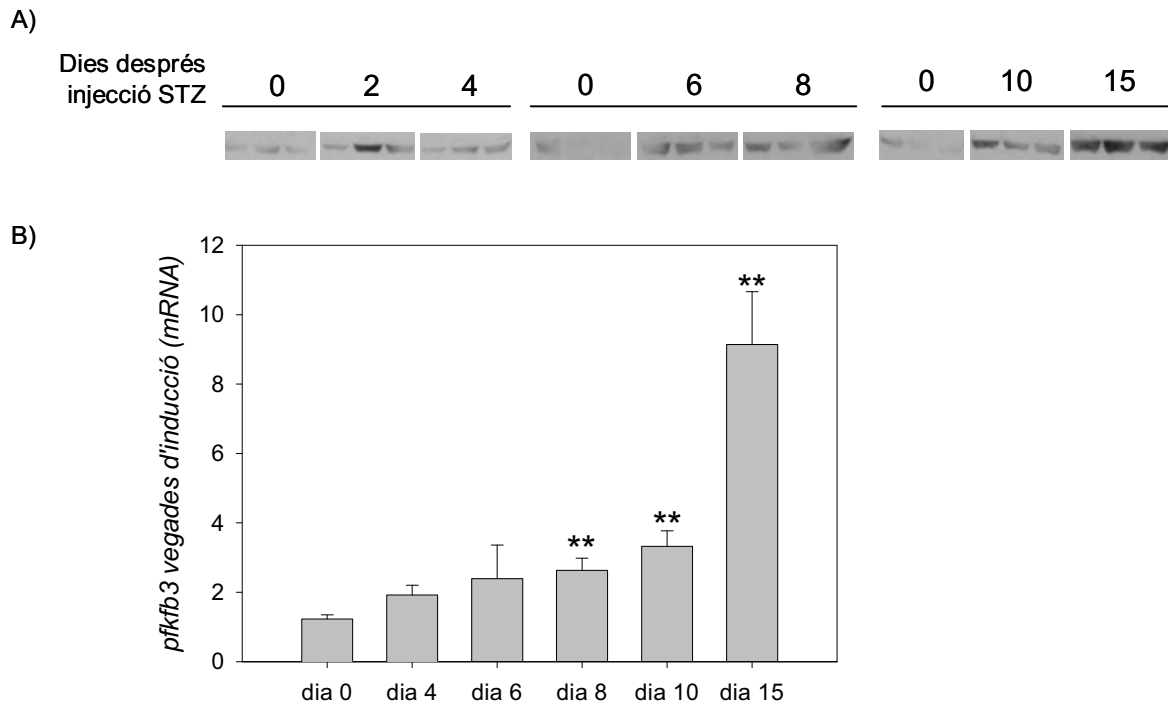


Figura 4.6. Variació temporal de la inducció del gen *pfkfb3* en ratolins diabètics tractats amb STZ. A) *Western blot* significatiu de la proteïna uPFK-2 a partir de 50 µg d'extracte total de fetge de ratolins dejunats durant 10 hores. Es van agafar mostres el dia 0 (control), dia 2, 4, 6, 8, 10 i 15 després de la injecció amb STZ. La quantificació proteica s'utilitza com a control de càrrega. B) El RNA aïllat dels fetges de ratolins control (dia 0) i ratolins diabètics (dies 4, 6, 8, 10 i 15), es va analitzar per RT-PCR. Els valors representen les vegades d'inducció respecte el valor més baix obtingut el dia 0. Resultats estadísticament significatius s'observen a partir del dia 8 respecte al control ($p < 0.01$, **).

Per tal de veure si els resultats observats, mesurant proteïna i RNA, es podien explicar per un increment de la transcripció del gen *pfkfb3*, es va assajar l'activitat luciferasa de la construcció *pfkfb3*/-3566. Aquest experiment de luciferasa *in vivo* es va realitzar utilitzant la tècnica de transferència gènica per hidrodinàmica, amb les mateixes quantitats de DNA emprades anteriorment. Els resultats mostrats a la figura 4.7 revelen un increment significatiu de quatre vegades d'inducció el dia 4, i de 8 a 12 vegades d'inducció d'activitat luciferasa el dia 10 i 15 respectivament (Fig. 4.7).

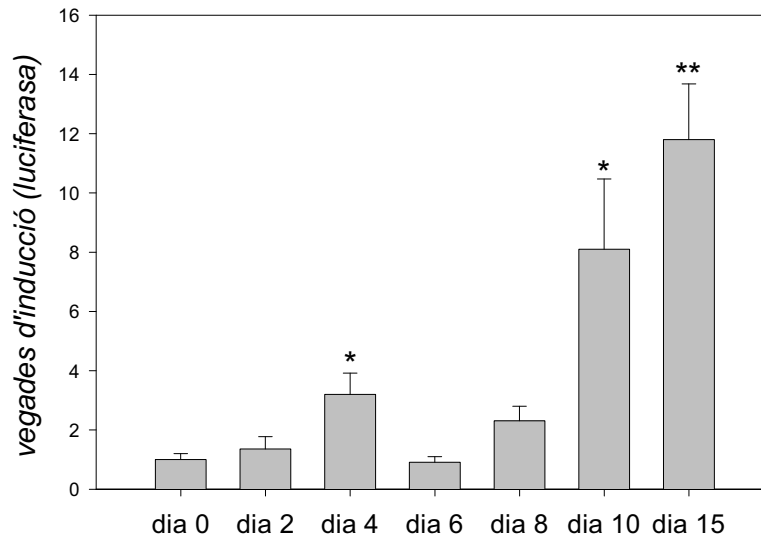


Figura 4.7. Estudi del promotor del gen *pfkfb3*. A través de la tècnica de transferència gènica per hidrodinàmica s'observen canvis estadísticament significatius els dies 4 ($p < 0.05$, *), 10 i 15 ($p < 0.01$, **) respecte al punt de dia 0 (control).

D'aquests mateixos punts de l'assaig de variació en el temps es va estudiar la seqüència de canvis del contingut hepàtic de la Fru-2,6-P₂ i lactat, i es va observar que la concentració de Fru-2,6-P₂ era significativament més elevada els dies 2, 6, 10 i 15, respecte el valor basal del dia 0. Mentre que la concentració de lactat incrementava moderadament fins el dia 6 i després disminuïa gradualment a partir del dia 8 fins el dia 15 (Fig. 4.8).

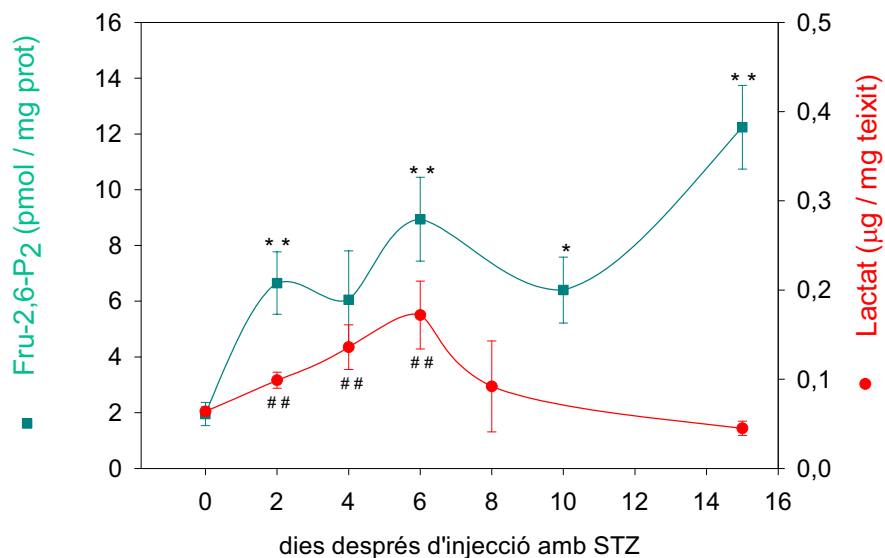


Figura 4.8. Variacions temporals del lactat i la Fru-2,6-P₂. S'obtenen canvis estadísticament significatius els dies 2, 4 i 6 pel lactat ($p < 0.01$, ##) i els dies 2, 6, 10 i 15 per la Fru-2,6-P₂ ($p < 0.05$, * i $p < 0.01$, **).

Tant les variacions en els nivells de proteïna, mRNA, regulació transcripcional com en la concentració de Fru-2,6-P₂, al llarg del temps, suggereixen un increment gradual de l'expressió del gen *pfkfb3* assolint el pic màxim el dia 15.

4.4. Les senyals proinflamatòries i l'estrès oxidatiu no són responsables de l'estimulació de la transactivació del gen *pfkfb3* en el fetge de ratolins diabètics

El següent pas que ens vàrem plantejar va ser el d'esbrinar qui podia estar produint aquest increment d'expressió del gen *pfkfb3*.

Tenint en compte que induïem diabetis amb estreptozotocina i que aquest compost augmenta els nivells de radicals lliures d'oxigen (ROS) intracel·lulars, ens vàrem plantejar estudiar la seva possible influència en la regulació del gen *pfkfb3*. A més a més, la hiperglucèmia crònica provoca un increment en la producció de ROS a partir de l'autooxidació de la glucosa i de la glicosilació proteica (Wolff and Dean, 1987; Hunt et al., 1990). Un dels efectes dels ROS és l'activació del factor NFκB (*nuclear factor κB*). Aquest factor de transcripció, sensible a l'estat redox, controla l'expressió de gens implicats en la resposta immunitària i inflamatòria (Ho et al., 2000). El factor NFκB s'expressa en el fetge, on regula la proliferació cel·lular i la supervivència durant la regeneració i el desenvolupament hepàtic (Arsura and Cavin, 2005). Per tots aquests motius es va voler analitzar si NFκB podia ser el responsable de la transactivació del gen *pfkfb3* en el model de diabetis.

Per avaluar la possible implicació del factor NFκB en l'expressió del gen *pfkfb3* en el fetge dels ratolins diabètics, es va analitzar la presència d'aquest factor amb la tècnica de retardament en gel. Utilitzant una sonda específica que correspon a la seqüència consens per aquest factor de transcripció. Després de dur a terme un assaig de variació temporal del tractament amb STZ, vàrem obtenir mostres dels dies 0, 4, 8 i 15 i se'n va analitzar l'extracte nuclear. Inesperadament, a cap dels punts obtinguts de l'assaig en el temps es va observar la interacció amb l'oligonucleòtid fosforilat de NFκB (Fig. 4.9). Indicant que no hi havia presència d'aquest factor a cap de les mostres.

Per a corroborar els resultats obtinguts es va voler determinar per *western blot* si es produïa l'activació d'un dels gens diana del factor NFκB, la sintasa induïble d'òxid nítric (iNOS). Els resultats van indicar que aquest gen no es trobava activat en els animals tractats amb STZ a cap dels temps avaluats.

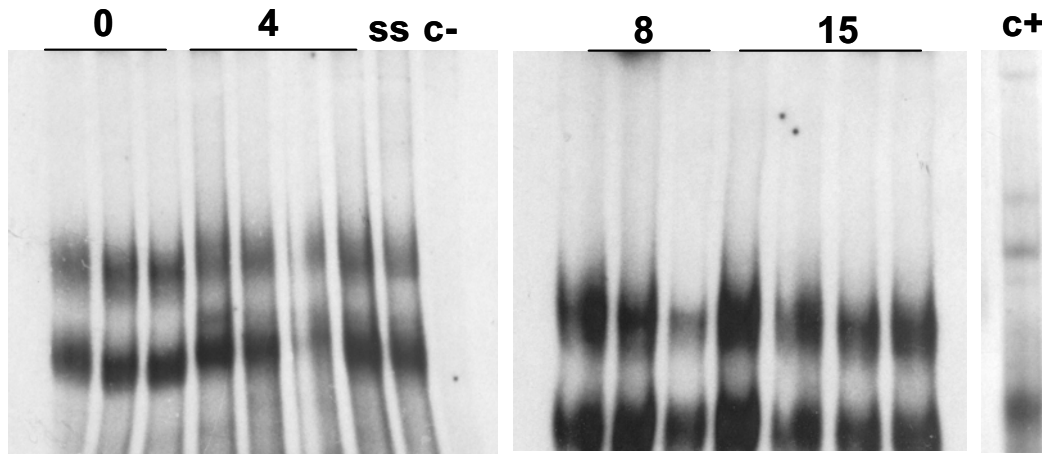


Figura 4.9. Anàlisi de l'estrès oxidatiu en ratolins diabètics. Per a demostrar la possible implicació del factor NF κ B en l'expressió del gen *pfkfb3* es va realitzar la tècnica de retardament en gel analitzant els extractes nuclears de fetge de ratolí diabètic en condicions de dejuni. Es va utilitzar la sonda marcada amb 32 P corresponent a la seqüència consens de NF κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'). Cap carril (dia 0, 4, 8 ni 15) mostra la presència del factor de transcripció. Com a control positiu (c+) es va utilitzar un extracte de cèl·lules de neuroblastoma humà (SHSY5Y). El súper retardament realitzat utilitzant l'anticòs contra la subunitat p65 de NF κ B tampoc mostra detecció (ss).

Encara que els resultats obtinguts demostren la no implicació del factor NF κ B en la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*, vàrem voler avaluar una possible participació d'aquest factor en la transcripció del gen en un model *in vitro*. Així, es va analitzar l'expressió de proteïna uPFK-2, per *western blot*, en un model cel·lular de macròfags de ratolí el qual no presentava activació del factor NF κ B. Disposàvem de la línia cel·lular salvatge (RAW 264.7), que per tractament amb LPS expressava un NF κ B actiu, i de la línia RAW κ B α DA, la qual sota el mateix tractament no activava NF κ B. Es va utilitzar com a control positiu la proteïna iNOS (diana de NF κ B). A les cèl·lules RAW 264.7, l'expressió de iNOS incrementa gradualment després de 8, 16 i 24 hores de tractament amb LPS (Fig. 4.10), per mitjà del factor NF κ B. Per altra banda, no es detecta l'expressió d'aquest marcador a les cèl·lules κ B α dominant actives després del mateix tractament amb LPS. Els nivells d'enzim uPFK-2 es van mantenir constants tant en presència com en absència de LPS (Fig. 4.10) en els dos tipus cel·lulars estudiats. Aquests resultats semblen indicar que no es dona una implicació directa del factor NF κ B en la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*.

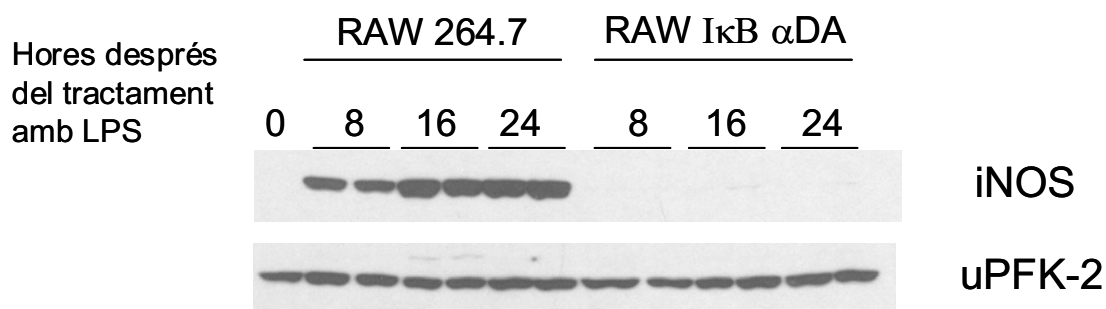


Figura 4.10. Western blot d'uPFK-2 en cèl·lules RAW 264.7 i RAW IκBα DA. Les cèl·lules es van tractar durant 8, 16 i 24 hores amb l'agent proinflamatori LPS (1 μg/ml). S'utilitza com a control positiu la proteïna iNOS. La quantificació proteica s'utilitza com a control de càrrega.

Per tal de descartar la implicació de l'estrès oxidatiu en el model de diabetis emprat, es van determinar les activitats TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) (Fig. 4.11. A) i catalasa (Fig. 4.11. B). Cap canvi significatiu es va observar en les mostres obtingudes 15 dies després de la injecció amb STZ, suggerint que l'estrès oxidatiu no està implicat en les alteracions metabòliques observades.

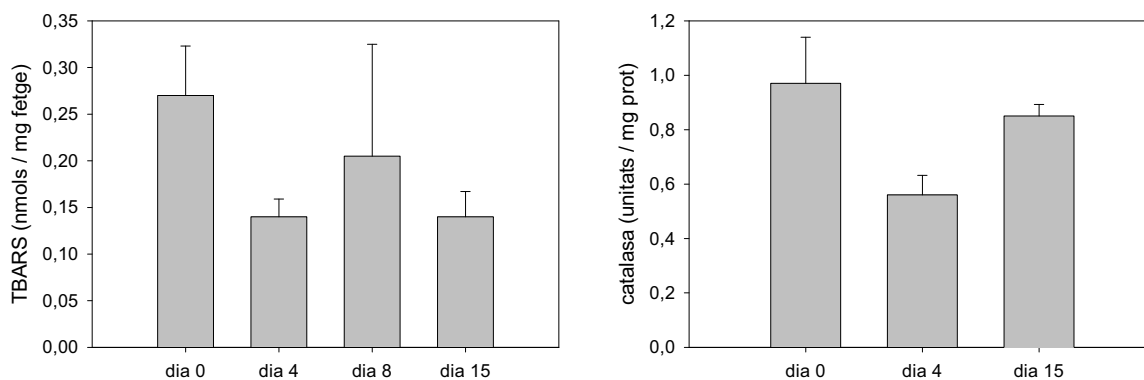


Figura 4.11. Determinació de les activitats TBARS i catalasa. A) Concentració de TBARS en un assaig de variació temporal. Els resultats s'expressen en nmols/mg de fèrge. B) L'activitat catalasa es determina els dies 0, 4 i 15 de l'assaig de variació en el temps. Els resultats s'expressen com a unitats de catalasa/mg de proteïna.

4.5. Creixement i proliferació cel·lular en el fetge de ratolins diabètics

Després del tractament amb STZ, un nombre elevat de les cèl·lules del fetge diabètic es troben en fase G2 del cicle cel·lular quan es comparen amb les cèl·lules de fetge no diabètic (Shankar et al., 2003). Sabent que l'augment d'uPFK-2 en el fetge diabètic no és degut a l'acció directa d'agents implicats en la resposta a estrès

oxidatiu, vàrem estudiar diferents factors de proliferació i creixement cel·lular, conseqüència, moltes vegades, de senyals d'estrès inicials.

En el nostre laboratori teníem accés a diferents anticossos contra factors implicats en la proliferació cel·lular d'hepatòcits. Per una banda, la proliferació dels hepatòcits pot ser deguda a la resposta a diferents factors de creixement i a factors autocrins on hi està involucrada la via de senyalització de la PI3K (Band et al., 1999; Coutant et al., 2002; Cho and Kim, 2003; Wang et al., 2004). Diferents estudis mostren el paper predominant de PI3K i mTOR en la replicació del DNA i l'activació de la Ciclina D (Band et al., 1999; Coutant et al., 2002). L'activació d'aquesta via promou la progressió de la fase G1/S i la síntesi de DNA, i per estudiar-la es va avaluar tant la fosforilació d'Akt en la serina 473 com la presència de Ciclina D. A més a més, per avaluar si mTOR està activat en aquest model es va analitzar la presència de p70S6K, una de les dianes més estudiades de mTOR i essencial per a la traducció del mRNA a proteïna (Wullschleger et al., 2006).

Per altra banda, s'ha especulat, que a la diabetis *mellitus* tipus I, l'Akt també pot estar sota control de quinases activades degut a estrès oxidatiu, com la p38 (Zdychova and Komers, 2005). Recentment s'ha demostrat que la p38 MAPK funciona com un sensor de l'estrès oxidatiu durant l'iniciació de la formació de tumors (Dolado et al., 2007). Per tant, en el nostre model també vàrem voler analitzar la p38 fosforilada i la seva relació amb l'Akt.

Un altre família de factors de transcripció implicada en proliferació i desdiferenciació d'hepatòcits és la família de *CCAAT/enhancer binding protein* (c/EBP). En el nostre model hem estudiat una isoforma del factor de transcripció c/EBP β implicada en la proliferació dels hepatòcits, *liver activator protein* (LAP), i també el factor c/EBP α , que està involucrat en la parada del cycle cel·lular (Cho and Kim, 2003). c/EBP α és necessari per a la inhibició del creixement hepàtic però l'activitat inhibidora d'aquest factor es pot bloquejar a cèl·lules d'hepatoma i en tumors de fetge per la via de senyalització PI3K/Akt. Quan aquesta via s'activa en els tumors de fetge provoca l'acumulació de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) en el nucli cel·lular, on defosforila la Ser-193 del factor c/EBP α . Aquesta defosforilació no tant sols bloqueja la inhibició del creixement cel·lular, sinó que activa la proliferació segregant la proteïna Rb i alliberant, així, E2F (Wang and Timchenko, 2005). L'alliberació d'E2F també la pot portar a terme la Ciclina D. Per això, en el nostre model vàrem analitzar, l'augment d'expressió dels factors c/EBP α , c/EBP β (LAP) i E2F-1.

Amb tots aquestes referències presents, vàrem realitzar un *western blot* del fetge del ratolins a dia 0, 4, 8 i 15 després de l'exposició a STZ. Vàrem observar l'increment d'expressió d'aquests factors en diferents temps. Tal i com es mostra a la figura 4.12, a dia 4 es detecta un increment d'expressió de P38 fosforilat. A dia 4 i mantenint-se fins a dia 15 també s'observa increment d'expressió d'Akt fosforilat a la Ser-473. Per la P70S6K l'augment d'expressió es detecta a dia 4 i 8 i pel que fa a la família de factors de transcripció c/EBP, es detecta una disminució de c/EBP α a partir de dia 8 i un increment de c/EBP β a dia 15.

Tal i com s'esperava, la Ciclina D i l'E2F-1, tots dos relacionats amb cèl·lules proliferants, es varen trobar sobreexpressats en aquestes mostres a partir del dia 8, com també passa amb el nostre enzim d'estudi uPFK-2.

Aquests resultats demostren que, en ratolins diabètics els marcadors de proliferació i creixement cel·lular com Akt, Ciclina D, E2F-1 i inclús p70S6K segueixen un patró d'increment dels nivells de proteïna semblants als de l'enzim uPFK-2.

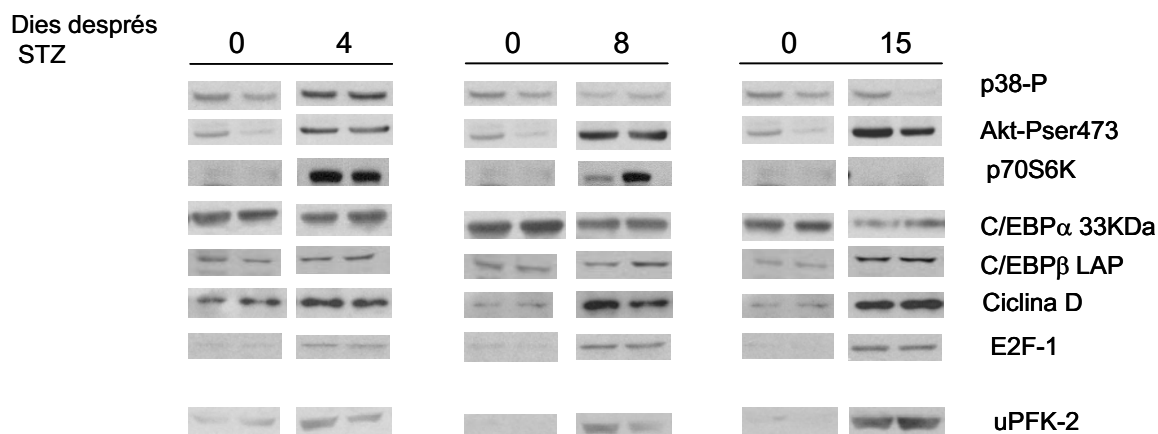


Figura 4.12. Anàlisi de diferents marcadors de creixement i proliferació cel·lular en el fetge de ratolins diabètics. *Western blot* d'extractes totals de fetges de ratolins en els dies assenyalats després de l'administració de STZ i després d'un període de 10 hores de dejuni.

4.6. La inhibició de la via PI3K/mTOR disminueix l'expressió de la uPFK-2 en hepatòcits primaris proliferants de rata

Tenint en compte els diferents marcadors de proliferació que poden intervenir en la regulació del gen *pfkfb3*, vàrem pensar que l'ús d'inhibidors d'aquests diferents

factors podria ser una bona metodologia per a centrar l'estudi en una via concreta de senyalització. Vàrem creure que un bon sistema per a portar a terme aquest estudi *in vitro* era el cultiu d'hepatòcits primaris.

Els hepatòcits primaris de rata plantats a plats de col·lagen presenten una ràpida proliferació i desdiferenciació, progressant a fase G1, independentment de l'estimulació amb factors de creixement, fins al punt de restricció localitzat al mig-final d'aquesta mateixa fase G1. Després de l'estimulació mitogènica, l'hepatòcit progressa cap a la fase tardana de G1 i segueix cap a la síntesi de DNA (Coutant et al., 2002). Una xarxa complexa de cascades de transducció de senyals participa en la regulació de la proliferació cel·lular i supervivència de l'hepatòcit, incloent PI3K, MEK/ERK i p38.

Hepatòcits de rata aïllats es van tractar amb diferents inhibidors de les vies de senyalització esmentades, abans de ser plantats en plats de col·lagen. Es van mantenir en medi suplementat amb 10% de FBS, per tal de promoure la proliferació cel·lular, i amb diferents inhibidors. 24 hores després del tractament les cèl·lules es van recollir i es va analitzar per *western blot* els diferents efectors de les cascades de senyalització abans esmentades.

Tal i com es mostra a la figura 4.13, només els inhibidors de les vies de PI3K i mTOR, LY 294002 i rapamicina, respectivament, van mostrar una disminució d'un 20% dels nivells de uPFK-2, respecte la inducció de cèl·lules no tractades. També es detecta una disminució de la Ciclina D en les mateixes condicions. La inhibició de la via PI3K i mTOR es confirma amb la desaparició de p70S6K i Akt-P.

L'ús de l'inhibidor de p38, SB 203580, inhibeix l'expressió de p38 i la d'Akt-P, però no actua disminuint l'expressió d'uPFK-2. Tampoc es detecta quan s'utilitza PD 98059, inhibidor d'ERK.

L'expressió constant de la caspasa 3 en els extractes d'hepatòcits cultivats amb els diferents inhibidors ens indica que no hi ha un augment de l'apoptosi en cap de les condicions. Justificant, així, que la disminució de l'enzim uPFK-2 no és deguda a un augment de mort cel·lular.

Amb els resultats obtinguts fins al moment, podríem indicar que l'augment observat de l'expressió de *pfkfb3* als fetges de ratolins diabètics en dejuni és degut, en part, a senyals de proliferació i creixement cel·lular i per mitjà de la via de senyalització PI3K/mTOR.

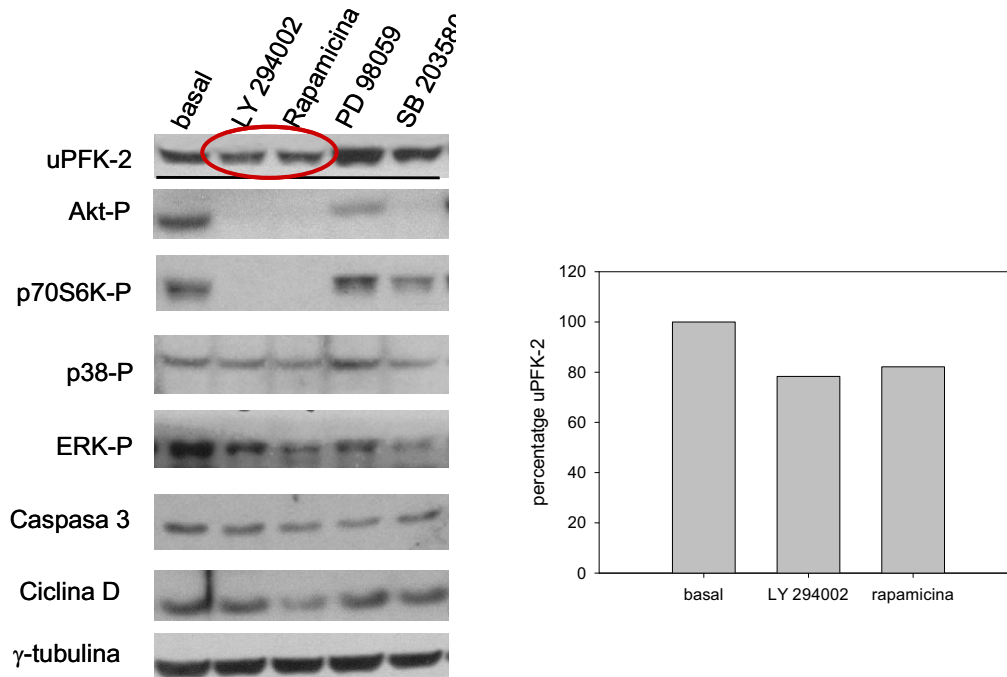


Figura 4.13. Expressió d'uPFK-2 en un sistema de proliferació d'hepatòcits primaris després d'utilitzar diferents inhibidors de vies de transducció de senyals. *Western blot* representatiu d'extractes totals d'hepatòcits primaris contra uPFK-2. Abans i després de plantar els hepatòcits, aquests es van tractar amb diferents inhibidors. 50 μ M LY 294002, 50 nM Rapamicina, 50 μ M PD 98059 i 10 μ M SB 203580 que inhibeixen PI3K, mTOR, ERK i p38 respectivament. També es va analitzar l'estat d'apoptosi cel·lular amb la caspasa 3. Es va utilitzar com a control de càrrega la γ -tubulina.

4.7. La proteïna uPFK-2 es localitza, preferentment, a la zona perivenosa del fetge diabètic

Un factor important a tenir en compte alhora de valorar qui pot estar regulant la transcripció del gen *pfkfb3* en els animals diabètics és la localització d'aquest en el fetge. És essencial que els efectors finals de la via de senyalització PI3K/mTOR estiguin situats a la mateixa zona que el gen *pfkfb3*. Per aquest motiu el primer que vàrem realitzar va ser estudiar la localització hepàtica del gen *pfkfb3*.

Els hepatòcits que formen cada lòbul hepàtic es poden dividir en dues subpoblacions, depenent de la localització i circulació dels vasos sanguinis; la zona periportal (envolta la triada portal, figura 4.14) i la zona perivenosa (envolta la vena central, figura 4.14) (Jungermann, 1995; Jungermann and Kietzmann, 1996). Molts enzims intermediaris del metabolisme presenten una distribució zonal als lòbuls hepàtics, expressant-se preferentment a la regió periportal o a la perivenosa

(Gebhardt, 1992; Jungermann and Kietzmann, 1996). Així doncs, els hepatòcits que es localitzen a una o altre regió tindran funcions diferents o complementàries. Els enzims glucolítics, per exemple, es presenten en un gradient d'intensitat superior als hepatòcits perivenosos, mentre que els enzims claus de la gluconeogènesi s'expressen preferentment als hepatòcits periportals (Jungermann and Katz, 1989).

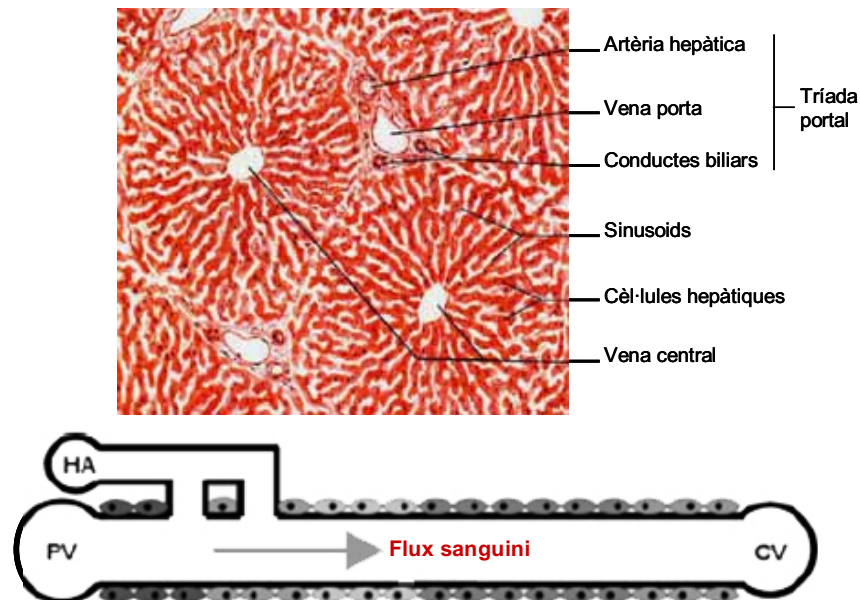


Figura 4.14. Esquema dels lòbuls hepàtics i del flux sanguini entre la vena porta i la vena central. La triada portal forma la regió periportal, mentre que la zona de la vena central donaria nom a la zona perivenosa. El flux sanguini segueix la direcció de vena porta a vena central. Essent més oxigenada la zona periportal que la perivenosa.

Per exemple, el mRNA del gen glucolític *pfkfb1* es localitza als hepatòcits perivenosos mentre que el gen que codifica per l'enzim fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (gluconeogènica) es troba principalment als hepatòcits periportals (Braeuning et al., 2006), confirmant resultats enzimàtics obtinguts prèviament pel grup de Jungermann (Jungermann, 1995; Jungermann and Kietzmann, 1996).

Per tal d'estudiar la localització del gen *pfkfb3* es varen preparar mostres per a un anàlisi d'immunohistoquímica de fetges de ratolins diabètics després de 15 dies de la injecció de STZ. Aquests ratolins s'havien transfectat prèviament per hidrodinàmia amb la proteïna fluorescent GFP (*green fluorescent protein*), per tal de veure el marcatge dels hepatòcits perivenosos i utilitzar-ho com a control positiu (Gomez-Valades et al., 2006). Els resultats obtinguts mostren clarament l'expressió de l'enzim uPFK-2 en aquest model de ratolí diabètic i el predomini d'aquest enzim a la zona perivenosa (Fig. 4.15). L'estudi detallat dels hepatòcits perivenosos positius en uPFK-2

manifesta una clara organització en forma d'agregats, semblant al patró descrit per PCNA (marcador de proliferació) en els fetges de ratolins diabètics després de 5 i 10 de la injecció amb STZ (Shankar et al., 2003).

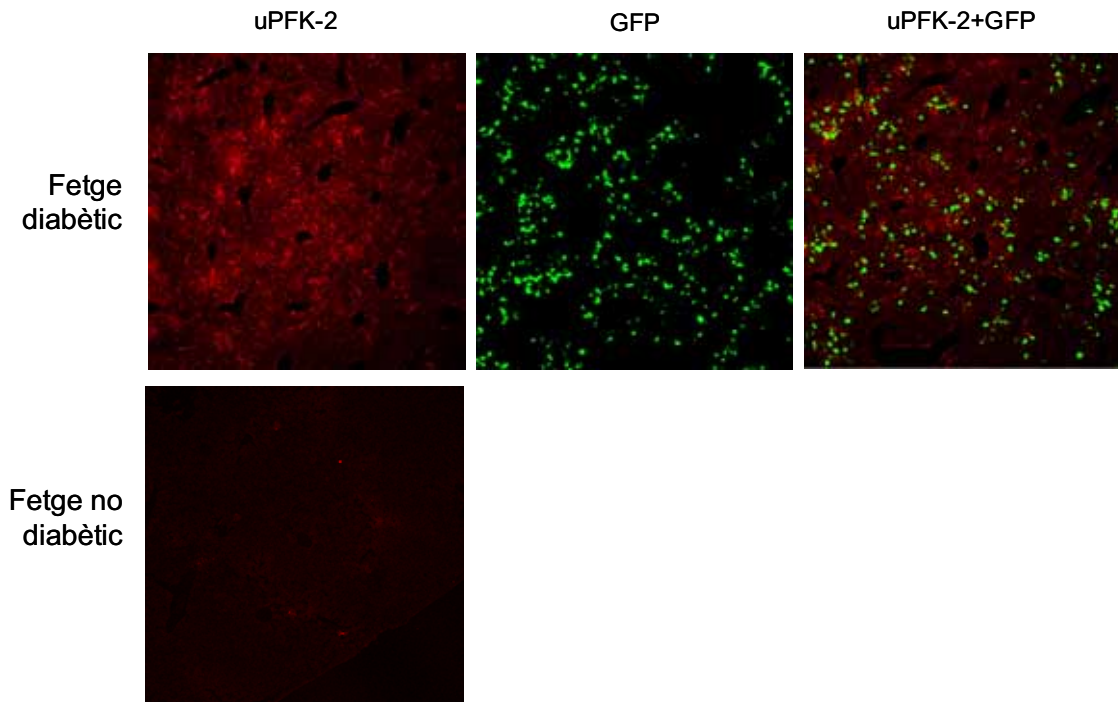


Figura 4.15. Anàlisi immunohistoquímic de l'expressió de l'enzim uPFK-2 en fetges de ratolins diabètics en condicions de dejuni. Es va transfectar GFP als ratolins com a control positiu de localització perivenosa. La dilució d'anticòs utilitzat contra uPFK-2 és de 1:10. Al fetge control no es va localitzar uPFK-2, mentre que en els animals diabètics es pot veure que els agregats d'hepatòcits perivenosos contenen uPFK-2 sobreexpressada.

Els marcadors de proliferació que s'han vist sobreexpressats en el nostre model de diabetis són la Ciclina D i E2F-1 (efectors de la via PI3K/mTOR). Vam utilitzar les mateixes mostres de fetge per a veure la localització d'aquests factors. Tant la Ciclina D com E2F-1 s'expressen en el fetge diabètic formant agregats d'una manera semblant a la que s'observa per l'enzim uPFK-2.

Els resultats obtinguts demostren que el gen *pfkfb3* s'expressa de forma majoritària a la regió perivenosa dels lòbuls hepàtics i que la seva sobreexpressió forma agregats semblants als descrits per PCNA o els observats per a Ciclina D i E2F-1 (Fig. 4.16).

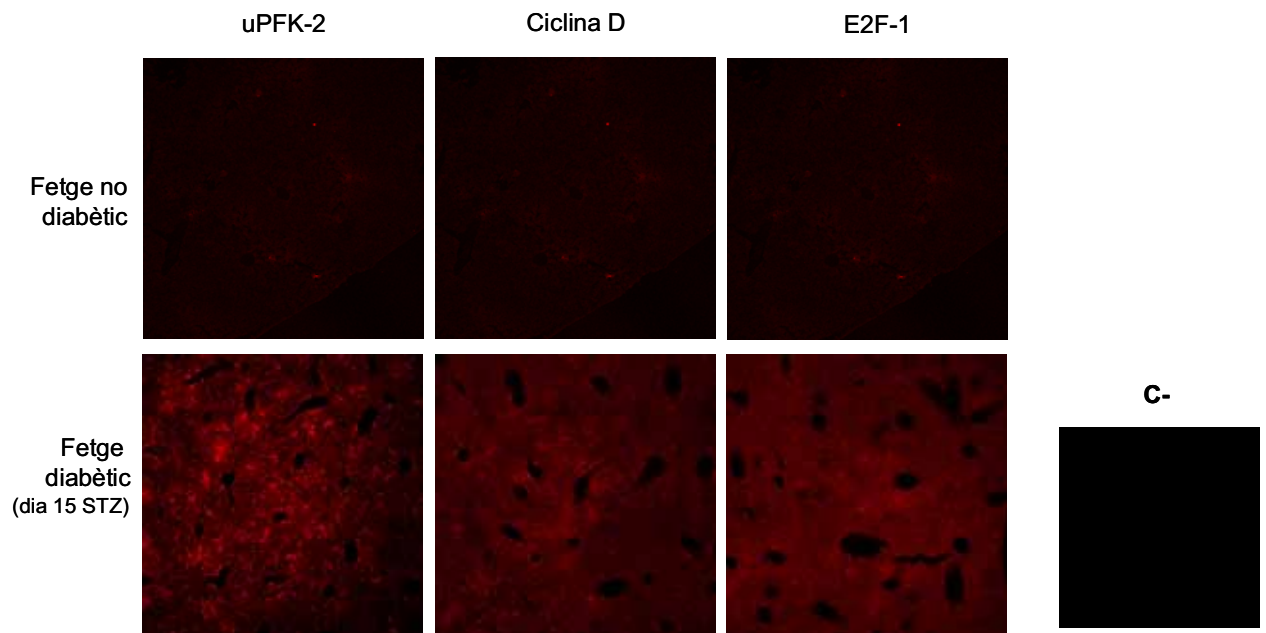


Figura 4.16. Talls de fetge de ratolins control i diabètics contra Ciclina D, E2F-1 i uPFK-2. Les dilucions dels anticossos són 1:50, 1:50 i 1:10, respectivament. Com a control negatiu s'utilitza un tall exposat enfront d'anticossos primaris però no de secundari. S'observa una sobreexpressió tant dels marcadors de proliferació com d'uPFK-2 en els hepatòcits agregats.

DISCUSSIÓ

El fetge és un òrgan necessari per a mantenir l'homeòstasi de la glucosa en sang. Durant el dejuni, a part de l'activació de la glucogenòlisi, els hepatòcits sintetitzen glucosa via gluconeogènesi utilitzant diferents substrats. Una de les característiques de la diabetis és l'excessiva gluconeogènesi hepàtica que contribueix a la hiperglucèmia, la qual, quan esdevé crònica s'associa amb l'hepatomegàlia observada a pacients diabètics (joves i adults), tot i seguir un tractament amb insulina (Herrman et al., 1999).

Un model animal experimental per a estudiar la diabetis es pot produir amb l'ús STZ, un tòxic que destrueix preferentment les cèl·lules β -pancreàtiques (Szkudelski, 2001). Les rates diabètiques tractades amb el tòxic presenten hepatomegàlia, la qual inclou hipertròfia, proliferació dels hepatòcits i la disminució de l'apoptosi (Herrman et al., 1999). A més a més, s'ha demostrat que el ratolí diabètic pateix un dany hepàtic molt inferior als ratolins controls quan aquests es tracten amb diferents hepatotòxics, suggerint que els ratolins diabètics tenen un sistema de reparació molt robust en aquesta situació experimental (Shankar et al., 2003).

La fisiopatologia hepàtica en la diabetis, induïda per STZ, ha estat molt poc estudiada. Sabent que el gen *pfkfb3* està involucrat en processos proliferatius i que participa en la regulació del metabolisme de carbohidrats es va voler analitzar si aquest gen podria tenir una implicació en l'hepatomegàlia descrita en la diabetis.

Els resultats presentats mostren una clara sobreexpressió de l'isoenzim uPFK-2 en el fetge de ratolins diabètics, 15 dies després de l'administració de STZ. Aquesta troballa s'ha corroborat amb l'increment significatiu del mRNA del gen *pfkfb3* i de la concentració de Fru-2,6-P₂ en aquests mateixos animals i sota condicions de dejuni. Ens vam plantejar que aquest increment de proteïna i mRNA (a dia 15 post-injecció) podria ser degut a la regulació transcripcional del gen. Per a comprovar si l'augment de mRNA correlacionava amb una activació transcripcional del gen *pfkfb3*, es va haver de dissenyar un estudi de regulació del promotor *in vivo*, utilitzant la tècnica de transferència gènica per hidrodinàmica. Es va transferir el plasmidi d'expressió luciferasa, la transcripció del qual, està controlada pel fragment de promotor corresponent a la seqüència de -3566 nucleòtids de la regió 5', *pfkfb3*/-3566 (Obach et al., 2004). Els resultats obtinguts es van mesurar en el fetge dels animals injectats amb aquest plasmidi i demostraven que l'activitat luciferasa era significativament més elevada en el model de ratolins diabètics que en els controls no diabètics. Aquests resultats

demostren que la sobreexpressió del gen *pfkfb3*, observada en el fetge dels ratolins diabètics, està regulada a nivell transcripcional.

Després d'estudiar la variació de l'expressió de *pfkfb3* al llarg del temps vam concloure que hi ha un augment gradual de l'expressió proteica, del mRNA i de la regulació transcripcional del gen que esdevé màxima el dia 15 després del tractament amb STZ. Aquest augment correlaciona amb l'increment del seu producte Fru-2,6-P₂, però no amb l'acumulació de lactat citosòlic. Només s'observa l'increment de la concentració de lactat fins el dia 6. Aquesta concentració és necessària per a dur a terme la gluconeogènesi descrita en animals diabètics.

Amb aquests resultats a la mà, ens vàrem plantejar la implicació del factor NFκB com a possible candidat per a la regulació transcripcional del gen *pfkfb3* en aquests animals diabètics, ja que la STZ i la hiperglucèmia provoquen un increment en la producció de radicals lliures d'oxigen i glicosilació proteica (Wolff and Dean, 1987; Hunt et al., 1990). Els radicals lliures d'oxigen activen NFκB, el qual controla l'expressió de gens importants en la resposta inflamatòria i immunològica (Ho et al., 2000). El factor NFκB s'ha trobat expressat en hepatòcits on regula la proliferació i supervivència cel·lular durant la regeneració i el desenvolupament (Arsura and Cavin, 2005).

Les dades obtingudes no mostraven la presència de NFκB p65 en els extractes de fetge per retardament en gel, ni tampoc la regulació de *pfkfb3* en el model de cèl·lules RAW salvatge i RAW IκBαDA després de l'estimulació de NFκB amb LPS. Els nivells de la proteïna uPFK-2 es van mantenir constants en les dues línies cel·lulars i es van mostrar independents de l'absència o presència de LPS. Aquests resultats correlacionen amb les activitats de dos marcadors d'estrès oxidatiu com la catalasa i el TBARS, que no es van modificar.

És possible que NFκB, i altres marcadors d'estrès, activats per la STZ i/o la hiperglucèmia es puguin detectar en el nostre model just després de la injecció amb STZ o en condicions d'alimentació (una situació d'hiperglucèmia més severa), però el que sembla clar és que el factor NFκB no està implicat de forma directa en la regulació del gen *pfkfb3*, ja que la sobreexpressió significant i gradual dels nivells d'aquest enzim es detecten a partir de dia 6, arribant als valors més alts els dies 10 i 15 (post-injecció de STZ).

Hem pogut demostrar que l'augment progressiu d'uPFK-2 es veu acompanyat per l'activació de vies que recolzen la proliferació cel·lular hepàtica, posat de manifest

pels marcadors d'aquesta proliferació cel·lular i pels factors de transcripció involucrats en aquest fenomen. De tots els factors amb els què es va pensar inicialment, en podem descartar uns quants. Així, l'augment progressiu d'uPFK-2 probablement no sigui degut a la família de factor de transcripció c/EBP. Per una banda, l'increment que s'observa del factor c/EBP β (Fig. 4.12) es relaciona amb la regulació de la gluconeogènesis i la transcripció de la proteïna fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) en ratolins diabètic tractats amb STZ, participant, d'aquesta manera, en la hiperglucèmia de l'animal diabètic (Arizmendi et al., 1999). A més a més, per resultats obtinguts amb immunohistoquímica, sabem que aquest factor de transcripció s'expressa tant per zones perivenoses com periportals del fetge diabètic sense seguir el mateix patró d'expressió que segueix l'uPFK-2. Per altra, el factor c/EBP α és necessari per a la inhibició del creixement hepàtic. L'activitat inhibidora d'aquest factor es pot bloquejar a cèl·lules d'hepatoma i en tumors de fetge per la via de senyalització PI3K/Akt. Quan aquesta via s'activa en els tumors de fetge provoca l'acumulació de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) en el nucli cel·lular, on defosforila la Ser-193 del factor c/EBP α . Aquesta defosforilació no tant sols bloqueja la inhibició del creixement cel·lular, sinó que activa la proliferació segregant la proteïna Rb i alliberant, així, E2F (Wang and Timchenko, 2005). Tot podria fer pensar que aquesta via seria una bona candidata per l'activació del gen *pfkfb3*, però com s'observa a la figura 4.12 els nivells d'aquest factor disminueixen a partir de dia 8 post-injecció de STZ, quan, en condicions normals, la defosforilació de c/EBP α , no hauria de produir canvis en els nivells totals de proteïna (Wang and Timchenko, 2005).

També es pot descartar la implicació de p38, una quinasa activada per estrès (Zdychova and Komers, 2005). La p38 fosforilada està significativament incrementada en fetges de ratolins diabètics just una setmana després de la injecció del tòxic (Qiao et al., 2006). En aquest model, la p38 fosforilada està present en els extractes de fetge dels ratolins diabètics (dia 4 després del tractament amb STZ) i en els hepatòcits primaris de rata. Però, quan aquests últims es varen cultivar amb l'inhibidor de la p38, SB 203580, no es va observar disminució d'uPFK-2, mentre que si que es va constatar la inhibició gairebé total de l'Akt fosforilada a la Ser-473. Aquest fet confirma la hipòtesi prèviament formulada per Qiao i col·laboradors (Qiao et al., 2006), on es plantejava un vincle entre l'Akt i la p38 en hepatòcits de rata.

La proliferació dels hepatòcits com a resposta als factors de creixement i a l'hepatocarcinogènesi s'acompanya, en part, de l'activació de la via de senyalització PI3K i els seus efectors (Band et al., 1999; Coutant et al., 2002; Cho and Kim, 2003; Wang et al., 2004). Un dels factor de creixement expressat en el fetge en aquestes

condicions és IGF-I (Foulstone et al., 2005). A més a més, els nivells d'IGF-I estan incrementats en el fetge de ratolins tractats amb STZ (Jacobs et al., 1997). Els resultats presentats en aquest capítol demostren que també es produeix l'activació de la via PI3K durant el desenvolupament de la diabetis, confirmant l'elevada proliferació cel·lular que es produeix en aquesta patologia. Els fetges dels ratolins presenten gradualment una activació d'aquesta via, doncs es detecten elevats nivells d'Akt fosforilada en la Ser-473, els dies 4, 8 i 15 després de la injecció de STZ i també de p70S6K els dies 4 i 8, essencial per a la traducció del mRNA a proteïna (Fig. 4.12).

L'Akt promou la supervivència cel·lular per fosforilació directa de factors de transcripció que controlen l'expressió de gens pro i antiapoptòtics i també la progressió del cicle cel·lular per diferents mecanismes. A més a més, inhibeix la transcripció i la fosforilació dels inhibidors de les CDK. L'Akt estimula la síntesi proteica fosforilant mTOR, un element clau en aquest procés (Zdychova and Komers, 2005). mTOR també s'ha relacionat amb proliferació cel·lular a través de la fosforilació de p70S6K (Hay and Sonenberg, 2004). Addicionalment, s'ha vist que la fosforilació de la Ser-486 de la PFK-2 de cor per Akt és depenent de la via PI3K, indicant que altres isoenzims de la família PFK-2 estan regulats per aquesta mateixa via (Deprez et al., 1997; Pozuelo Rubio et al., 2003).

Tal i com es mostra en els resultats obtinguts, l'expressió d'uPFK-2 en hepatòcits tractats amb rapamicina (inhibidor de mTOR) i amb LY 294002 (inhibidor de la via PI3K) suggereix una possible activació d'uPFK-2 via PI3K/Akt/mTOR en aquest model. Aquests hepatòcits estan cultivats en presència d'un 10% de sèrum, i aquest conté múltiples factors que poden activar l'enzim uPFK-2 per diferents vies. En aquesta situació, els inhibidors emprats només disminueixen l'expressió d'uPFK-2 aproximadament un 20%. Però, resultats preliminars (treball en curs), ens demostren que la disminució d'aquest enzim és pràcticament total quan s'utilitza un factor de creixement que n'estimula la seva producció, en hepatòcits de rata. Aquest factor és EGF (*epidermal growth factor*) i la seva via d'actuació depèn de PI3K/Akt. Aquests resultats s'han obtingut tant per proteïna com per mRNA del gen *pfkfb3* i la mateixa inhibició també l'hem pogut observar per a la Ciclina D.

La Ciclina D està involucrada en la progressió del cicle cel·lular, en la síntesi de DNA i proliferació dels hepatòcits. Yamamoto i col·laboradors (Yamamoto et al., 2006) van publicar que l'activació de la via PI3K-Akt és essencial per la translació al nucli de la Ciclina D i que els senyals mitogènics n'estimulen la transcripció i la unió amb les CDK4/6. El complex Ciclina/CDK actiu fosforila Rb. Aleshores Rb allibera E2F-1 i

permet l'activació transcripcional de gens de fase S. Un dels gens que augmenta l'expressió en la transició G1/S del cicle cel·lular és el gen *pfkfb3* (Atsumi et al., 2002).

E2F-1 és un factor de transcripció que regula l'expressió de molts gens necessaris en la progressió del cicle cel·lular. Els fetges dels ratolins diabètics mostren una elevada proliferació i això es corrobora amb l'expressió d'E2F-1 en els extractes d'aquests animals els dies 8 i 15 després de la injecció de STZ.

Concordant amb aquests resultats podem veure l'expressió en forma d'agregats que s'observa per immunohistoquímica d'E2F-1 i Ciclina D, un patró semblant a un altre marcador de proliferació, el PCNA (Shankar et al., 2003). L'enzim uPFK-2, localitzat a la regió perivenosa, mostra el mateix tipus d'expressió. La formació d'agregats de 8 a 10 cèl·lules s'associa a la divisió cel·lular dels hepatòcits (Zimmermann, 2004).

Una possible hipòtesi de la via de senyalització que s'estaria portant a terme en els hepatòcits proliferants del fetge diabètic es mostra a la figura 4.17.

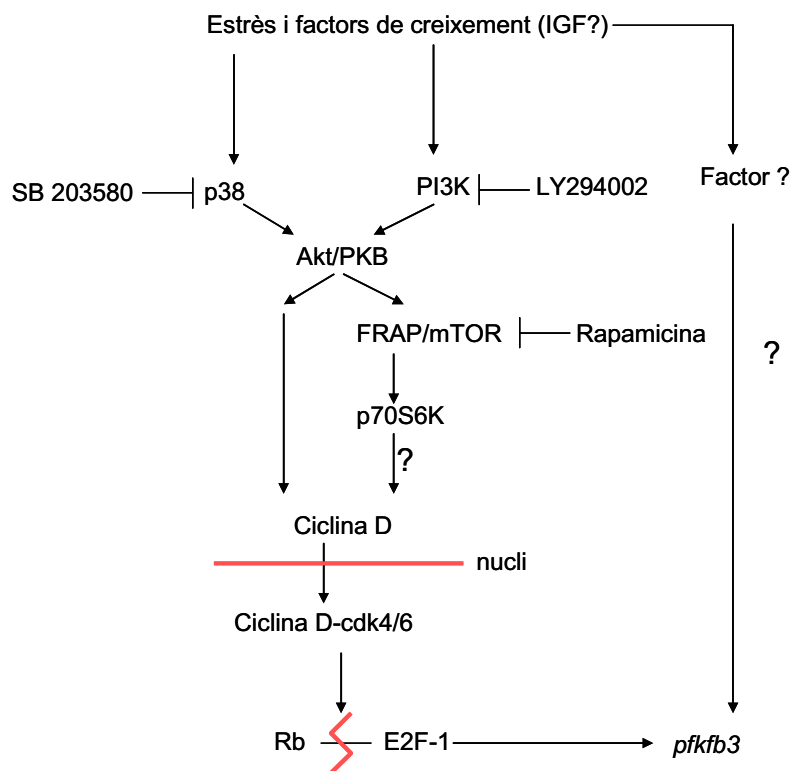


Figura 4.17. Esquema de la via hipotètica de senyalització de la proliferació cel·lular en el fetge de ratolins diabètics. (Coutant et al., 2002; Cho and Kim, 2003; Yamamoto et al., 2006). Un possible candidat per iniciar la cascada de senyalització que portarà a l'augment de la transcripció del gen *pfkfb3*, és IGF (*Insulin-like growth factor*). Per altra banda un altre factor desconegut també estarà augmentant la transcripció del gen *pfkfb3*, doncs no s'inhibeix totalment l'expressió d'uPFK-2 amb l'utilització de la rapamicina i de LY 294002, indicant que hi ha un factor, independent d'aquesta via, que coopera amb l'augment d'expressió del gen *pfkfb3*.

En resum, els ratolins diabètics per STZ i en condicions de dejuni, mostren nivells elevats de mRNA i proteïna del gen *pfkfb3*, conseqüència de la regulació transcripcional del seu promotor. Els nivells de Fru-2,6-P₂ demostren que la uPFK-2 sintetitzada és activa en aquestes condicions. Les dades obtingudes demostren que són les acumulacions d'hepatòcits perivenosos en proliferació les que sobreexpressen el gen *pfkfb3* i que aquest mostra una distribució semblant a la Ciclina D i E2F-1 (dos marcadors de proliferació). Els efectors superiors d'aquests dos marcadors són PI3K/Akt/mTOR i la inhibició d'aquesta via de senyalització provoca una disminució de l'expressió de *pfkfb3* i Ciclina D en hepatòcits primaris de rata.

DISCUSSIÓ GENERAL

Els resultats que es presenten en aquesta memòria aporten informació sobre la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*.

En primer lloc, hem localitzat els elements de resposta de HIF-1 al promotor del gen *pfkfb3* i hem observat que aquests eren essencials per a la resposta a la hipòxia en cèl·lules de glioblastoma humà (T98G) i en fibroblasts embrionaris de ratolí (mEF). Seguidament, hem corroborat la implicació de l'anàleg de progesterona Organon 2058 en la regulació del gen *pfkfb3*, que inicialment havien descrit Hamilton i col·laboradors (Hamilton et al., 1997). Hem posat de manifest l'augment d'expressió d'uPFK-2 i del seu mRNA en cèl·lules de càncer de mama (T47D) incubades amb el progestagen. A més a més, hem determinat que aquest increment era degut a l'acció dels receptors de progesterona (PR, *progesterone receptors*). Hem localitzat una possible seqüència consens per aquests receptors (PRE, *progesterone response element*) al promotor del gen *pfkfb3*, i hem demostrat el possible paper d'ORG en la regulació transcripcional d'aquest gen, tot i no descartar l'augment d'expressió del producte del gen *pfkfb3* per estabilització del seu mRNA.

Per comprovar els resultats obtinguts en cèl·lules aïllades, hem estudiat la regulació del gen *pfkfb3* *in vivo*, utilitzant com a model d'experimentació animal la soca de ratolins C57/BL6. Els hem tractat amb STZ i hem observat l'increment d'expressió del mRNA del gen *pfkfb3*, d'uPFK-2, i de la concentració de Fru-2,6-P₂ en el fetge de ratolins diabètics. Paral·lelament, hem realitzat l'estudi de la regulació transcripcional del promotor del gen *pfkfb3*, *in vivo*, utilitzant la tècnica de transferència gènica per hidrodinàmia. Els resultats obtinguts demostren l'augment de la transcripció del gen en el fetge dels ratolins diabètics en condicions de dejuni. A més, hem realitzat estudis immunohistoquímics dels fetges diabètics i controls, demostrant que l'expressió del gen *pfkfb3* es produeix principalment en els hepatòcits proliferants de la zona perivenosa del fetge dels ratolins diabètics. També hem estudiat les vies de senyalització que porten a l'augment d'expressió del gen *pfkfb3*, demostrant que la via PI3K/Akt/mTOR (activa en aquestes cèl·lules altament proliferants) hi té un paper essencial.

Aquests resultats obtinguts sobre la regulació del gen *pfkfb3*, juntament amb els que ja s'havien descrit (Hamilton et al., 1997; Chesney et al., 1999; Atsumi et al., 2002; Minchenko et al., 2002; Riera et al., 2002; Riera et al., 2003; Bando et al., 2005; Telang et al., 2006), ens confirmen la importància que pot tenir aquest gen en l'adaptació al fenotip glucolític de les cèl·lules proliferants o tumorals. El gen *pfkfb3* controla la síntesi de la Fru-2,6-P₂ que, com s'ha explicat a la introducció, és l'activador al·lostèric més potent de l'enzim PFK-1. El producte d'aquest gen, la uPFK-

2, té unes característiques cinètiques i reguladores que el fan idoni per mantenir alts fluxos glucolítics. Per tant, podem considerar que el gen *pfkfb3* és clau per a la regulació de la via glucolítica, de manera que el seu augment d'expressió en diferents tipus de cèl·lules proliferants i tumorals condueix a l'activació d'aquesta via i, consegüentment, afavoreix el canvi cap a un fenotip glucolític.

En aquest sentit, és fàcil preguntar-nos per què és important la glucòlisi en les cèl·lules tumorals?

Tenint en compte que la glucòlisi és bastant menys eficient que la fosforilació oxidativa, és interessant el fet que les cèl·lules canceroses adoptin aquesta via metabòlica per obtenir energia. L'anomenada glucòlisi aeròbica hauria d'atorgar avantatges a les cèl·lules canceroses per a què aquestes es decantin cap a la glucòlisi com a la via preferent de metabolisme energètic i, al mateix temps, els permeti proliferar. Els possibles avantatges serien:

- L'increment en la producció d'energia: l'augment de la glucòlisi quan la fosforilació oxidativa encara funciona en ple rendiment, provoca un increment en la producció d'energia. Encara que l'oxidació del piruvat a la mitocòndria és màxima, l'augment de conversió de glucosa a piruvat incrementaria la producció total de mols d'ATP i la concentració d'intermediaris biosintètics (Garber, 2004; Plas and Thompson, 2005). A més a més, aquest augment en el flux glucolític disminuirà el pH intracel·lular i extracel·lular degut a l'alta producció de lactat, causant apoptosi a les cèl·lules normals que expressen un p53 funcional (Williams et al., 1999).
- L'adaptació a la hipòxia: l'aport d'oxigen en els teixits tumorals pot estar limitat degut a la distància que hi ha entre les cèl·lules i els vasos sanguinis (Gatenby and Gillies, 2004), generant-se en molts casos, zones necròtiques a l'interior del tumor (Fig. 3). En aquest ambient, la respiració mitocondrial es veurà limitada per la manca de l'acceptor final d'electrons de la cadena respiratòria mitocondrial i les cèl·lules que tinguin la via glucolítica activada sobreviuran més fàcilment. Això vol dir que, per a sobreviure a aquest estat d'anaerobiosi, les cèl·lules tumorals han de ser capaces d'adaptar-se a la hipòxia. A més a més, la inhibició de l'oxidació de piruvat mitocondrial i el fre de la cadena respiratòria evitaran la producció de radicals lliures (ROS), que estaria altament afavorida en condicions d'hipòxia i d'entrada de substrats al cicle de Krebs.
- La resistència a l'apoptosi: l'hexoquinasa II, en situació de glucòlisi aeròbica, s'uneix a la membrana mitocondrial i confereix resistència a l'apoptosi (Mathupala et al., 2006).

Pfeiffer i col·laboradors (Pfeiffer et al., 2001) varen observar, utilitzant cèl·lules de diferents espècies estudiades en diferents condicions experimentals i models matemàtics, que en condicions on els nutrients no són un factor limitant les cèl·lules obtenen energia mitjançant la glucòlisi. El baix rendiment (només 2 mols d'ATP per mol de glucosa) quedaria compensat per l'elevada velocitat amb la què s'oxida la glucosa (unes 40 vegades més gran). És a dir, les cèl·lules obtindrien energia a partir de la fermentació (ràpida producció d'ATP, baix rendiment) comportant-se de forma autònoma, independent i sense cooperar. En canvi, en condicions amb deficiència de glucosa, les cèl·lules tendeixen a unir-se i respirar. Probablement, aquest tipus de comportament cooperatiu podria ser l'origen de la multicel·lularitat, d'acord amb els autors (Pfeiffer et al., 2001).

El primer en descriure l'increment de la glucòlisi a les cèl·lules tumorals i la conversió del piruvat citosòlic a lactat, tot i la presència d'oxigen, va ser Otto Warburg. Aquest fenomen es coneix com "efecte Warburg" (Warburg, 1930). Warburg es pensava que l'augment de la glucòlisi era degut a defectes a nivell mitocondrial (Warburg, 1956) sense tenir en compte que aquest increment es podia estar produint per a un benefici de la pròpia cèl·lula i no degut a un dany a la mitocòndria. Encara ara, l'efecte Warburg és motiu de debat, però es pot afirmar que aquest efecte es porta a terme gràcies a un conjunt de canvis cel·lulars, com són: l'adaptació a la hipòxia, la senyalització per oncògens, l'expressió anormal d'alguns enzims metabòlics o la disminució de la respiració mitocondrial (Pelicano et al., 2006).

Les cèl·lules canceroses, en general, viuen en condicions d'hipòxia des de que el tumor comença a assolir unes dimensions determinades (Dang and Semenza, 1999). Durant la hipòxia, les cèl·lules adquireixen un fenotip glucolític per tal de satisfer les seves necessitats energètiques, doncs la mitocòndria no pot accedir a l'oxigen necessari per a portar a terme la fosforilació oxidativa. Aquesta elevada taxa glucolítica permet, a les cèl·lules, equilibrar la seva demanda energètica i, també, facilitar els precursors anabòlics per a la síntesi de nucleòtids. Però, per altra banda, el pas de piruvat a lactat al citosol de la cèl·lula provoca una disminució del pH intracel·lular i extracel·lular produint apoptosi a les cèl·lules diferenciades del teixit hoste que expressen un p53 funcional (Williams et al., 1999).

Una de les proteïnes necessàries per a adquirir aquest fenotip glucolític durant la hipòxia és el factor de transcripció HIF-1 (factor induïble per hipòxia), el qual indueix l'expressió de gens involucrats en eritropoesi, angiogènesi, supervivència i

metabolisme anaeròbic (Wang and Semenza, 1993b; Semenza, 2003; Salceda and Caro, 1997). Respecte aquest últim, els gens diana de HIF-1 codifiquen per a transportadors de glucosa (Glut-1 i Glut-3), i per enzims glucolítics com l'aldolasa A i C, l'enolasa 1, l'hexoquinasa 1 i 3, la lactat deshidrogenasa A, la fosfoglicerat quinasa 1, la fosfoglicerat mutasa B i per la família d'enzims bifuncionals, PFK-2/FBPasa-2 (Semenza et al., 1994; Minchenko et al., 2002; Gonzalez-Cinca et al., 2003; Minchenko et al., 2003). L'activació d'aquests gens provoca un increment de l'activitat glucolítica, però el paper de HIF-1 en aquest canvi de fenotip no acaba aquí. Aquest factor de transcripció també participa en la disminució de la respiració mitocondrial, (Kim et al., 2006a; Papandreou et al., 2006). HIF induïx l'expressió de PDK-1 (*pyruvate-dehydrogenase kinase 1*) la qual, al seu temps, inhibeix l'activitat de la piruvat deshidrogenasa, fosforilant la seva subunitat E1. D'aquesta manera, a les cèl·lules hipòxiques, es limita l'entrada del piruvat al cicle de Krebs i aquest s'acumula en el citosol i es converteix a lactat per la lactat deshidrogenasa (LDH). Aquest lactat s'allibera a l'espai extracel·lular, regenerant el NAD⁺ i permetent una glucòlisi continuada.

La inhibició de la piruvat deshidrogenasa a través de la fosforilació induïda per la PDK-1 atenua no només la respiració mitocondrial, sinó també la producció de radicals lliures (Kim et al., 2006a; Papandreou et al., 2006). Aquest bloqueig, dependent de HIF-1, de l'oxidació del piruvat mitocondrial promou la supervivència cel·lular especialment quan la falta d'oxigen és severa i prolongada.

El factor de transcripció HIF-1 estarà, per tant, participant en l'adaptació de les cèl·lules tumorals cap al fenotip glucolític augmentant, per una banda, l'expressió d'enzim glucolítics i de transportadors de glucosa, i per altra banda disminuint l'oxidació de piruvat amb l'activació de la PDK-1.

Un altre factor que també intervé en aquesta adaptació de fenotip glucolític en situacions d'hipòxia és la quinasa activada per AMP (AMPK), veritable sensor intracel·lular d'energia, el qual es troba conservat en totes les cèl·lules eucariotes (Hardie, 2004). L'AMPK s'activa com a conseqüència de la disminució intracel·lular d'ATP i l'augment d'AMP, com passa durant la hipòxia o en situacions on l'aport de nutrients és limitat, o bé a través d'altres quinases com LKB (Liang et al., 2007). La seva activació provoca la fosforilació de proteïnes involucrades en el control del metabolisme energètic (Hardie, 2004) i en la parada del cicle cel·lular (Jones et al., 2005). Aquest sensor d'energia, en situació d'hipòxia, també fosforila el producte del gen *pfkfb3*, iPFK-2, incrementant els nivells de Fru-2,6-P₂ i conseqüentment regulant la

glucòlisi (Marsin et al., 2002). S'ha demostrat que la pFK-2 es troba majoritàriament fosforilada en cèl·lules tumorals (Bando et al., 2005).

L'activació d'AMPK en ambients de baixa pressió d'oxigen o en ambients isquèmics pot ser un mecanisme essencial per la supervivència cel·lular, ja que representaria un mecanisme protector per a les cèl·lules en situació d'estrés. L'AMPK i HIF-1 actuarien conjuntament en situacions d'hipòxia per tal de mantenir un balanç energètic adequat i adaptar les cèl·lules en aquestes condicions.

És evident, però, que no totes les àrees tumorals que tenen una elevada glucòlisi estan sota un ambient hipòxic (Rajendran et al., 2004). Hi ha d'haver altres mecanismes reguladors que induïxin aquest fenotip glucolític, independentment de la falta d'oxigen, ja que molts enzims glucolítics i transportadors de glucosa s'han identificat en cèl·lules tumorals que estaven sota una pressió d'oxigen normal. Aquest fet pot ser degut, per una banda, a la inducció de la síntesi proteica de la subunitat HIF-1 α per factors de creixement, mitjançant la via de transducció de senyals PI3K/Akt (Semenza, 2002) o per la disminució de la degradació de la subunitat α degut a la inactivació de la proteïna VHL. La proteïna VHL, en condicions normals, condueix la subunitat α a la degradació per proteosoma (Semenza, 2003).

Per altra banda, diferents oncògens poden activar la via glucolítica directament. Tal i com s'ha esmentat en la introducció, l'oncogen Ras pot augmentar el transport de glucosa i la glucòlisi en cèl·lules transformades (Mazurek et al., 2001). Un dels mecanismes que utilitza per assolir aquest augment, és l'activació de la PFK-1 (Kole et al., 1991b). Però, tot i la seva activació, és necessària la presència d'pFK-2, producte del gen *pfkfb3*, pel control d'aquest flux glucolític (Telang et al., 2006).

L'activació de Myc també s'ha comprovat que incrementa la glucòlisi sense la necessitat d'un ambient hipòxic. Tot i que pot induir l'expressió de la majoria d'enzims glucolítics, fins al moment, només s'han identificat seqüències consens per l'oncogen al promotor dels gens: enolasa 1, hexoquinasa II i lactat deshidrogenasa A (Kim et al., 2004).

Un altre oncogen capaç de promoure el fenotip glucolític independentment de HIF, és Akt. Per una banda Akt mobilitza els transportadors de glucosa cap a la membrana cel·lular i per altra senyala a l'hexoquinasa II que s'uneixi a la membrana mitocondrial (Bustamante and Pedersen, 1977). La unió de l'hexoquinasa II a la membrana mitocondrial provoca que aquest enzim sigui menys sensible a la inhibició per Glu-6-P, i ajuda a proveir ATP citosòlic al *mitochondrial adenine nucleotide translocator 2* (ANT2), el qual catalitza l'intercanvi d'ADP/ATP a través de la membrana mitocondrial. D'aquesta manera es manté el potencial de la membrana

mitocondrial, evitant la sortida de citocrom C i conseqüentment l'apoptosi (Chevrollier et al., 2005). L'associació de l'hexoquinasa a la mitocòndria és inversament proporcional a la susceptibilitat per l'apoptosi (Mathupala et al., 2006). A més a més, l'Akt també activa un altre enzim glucolític, la PFK-2 localitzada a cor, la qual és fosforilada per aquesta quinasa a la Ser-466 i a la Ser-483 (Deprez et al., 1997). Aquesta fosforilació a la Ser-483 per Akt és necessària per a la unió de la proteïna 14-3-3 a la PFK-2 de cor. La proteïna 14-3-3 s'uneix a proteïnes fosforilades i majoritàriament promou la supervivència cel·lular (Pozuelo Rubio et al., 2003).

Un altre paper relacionat amb la via Akt/PI3K és la regulació i estabilització de la subunitat HIF-1 α en un ambient de normòxia, però aquesta funció encara és un tema polèmic (Kim and Dang, 2006).

A més de la inducció d'enzims glucolítics s'ha de tenir en compte, també, que la hipòtesi de Warburg es fonamentava en la disminució de la respiració mitocondrial i les dades dels darrers mesos demostren que la regulació de la respiració també forma part d'aquesta complicada xarxa del metabolisme energètic tumoral.

La disminució de la respiració mitocondrial pot ser deguda, com postulava Warburg, a l'elevada taxa de mutació del seu DNA en cèl·lules canceroses (Taylor and Turnbull, 2005). Aquestes mutacions s'han observat en càncer de pròstata, de pit, gàstric i en leucèmies i s'han estudiat els diferents factors que hi poden contribuir, com la proximitat física dels llocs que generen radicals lliures, la falta de protecció per histones i la dèbil capacitat de reparació amb la que compta el DNA mitocondrial. Considerant que aquest genoma codifica per a 13 proteïnes que formen part de la cadena respiratòria i que la seva estructura genètica no té pràcticament introns, és molt possible que les mutacions del DNA mitocondrial afectin a aquestes proteïnes, compromentent, així, la funcionalitat de la cadena respiratòria (Pelicano et al., 2006). Si la cadena respiratòria no pot dur a terme la fosforilació oxidativa, la cèl·lula haurà d'obtenir ATP per la via glucolítica, però no només això, donat que la producció d'ATP és molt més eficient per fosforilació oxidativa (36 mols d'ATP per mol de glucosa), l'activitat glucolítica haurà d'incrementar de forma substancial per a poder mantenir el balanç energètic ja que el seu rendiment (2 mols d'ATP per mol de glucosa) és molt menor.

A part de l'elevada taxa de mutació mitocondrial, la disminució de la fosforilació oxidativa, es pot produir per d'altres mecanismes: per una banda, la inducció de la piruvat deshidrogenasa quinasa 1 (PDK-1) per HIF i la posterior fosforilació de la piruvat deshidrogenasa, impeding la descarboxilació oxidativa del piruvat mitocondrial

(Kim et al., 2006a), (Papandreou et al., 2006). Per altra, Matoba i col·laboradors (Matoba et al., 2006) han demostrat que p53 juga un paper important regulant els nivells d'expressió de les proteïnes que formen part del complex citocrom c oxidasa (COX) en la cadena respiratòria. Aquests autors van observar que la pèrdua del gen SCO2 (citocrom oxidasa 2), tant en ratolins com en diferents línies cel·lulars, provoca un defecte en el consum d'oxigen, sense canvis en la producció d'ATP, però incrementant els nivells d'àcid làctic. Tot això fa pensar que la glucòlisi està compensant la disminució de la producció d'energia obtinguda per respiració mitocondrial (Matoba et al., 2006). S'ha observat que la pèrdua de p53 provoca una disminució dels nivells d'expressió de SCO2 i de la respiració mitocondrial. Quan es restitueix l'expressió de SCO2 de forma exògena, les cèl·lules restableixen la respiració aeròbica (Matoba et al., 2006). Moltes cèl·lules canceroses presenten mutacions en la via de p53, reduint d'aquesta manera la respiració mitocondrial. La pèrdua de p53 amb la conseqüent disminució de SCO2 afavorirà l'aparició del fenotip glucolític per tal d'obtenir l'energia necessària per la funcionalitat de les cèl·lules transformades (Fig. D1).

Recentment, s'ha descrit un nou producte del gen p53, TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) (Bensaad et al., 2006). La proteïna resultant d'aquest gen comparteix seqüències semblants a la regió bisfosfatasa de l'enzim bifuncional PFK-2/FBPasa-2, el qual degrada la Fru-2,6-P₂. L'enzim, producte del gen TIGAR, disminueix la concentració de Fru-2,6-P₂ inhibint, així, la glucòlisi i redirigint la Fru-6-P cap a la via de les pentoses per a produir NADPH. Una conseqüència directe d'aquest canvi de flux cap a la via de les pentoses i a la generació de NADPH és l'increment dels nivells de glutatió (GSH), protegint la cèl·lula dels radicals lliures. Si p53 està mutat, no s'activarà TIGAR, de manera que no hi haurà una disminució dels nivells de Fru-2,6-P₂ afavorint altra volta el fenotip glucolític.

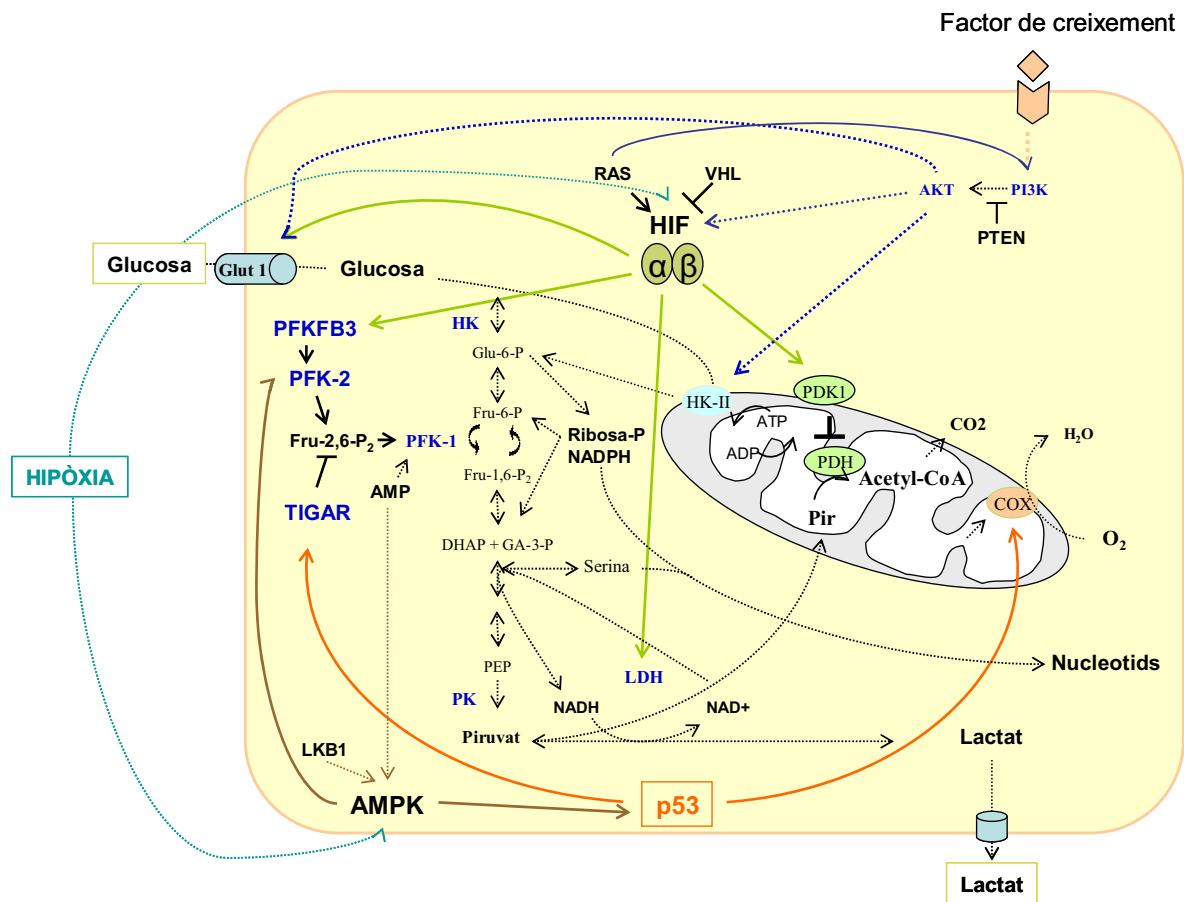


Figura D1. Mecanismes moleculars de l'efecte Warburg. L'efecte Warburg descriu la conversió de la glucosa a lactat per les cèl·lules tumorals, tant en presència com en absència de les concentracions adequades d'oxigen. L'activació d'Akt provoca un increment del transportador Glut-1 i la unió de HKII al mitocondri. La hipòxia produeix l'estabilització de HIF-1, induïda també per RAS, la qual activa la transcripció de gens glucolítics i la PDK-1, la qual inhibeix PDH, bloquejant així l'entrada de piruvat al cicle de Krebs. A més a més l'activació de l'enzim PFK-2 per AMPK reforça el flux glucolític. P53 disminueix la glicòlisi activant TIGAR, incrementant el flux de la via de les pentoses fosfat per a produir NADPH i ribosa-5P.

Curiosament, tots els factors que hem esmentat coincideixen en la regulació del gen *pfkfb3* i en la modulació del seu producte, la PFK-2, responsable de la síntesi i degradació de la Fru-2,6-P₂ (Fig. D1). Probablement, la funció d'aquest metabòlit és fonamental per tal d'obtenir altes taxes glucolítiques. Resultats obtinguts recentment en el nostre laboratori demostren que la silenciació d'aquest gen en cèl·lules HeLa amb siRNAs específics disminueix la glucòlisi, frena el cicle cel·lular i disminueix la capacitat de creixement per ancoratge i la formació de focus (Calvo et al., 2006).

En resum, les cèl·lules canceroses es poden beneficiar d'aquest fenotip glucolític per molts motius. Per una banda, l'associació de l'hexoquinasa II a la mitocondria, induïda per Akt pot evitar l'apoptosi (Mathupala et al., 2006). L'exposició a la hipòxia indueix i també selecciona les cèl·lules amb el fenotip glucolític i al mateix

temps produeix una acidosi local (Gatenby and Gillies, 2004). Aquesta acidificació ambiental proporciona un avantatge de creixement a aquelles cèl·lules que expressen un p53 no funcional, conduint a l'expansió de poblacions cel·lulars anormals (Gatenby and Gillies, 2004). La cèl·lula amb fenotip glucolític no necessita senyals externes que permetin l'ús dels nutrients, és una cèl·lula autònoma i aquesta independència energètica també li atorga avantatges de creixement. Un altre benefici és que la glucòlisi activa directament HIF-1, i al seu temps aquest estimula l'angiogènesi i la capacitat d'invasió.

Podem concloure, doncs, que el canvi al fenotip glucolític permet que la cèl·lula tingui un metabolisme autònom, tolerància a l'acidosi i un elevat potencial de proliferació i invasió. Al mateix temps, quan aquestes cèl·lules colonitzen un nou teixit, els avantatges del fenotip glucolític els hi permeten sobreviure i proliferar fàcilment, competint amb les cèl·lules diferenciades del teixit hoste.

En definitiva, l'efecte descrit per Otto Warburg el podem interpretar amb les dades obtingudes en els darrers anys. Els efectes additius d'oncògens i antioncògens, juntament amb els factors de resposta a la hipòxia, afavoreixen l'aparició del fenotip glucolític. Les característiques d'aquestes cèl·lules, amb alta concentració de transportadors de nutrients, alta concentració d'enzims glucolítics majoritàriament expressant formes isoenzimàtiques característiques de les fases embrionàries, amb una elevada V_{max} i pèrdua d'efectes inhibitoris, a més de la inhibició de la respiració mitocondrial, els hi permet obtenir alts nivells d'energia encara que sigui amb un baix rendiment. L'únic requeriment d'aquestes cèl·lules és la presència de concentracions abundants de nutrients que, poc a poc, deixaran a l'organisme en estat caquètic.

CONCLUSIONS

1. S'ha clonat i caracteritzat la regió 5' UTR del gen *pfkfb3* (fins a -3566 nucleòtids), localitzant possibles llocs d'unió per a factors de transcripció específics, com són els elements de resposta a hipòxia (HRE), els elements de resposta a progesterona (PRE) i la seqüència consens pel factor E2F-1.
2. El factor de transcripció induïble per hipòxia (HIF-1) és essencial per a l'expressió i regulació transcripcional del gen *pfkfb3*. La regió localitzada entre els nucleòtids -1269 i -1297 conté una doble seqüència consens HRE necessària per la resposta al factor de transcripció induïble per hipòxia.
3. Mutacions puntuals de les seqüències consens localitzades a les posicions -1279 i -1288 del promotor del gen *pfkfb3* anul·len la inducció del gen en condicions d'hipòxia.
4. Assaigs de retardament en gel suggereixen que hi ha una unió DNA-proteïna específica en situacions d'hipòxia i que la proteïna que participa en aquesta unió és HIF-1.
5. Assaigs d'*oligo-pull down* demostren que els extractes cel·lulars obtinguts després de realitzar hipòxia fisiològica o química contenen HIF-1 α . L'elutit de la columna conté el HRE del promotor del gen *pfkfb3* i el factor de transcripció HIF-1 que reconeix la seva seqüència consens. Tots aquests resultats corroboren que HIF-1 s'uneix a la seqüència de l'element de resposta a hipòxia o HRE localitzada entre els nucleòtids -1297 a -1269 del promotor del gen *pfkfb3*.
6. La silenciació amb siRNA de la subunitat α del factor de transcripció HIF anul·la l'activació per hipòxia del gen *pfkfb3*. La inducció d'hipòxia en cèl·lules defectuoses en la senyalització d'HIF1 (mEF/HIF1 (-)) no aconsegueix activar l'expressió del gen *pfkfb3*. Tenint en compte aquests resultats, es pot concloure que HIF és necessari per activar la transcripció del gen *pfkfb3* en resposta a hipòxia.
7. L'anàleg de progesterona Organon 2058 regula l'expressió de la proteïna i mRNA del gen *pfkfb3* en la línia cel·lular T47D, obtinguda de càncer de mama,

via els receptors de progesterona. Aquest augment probablement és degut a la regulació transcripcional del gen *pfkfb3*.

8. Els ratolins diabètics, obtinguts per tractament amb estreptozotocina (STZ) tenen nivells elevats de mRNA i proteïna del gen *pfkfb3* (en condicions de dejuni). En canvi, l'expressió del gen *pfkfb1* no varia entre els ratolins controls i els diabètics.
9. Aplicant la tècnica de transferència gènica per hidrodinàmica hem transfectat el promotor del gen *pfkfb3* i hem realitzat estudis d'activitat luciferasa in vivo. Aquests han demostrat un augment transcripcional del gen *pfkfb3* en ratolins diabètics.
10. La concentració de Fru-2,6-P₂ és més elevada en els ratolins diabètics respecte als valors obtinguts en ratolins control, mostrant bona correlació entre l'augment de l'enzim uPFK-2 i la concentració de Fru-2,6-P₂.
11. Assaigs de retardament en gel suggereixen que el factor NFκB no està involucrat de forma directe en la sobreexpressió d'uPFK-2 en el fetge de ratolins diabètics. A més, les activitats TBARS (mesura de peroxidació lipídica) i catalasa no varien quan es comparen les mostres dels ratolins control amb les dels ratolins diabètics.
12. Assaigs de *western blot* revelen una correlació positiva entre la sobreexpressió d'uPFK-2 i diferents factors implicats en proliferació cel·lular.
13. La inhibició de la via de senyalització PI3K/Akt provoca una disminució de l'expressió de *pfkfb3* i ciclina D en hepatòcits primaris de rata, indicant que la sobreexpressió del gen *pfkfb3* pot ser deguda als efectors finals d'aquesta via.
14. Les dades obtingudes per immunohistoquímica demostren que són les acumulacions d'hepatòcits en proliferació, preferentment perivenosos, les que sobreexpressen el gen *pfkfb3*. Aquestes acumulacions també mostren una sobreexpressió de la Ciclina D i E2F-1.

MATERIALS I MÈTODES

TAULA DE CONTINGUTS DE LA METODOLOGIA.

1. Materials.....	133
1.1 Solucions generals.....	133
1.2 Reactius i productes específics.....	136
2. Tècniques de Biologia Molecular.....	136
2.1 Bacteris.....	136
Creixement líquid/sòlid.....	136
Elaboració de cèl·lules competents.....	137
Transformació.....	138
Preparació de stocks de glicerol.....	138
2.2 Purificació de DNA plasmídic.....	139
2.3 Extracció de DNA de gels d'agarosa.....	139
2.4 Seqüenciació automàtica de DNA.....	140
2.5 Extracció de RNA.....	140
2.6 Retrotranscripció.....	141
2.7 PCR Quantitativa a temps real.....	141
3. Tècniques de cultiu cel·lular.....	142
3.1 Cultiu cel·lular de línies transformades.....	142
3.2 Cultiu cel·lular d'hepatòcits de rata.....	143
Preparació de plaques de cultiu cobertes amb gel de col·lagen o matrigel.....	143
Solucions emprades pels aïllament.....	144
Aparell de perfusió.....	145
Mètode d'obtenció del cultiu primari d'hepatòcits de rata.....	145
3.3 Transfeccions.....	146
PEI (polietilenimina)	146
Lipofectamina 2000.....	147
4. Tècniques d'anàlisi de proteïnes.....	148
4.1 Extracció proteica per anàlisi de western blot.....	148
4.2 Valoració de la concentració de proteïnes.....	148
BCA.....	148
Bradford.....	149
4.3 Western blot.....	149
4.4 Reutilització de membranes.....	150
4.5 Extracte cel·lular per a determinació d'activitat luciferasa.....	151
Per a cèl·lules.....	151
Per a teixits.....	152
4.6 Assaig de retardament en gel.....	152
4.7 Extractes totals per assaig de retardament en gel.....	154
4.8 Assaig de precipitació d'oligonucleòtids biotinilats.....	155
4.9 Preparació d'òrgans per a immunofluorescències.....	155

4.10 Immunofluorescències de crioseccions.....	156
4.11 Extractes nuclears en fresc.....	157
5. Determinació de metabòlits.....	158
5.1 Determinació de la Fru-2,6-P ₂ en teixits.....	158
5.2 Determinació de lactat.....	160
5.3 Determinació de la peroxidació lipídica.....	160
5.4 Determinació de la catalasa.....	161
6. Assaigs in vivo.....	162
6.1 Animals diabètics.....	162
6.2 Transferència gènica per hidrodinàmia.....	163
7. Taula de plasmidis.....	164

1. Materials

1.1 Solucions generals

Medi LB:

NaCl 5 g/L

Triptona o peptona 10 g/L

Extracte de llevat 10 g/L

Medi LB low salt:

NaCl 5 g/L

Triptona o peptona 10 g/L

Extracte de llevat 5 g/L

pH:7.1-7.4

Medi LB-Agar:

NaCl 5 g/L

Triptona o peptona 10 g/L

Extracte de llevat 10 g/L

Agar 15 g/L

TAE 50X:

Tris 40 mM (242 g/L)

Àcid Acètic 20 mM (57.1 ml acètic glacial)

EDTA 1 mM (100 ml EDTA 0.5M)

PBS 20X:

NaCl 140 mM (200 g/L)

KCl 2.7 mM (10 g/L)

Na₂HPO₄ 10 mM (57.2 g/L)

KH₂PO₄ 1.8 mM (10 g/L)

Inhibidors de fosfatases:

NaF 1M en aigua (1000X) a 4 °C

Ortovanadat sòdic 0.1M en aigua (1000X) a 4 °C

β-glicerol fosfat 1M en aigua (100X) a 4 °C

Materials i mètodes

Inhibidors de proteases:

PMSF 100 mM en isopropanol (100x) a 4°C
Leupeptina 5 mg/ml en etanol (1000X) a -20°C
Pepstatina 5 mg/ml en etanol (1000X) a -20°C
Aprotinina 5 mg/ml en aigua (1000X) a -20°C
Benzamidina 10 mg/ml en aigua (100X) a 4°C
DTT 1 M en aigua (1000X) a -20°C

Tampó transferència 10X:

Tris 30.3 g/L
Glicina 144 g/L

Tampó de transferència 1X:

Aigua 800 ml
Tampó de transferència 10X 100 ml
Metanol 100 ml

Tampó de lisat cel·lular:

Tris-HCl 50 mM pH:6.8 (6.05 g per 500 ml)
10% glicerol (50 ml per 500 ml)
2% SDS (50 ml de 20% SDS per 500 ml)

Tampó d'electroforesis:

Tris 30.3 g/L
Glicina 144 g/L
SDS 20% 50 ml
pH : 8.3

Solució de *stripping*:

Tris-HCl 62.5 mM (3 ml de 1M per 50 ml)
SDS 2% (5 ml de SDS 20% per 50 ml)
pH: 7.4
 β -mercaptoetanol 160 mM (560 μ l de β -mercaptoetanol 14.3 M)

Tampó homogeneïtzació:

KH₂PO₄ 20 mM
EDTA 10 mM
KF 100 mM
S'afegeixen els inhibidors de proteases.
pH:7.1

TBS/TTBS 20X:

Tris-HCl 200 mM (12.1g per 500 ml)

NaCl 3 M (87.6 g per 500 ml)

pH 7.4

Tween-20 (en el TTBS, 10 ml per 500 ml)

TBE 10X:

Tris 108 g/L

Àcid Bòric 55 g/L

EDTA 7.44 g/L

Tampó d'unió:

Tris-HCl 100 mM pH:7.9

NaCl 250 mM

Glicerol 50%

DTT 0.5 mM

Tampó C (extractes totals per EMSA):

Hepes-KOH 20 mM pH:7.9

Glicerol 25%

NaCl 420 mM

MgCl₂ 1.5 mM

EDTA 0.2 mM

Tampó HKMG:

Hepes 10 mM pH:7.9

KCl 100 mM

MgCl₂ 5 mM

Glicerol 10%

DTT 1 mM

NP-40 0.25%

Trypan blue:

Trypan blue 0.015 g/ml PBS

Tampó C1 (extractes nuclears en fresc):

Hepes 10 mM pH:7.9

KCl 10 mM

EDTA 0.1 mM pH:8

EGTA 0.1 mM

S'afegeixen els inhibidors de proteases i fosfatases.

Tampó C2 (extractes nuclears en fresc):

Hepes 20 mM pH:7.9

NaCl 400 mM

EDTA 1 mM pH:8

EGTA 1 mM

Glicerol 10%

S'afegeixen els inhibidors de proteases i fosfatases

1.2 Reactius i productes específics

Productes	Empresa o persona proveïdora	Concentració
Clorur de Cobalt (CoCl ₂)	Aldrich	200 µM
Deferoxamina (DFO)	Sigma	200 µM
Dimetiloxalilglicina (DMOG)	Peter Ratcliffe	1 µM
Estreptozotocina (STZ)	Sigma	100 mg/Kg
LY 294002	Calbiochem	50 µM
Organon 2058 (ORG)	Organon	10 nM
PD 98059	Calbiochem	50 µM
Rapamicina	Calbiochem	50 nM
SB 203580	Calbiochem	10 µM

2. Tècniques de Biologia Molecular

2.1 Bacteris

Els bacteris que s'utilitzen per els protocols que s'han portat a terme corresponen a dues soques d'*Escherichia coli*, les DH5α i les XL1-blue.

Creixement líquid/sòlid

Material:

- Medi de cultiu LB.
- Antibiótic de selecció: ampicil·lina (50 mg/ml) o kanamicina (50 mg/ml).

Mètode:

En el cas dels cultius líquids es fan créixer les cèl·lules en agitació amb medi LB a 37°C durant tota la nit.

- Per assegurar una bona oxigenació del cultiu el recipient (normalment un *erlenmeyer*) no es pot omplir més de dues terceres parts.
- En un principi el medi LB no inclou cap tipus d'antibiòtic, aquests s'afegeixen en el cas que les cèl·lules hagin estat prèviament transformades amb el plasmidi que es necessita. S'utilitzarà un o altre antibiòtic segons la resistència codificada pel plasmidi.

En el cas de cultius sòlids es faran servir plaques de LB-agar que també inclouran l'antibiòtic d'elecció.

- Les plaques es deixen cap per avall a 37°C tota la nit. És important deixar-los en aquesta posició per tal d'evitar que el vapor d'aigua impregni el medi de cultiu.

El plasmidi pGL2basic, on estan lligats els diferents fragments del promotor *pfkfb3*, té resistència a ampicil·lina, mentre que el pcDNA3 on estan lligats els gens que codifiquen pel factor HIF-1, tenen resistència a kanamicina.

Elaboració de cèl·lules competents

Materials:

- Medi de cultiu LB.
- Solució de competents: 10 mM PIPES, 60 mM CaCl₂, 15% glicerol, pH 7.4).
- Tot el material s'usa autoclavats i en gel.

Mètode:

- A partir d'un *stock* de cèl·lules d'*Escherichia coli*, s'inoculen 2 ml de LB sense antibiòtic.
- Es fa créixer durant tota la nit a 37°C i en agitació.
- Es passen els 2 ml amb les cèl·lules ja crescudes a un *erlenmeyer* que conté 100 ml de LB (també sense antibiòtic). Aquest es deixa aproximadament 2 hores a 37°C en agitació.
- S'atura el creixement quan llegim a l'espectre a una absorbància de 550 nm que $A_{550}=0.35-0.60$.
- Es refreda el creixement durant mínim 15 minuts a 4°C. Un cop refredat es passa el cultiu a tubs de 50 ml (també prerefredats).
- Se centrifuguen 10 minuts a 4°C a 2500 rpm i descartem el sobrenedant.

- El precipitat obtingut el resuspenem en 15 ml de la solució per competents freda i centrifuguem altre cop en les mateixes condicions.
- Es descarta el sobrenedant i es resuspen en 4 ml de la solució de competents.
- S'aliqüota el més ràpid possible en fraccions de 200 µl i es congela en N₂ líquid. Es conserven a -80°C i quan s'utilitzen sempre s'han de descongelar en gel.

Transformació

Materials:

- Cèl·lules competents.
- Medi de cultiu LB.
- Plaques de LB-agar amb l'antibiòtic d'elecció.
- Boletes de vidre.

Mètodes:

- Es descongela en gel una alíquota de cèl·lules competents.
- S'afegeixen uns 50 ng del plasmidi que es vol transformar (en cas que provingui d'una lligació s'afegirà 2 µl) en 100 µl de competents.
- Es realitza un xoc tèrmic fred-calor. Es deixa 20 minuts en gel, després 45 segons a un bany a 42°C i es passa a 2 minuts en gel altre cop.
- S'afegeixen 900 µl de LB sense antibiòtic (aquest últim pas es fa a la campana de bacteris, per a evitar possibles contaminacions del LB). Es deixa en agitació 45 minuts a 37°C i seguidament se centrifuga durant 1 minut per tal de decantar el sobrenedant.
- Es resuspen el contingut de cèl·lules amb el residu mateix que queda al *ependorf* de LB i finalment es plaqueja a la campana d'extracció, amb l'ajuda de les boletes de vidre, a les plaques de LB-agar amb antibiòtic.

Preparació de stocks de glicerol

Material:

- Glicerol 80% (v/v) estèril.
- Medi de cultiu LB.

Mètode:

- S'inoculen els bacteris en medi LB amb l'antibiòtic d'elecció i s'incuba a 37°C i en agitació tota la nit.

- S'agafen 810 µl de cultiu i 190 µl de glicerol 80% de manera que el percentatge final és del 15%. Es pipeteja bé, amunt i avall, i es conserva al congelador de -80°C.

2.2 Purificació de DNA plasmídic

Material:

- Cultiu bacterià transformat amb el plasmidi d'interès.
- Kit de miniprep Wizard de Promega.
- Kit de maxiprep de SIGMA Endotoxin Free.

Mètode:

- Per a la purificació de DNA a petita escala es parteix de 5 ml de cultiu bacterià líquid i es segueix el protocol del kit de miniprep. Aquest tipus de kit s'acostuma a utilitzar com a pas intermediari per a comprovar que es tracta del plasmidi d'interès (un cop s'obté, amb enzims de restricció es realitza una digestió per a saber que es tracta del nostre plasmidi).
- Per tal d'obtenir quantitats elevades de DNA es parteix d'un cultiu de 130 ml i s'utilitza el kit de maxiprep.
- En la valoració del DNA es prepara una dilució 1:50 i es llegeix l'absorbància a λ 260nm a l'espectrofotòmetre i ell mateix calcula la concentració aplicant la fórmula:

$$[\text{DNA}] (\text{mg/ml}) = A_{260} \times 50 / \mu\text{l DNA plasmídic}$$

2.3 Extracció de DNA de gels d'agarosa

Material:

- DNA *isolation* kit o *glass milk*.

Mètode:

- Es realitza l'electroforesi del DNA a un gel d'agarosa, el percentatge del qual dependrà de la mida de les bandes de DNA que es vulguin obtenir.
- Un cop el gel acaba de córrer es retalla just el tros de gel que conté la banda d'interès. Aquesta es purifica seguint el protocol del kit escollit.

2.4 Seqüenciació automàtica de DNA

Material:

- ABI PRISM *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, Perkin Elmer.
- Columnnes de safarosa G-50, Amersham Pharmacia.
- *Speed-vac*.

Mètode:

- La reacció de seqüenciació es porta a terme seguint el protocol del kit ABI PRISM.
- Els terminadors marcats s'eliminen amb columnnes de safarosa G-50 i finalment s'asseca al *speed-vac* durant uns vint minuts.
- Un cop assecada la mostra es porta a seqüenciar als serveis científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

2.5 Extracció de RNA

Material:

- Ultraspect kit.
- Cloroform.
- Isopropanol.
- Aigua DEPC.
- Centrifuga freda.
- Material tot estèril.

Mètode:

* Tot es realitzarà en fred.

- Un cop aspirat el medi de cultiu de la placa cel·lular a extreure el RNA s'afegeix la quantitat que indica el protocol d'Ultraspect® prèviament temperat.
- Es lisen les cèl·lules i es recull el contingut a un *ependorf*, es deixa reposar en gel 5 minuts i s'afegeix la quantitat adequada de cloroform (serà una o altra segons la quantitat utilitzada d'Ultraspect®). Es mescla enèrgicament durant 15 segons i es deixa reposar 5 minuts en gel.
- Es centrifuga a 12000g 20 minuts a 4°C, es recull el sobrenedant.
- S'afegeix la quantitat necessària d'isopropanol per a una bona precipitació del RNA.

- Es deixa una hora a -80°C i es torna a realitzar la mateixa centrifugació que abans.
- El precipitat obtingut es renta dues vegades amb etanol 96° en aigua DEPC, vortejant i centrifugant a 12000g durant 7 minuts. Es deixa evaporar l'etanol restant i resuspenem el precipitat amb 30-50 μl d'aigua DEPC prèviament escalfada a $55-60^{\circ}\text{C}$.

* La concentració i puresa de les mostres de RNA es determinen usant una ratio de A_{260}/A_{280} i l'electroforesi del gel de formaldehid per a veure el grau de degradació que ha patit durant el procés, la dilució a la cubeta de l'espectrofotòmetre és de 1:80.

2.6 Retrotranscripció

Material:

- *Ready-to-Go First Strand Kit.D.*
- Oligo-dt.

Mètode:

Se segueix exactament el protocol detallat explicat al kit.

* En el cas del RNA del gen *pfkfb3* sempre s'utilitzen 5 μg de RNA total per a començar la retrotranscripció.

2.7 PCR Quantitativa a temps real

Material:

- Sondes per a RT-PCR de *pfkfb3*, *glut-1* i *pfkfb1* (Applied Biosystems).
- Sonda normalitzadora humana TBP (*TATA-binding protein*), GUS o 18S (dilució 1:1000).
- Aparell de PCR, 7700 *sequence detection system* (Applied Biosystems).
- Master Mix.

Mètode:

- Per tal de poder determinar la quantitat de mRNA d'una mostra es realitza la tècnica de RT-PCR quantitativa. Es retrotranscriuen 5 μg de RNA total per obtenir el cDNA amb el que es començarà la PCR.
- S'agafen 50 ng de RNA retrotranscrit. S'amplificaran els gens d'elecció, el *pfkfb3* i el control per a normalitzar.

- En el cas de les T98G i el tractament amb hipòxia la sonda control és la del gen TBP, mentre que en el cas de les T47D i el tractament amb progesterona s'utilitza el GUS. Pels experiment *in vivo* s'usa 18S.
- El vehicle de la reacció és la Master Mix, que conté tots els elements necessaris per a portar a terme la PCR (polimerases, nucleòtids...). Les condicions generals de la PCR són les següents:
 - 2' a 50 °C
 - 10' a 95 °C
 - 15" a 95 °C (40 vegades).
 - 1' a 60 °C (40 vegades).
- Al finalitzar la PCR s'obté el número de *threshold* (llindar) *cycle* (C_T), com més baix és aquest valor vol dir que més quantitat de mRNA hi havia en aquell moment determinat.
- La quantitat d'aquest mRNA es calcula a partir d'una corba estàndard generada amb el RNA total. Cada valor es normalitza amb l'obtingut per la sonda control. A partir d'aquí les vegades d'inducció es poden calcular referides al valor a temps zero del tractament que s'estigui duent a terme.

3. Tècniques de cultiu cel·lular

3.1 Cultiu cel·lular de línies transformades

Material:

- DMEM (*Dulbecco's modified Eagles medium*).
- Glutamina.
- Piruvat sòdic.
- Pen/strep.
- Tripsina.
- PBS.
- Tractaments: DFO, CoCl_2 , DMOG, hipòxia al 2%, Organon.

Línies cel·lulars emprades:

- T98G (glioblastoma humà) obtinguda d'ATCC.
- U87 (glioblastoma humà) obtinguda d'ATCC.

- Mouse embryo fibroblast (mEF salvatges (+) i deficients en HIF-1 α (-)) obtingudes gràcies al Dr. R.S. Johnson (Universitat de California, San Diego, La Jolla).
- RAW obtingudes gràcies al Dr. Antonio Castrillo.
- T47D obtinguda per la Universitat de Barcelona.

Mètode:

- Les cèl·lules es mantenen amb DMEM suplementat amb sèrum fetal boví, L-glutamina, antibiòtics i amb o sense piruvat, depenent de la línia cel·lular.
- S'incuben amb atmosfera humida a un 10% CO₂ a una temperatura de 37°C.
- Les condicions d'hipòxia simulada s'aconsegueixen utilitzant agents hipòxics químics com la DFO i el CoCl₂ o DMOG. Per les condicions d'hipòxia fisiològica s'utilitza un incubador modular on s'insufla una barreja d'aire de 2% O₂ i 5% CO₂.
- Els tractaments per les cèl·lules de càncer de mama es porten a terme amb l'anàleg de progesterona Organon 2058.

3.2 Cultiu cel·lular d'hepatòcits de rata

Preparació de plaques de cultiu cobertes amb gel de col·lagen o matrigel

Material:

- Plaques de cultiu.
- Solució d'àcid acètic 0.02 N, estèril.
- Solució concentrada comercial de col·lagen de cua de rata.
- Solució comercial de matrigel.

Mètode:

- El protocol es porta a terme a la cabina de flux laminar.
- Es prepara la solució de col·lagen a 40 $\mu\text{g/ml}$ en solució d'àcid acètic. Aquesta solució es prepararà nova cada vegada.
- S'afegeix 100 μl de la solució anterior per cada cm^2 de superfície de placa de cultiu, així la concentració superficial de col·lagen és de 4 $\mu\text{g/cm}^2$.

- Les plaques es deixen obertes a la campana de flux laminar fins que s'evapora l'àcid acètic. S'aconsella fer aquest procés a última hora de la tarda i deixar les plaques tota la nit a la cabina sense la llum UV posada. Un cop seques, les plaques s'embolcallen amb paper d'alumini i es conserven a temperatura ambient.
- En el cas de les plaques de matrigel, s'afegeix la quantitat suficient per a cobrir tota la superfície de placa. Es deixa una hora a 37°C.

Solucions emprades pels aïllament

Solució de preperfusió (per 500 ml)

Material:

- 4.75 g Hank's BSS.
- 0.175 g NaHCO₃.
- 1.19 g Hepes.
- 0.095 g EGTA.

Mètode:

- S'ajusta el pH amb NaOH fins a 7 i es filtra la solució.

Solució de perfusió (per 500ml)

Material:

- 4.75 g Hank's BSS.
- 0.175 g NaHCO₃.
- 1.19 g Hepes.
- 0.27 g CaCl₂ 2H₂O

Mètode:

- S'ajusta el pH amb NaOH fins a 7.3 i es filtra la solució.

MEM (per 500ml)

Material:

- Una ampolla de MEM de 500 ml.
- 2.2 g NaHCO₃.

Mètode:

- S'ajusta el pH amb NaOH fins a 7 i es filtra la solució.

Aparell de perfusió

El mètode consisteix bàsicament en la perfusió recirculant d'una solució de liberassa de fetge.

Les solucions de perfusió es mantenen a l'interior d'un erlenmeyer, el qual es troba submergit a l'interior d'un bany calefactor a 42°C. El medi de perfusió es bombeja mitjançant una bomba peristàtica a una velocitat de 40-45 ml/min cap a un serpentí termostatitzador situat a l'interior del bany. A continuació el medi es fa circular cap a l'interior del fetge a través de la cànula d'entrada situada a la vena porta hepàtica. La cànula de sortida del fetge recircula el medi de perfusió des de la vena cava superior cap al reservori. D'aquesta manera s'estableix un circuit tancat.

Mètode d'obtenció del cultiu primari d'hepatòcits de rata

- Es recirculen uns 200 ml del medi de preperfusió a través del circuit, i es comprova que el medi que surt per la cànula i que entrarà al fetge estigui entre 36 i 37°C i que el flux sigui el correcte.
- Es descongela la liberassa i el MEM i el DMEM suplementats amb 20% FBS es mantenen en gel.
- S'anestesia la rata mitjançant una injecció intraperitoneal de Ketolar a dosi 60 mg/kg de pes corporal i seguidament s'heparinitza amb 0.2 ml de solució d'heparina al 5% per via intravenosa a través de la vena del penis.
- Es practica una laparotomia, desinfectant la zona amb una solució iodada. Es passa un fil de seda per sota la vena porta hepàtica i es deixa preparat per fer un nus. Seguidament es passa un segon fil per la vena cava inferior (just per sota els ronyons) i es deixa també preparat per a fer un nus.
- Es canula la vena porta hepàtica amb una cànula tipu Londwel de tefló i es tanca fent un nus amb força. Es comença la circulació del medi de preperfusió.
- Es tanca el segon fil i es talla la vena cava inferior per sota del nus, així s'evita que el líquid de preperfusió es barregi amb la sang sistèmica i es dirigeix cap al cor a través de la vena cava superior.
- S'obre la caixa toràcica i es canula la vena cava superior mitjançant una incisió feta a l'aurícula dreta, la cànula es fixa

fent un nus amb fil de seda. Es llença el líquid que surt per la cànula de sortida, sense recircular-l'ho, fins que aparegui clar i es aleshores que es canvia el medi de preperfusió per un de perfusió (150 ml amb liberassa).

- Es recircula el medi de perfusió, i a més a més es manté hidratat el fetge afegint líquid de perfusió amb una xeringa. El temps de perfusió depèn de l'activitat de l'enzim i de l'aspecte del fetge, aproximadament als 12 minuts es dona per acabada la perfusió (el fetge tindrà un aspecte groc i distès i les puntes dels lòbuls agafen una forma arrodonida).
- Se separa la càpsula de Bouman extraient el fetge i col·locant-l'ho sobre un tros de parafilm.
- Sobre un embut es posa una doble gassa i aquest dins un tub de 50 ml estèril. El fetge es col·loca sobre la gasa i es va passant MEM fred amb una pipeta per tal de disgregar el fetge, el contingut es recull en quatre falcons de 50 ml.
- Se centrifuga la suspensió resultant a 50 g durant 2 minuts a 4°C i es descarta el sobrenedant.
- El precipitat es resuspen amb DMEM complementat amb un 20% de FCS, així es pot obtenir una concentració final de cèl·lules d'entre 2 i 4×10^6 .
- La viabilitat de la suspensió s'estima amb la tècnica de blau de tripà (ha de ser $>$ a 90%).
- Les cèl·lules obtingudes es planten als plats col·lagenats amb medi William's E complementat i amb un 5% FCS. A les 3 hores s'aspira el medi i s'afegeix medi nou sense sèrum o amb sèrum, depenent de l'estudi que es vulgui realitzar.

3.3 Transfeccions

PEI (polietilenimina)

Material:

- PEI.
- NaCl 150 mM estèril.
- DMEM sense sèrum i sense antibiòtics.
- DMEM complert (10% FBS, antibiòtics, L-glutamina).
- Vórtex.

- PBS.

Mètode:

- El primer que preparem és la solució de transfecció amb els plasmidis d'interès.
- En plaques de 12 pous es transfecta 1µg de DNA. Preparem a un *ependorf* el DNA amb la solució de NaCl 150 mM tal com diu el protocol i en un altre *ependorf* el PEI amb el NaCl 150 mM seguint també les indicacions del protocol.
- Vortegem els dos *ependorf* durant 10 segons i passem el PEI al *ependorf* del DNA.
- Es torna a vortejar i deixem la solució 10 minuts a temperatura ambient.
- Durant aquest deu minuts rentem les cèl·lules dos vegades amb PBS temperat i afegim 500 µl de DMEM a cada pou.
- Passat el temps d'incubació del DNA s'afegeixen 50 µl de la barreja a cada pou.
- Es deixa 4 hores i després s'afegeix medi amb el tractament que es vulgui realitzar.

Lipofectamina 2000

Material:

- Lipofectamina 2000.
- Optimem®.
- PBS.
- Vórtex.

Mètode:

- Primer es prepara, seguint la relació adequada que ens indica el protocol, un tub amb el DNA a transfectar i Optimem® i un segon tub amb lipofectamina 2000 i Optimem®.
- Es pipeteja amunt i avall i es deixa 5 minuts d'incubació. S'evoca el contingut del tub de lipofectamina 2000 sobre el DNA i es deixa incubant 20 minuts.
- Durant aquest temps es renten les cèl·lules amb PBS.
- S'afegeixen 500 µl de la barreja d'incubació a cada pou. Es deixa transfectant durant mínim 3 hores.

- Es deixa recuperar les cèl·lules durant 24 h amb el seu medi de cultiu i després es depleciona el sèrum durant el dia i afegim el tractament adequat o/n.

4. Tècniques d'anàlisi de proteïnes

4.1 Extracció proteica per anàlisis de western blot

Material:

- PBS a temperatura ambient.
- Tampó de lisis cel·lular: 50 mM Tris-HCl, pH:6.8, 10% glicerol, 2% SDS.
- *Scrappers*.
- Bloc sec a 90°C.

Mètode:

- Per tal d'obtenir les proteïnes cel·lulars per a ser analitzades per *western blot* es renten dues vegades amb PBS temperat i s'afegeix la quantitat necessària de tampó de lisi (500 µl per un plat de 10 cm de diàmetre).
- S'utilitza el *scraper* fins a la lisis completa de les cèl·lules (la solució adquireix un aspecte mocós degut el trencament del DNA).
- Es recull a un *ependorf* i s'escalfa 10 minuts a 90°C. Es deixa temperar i ja es poden congelar a -20°C o es quantifiquen directament per a ser analitzades per *western blot*.

4.2 Valoració de la concentració de proteïnes

BCA

Material:

- Kit de BCA, Pierce.
- Placa de 96 pous i lector de plaques.
- Patró d'albumina sèrica bovina.

Mètode:

- Es realitza una patró de mostres de concentració coneguda amb albumina i el tampó de lisi utilitzat (normalment de 0, 0.5, 1.5, 2.5, 5 µg/µl).

- Es posen 2 µl de la patró (per duplicat) i la mateixa quantitat de les mostres de concentració desconeguda (també per duplicat).
- S'afegeixen 200 µl del Kit de BCA i s'incuba la barreja a 37°C durant 30 minuts. * Es llegeix la placa al lector a λ 550 nm.

Bradford

Material:

- Patró d'albumina sèrica bovina.
- Reactiu Bradford, Bio-Rad.
- Placa de 96 pous i lector de plaques.

Mètode:

- Es realitza una patró de mostres de concentració coneguda amb l'albumina i el tampó d'homogeneïtzació de teixits (normalment de 0, 0.5, 1.5, 2.5, 5 µg/µl).
- Es posen 2 µl de cada concentració de patró i la mateixa quantitat de les mostres a analitzar (tot per duplicat).
- S'afegeixen 200 µl de Bradford diluït 1:5 amb aigua mQ i es llegeix directament al lector de plaques a λ 595 nm.

4.3 Western blot

Material:

- Extractes proteïcs a analitzar.
- Gel 8% SDS-poliacrilamida.
- Tampó de càrrega.
- Bloc sec a 90°C.
- Marcador de proteïnes.
- Tampó d'electroforesis i de transferència.
- Tampó TTBS, TBS.
- Anticossos primaris.
- Anticossos secundaris.
- Fixador i revelador.
- Pel·lícules de revelat.

Mètode:

- S'afegeix a les mostres a analitzar la quantitat adequada de tampó de càrrega i s'escalfen a 90°C durant 10 minuts.

- Es carreguen al gel de SDS-poliacrilamida i es realitza l'electroforesi a 100 V.
- Un cop separades les proteïnes per pes en el gel es transfereixen a una membrana de polivinilidè difluorada, a 400 mA durant 1 hora.
- Aquesta membrana es bloqueja amb llet en pols durant 1 hora per tal d'eliminar especificitats de l'anticòs.
- Seguidament s'incuba amb l'anticòs seleccionat (dependrà de la proteïna que vulguem estudiar) durant dues hores a temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C.
- Es renta la membrana amb tampó TTBS (tres rentats de 10 minuts) i s'incuba 1 hora amb l'anticòs secundari adequat (dependrà de l'anticòs primari utilitzat).
- Es renta la membrana amb tampó TTBS (dos rentats de 10 minuts) i un últim rentat amb TBS.
- Es contacta la membrana amb una pel·lícula per a revelar-la posteriorment. Es pot veure la presència o absència de la proteïna a estudiar i la sobreexpressió o no d'aquesta.

4.4 Reutilització de membranes

Material:

- Solució de *striping* (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 0.1 M β -mercaptoetanol).
- Bany a 50°C.
- Metanol.

Mètode:

- Quan es vol reutilitzar la mateixa membrana per a analitzar altres proteïnes d'un pes molecular semblant aquesta es reactiva amb metanol.
- Seguidament s'incuba en 50 ml de solució de *striping* durant 30 minuts a un bany-agitador a 50°C. Evocarem la solució a un recipient especial per a residus tòxics.
- Es renta la membrana amb TTBS (rentats de 10 minuts cada un) fins a que es deixi de sentir l'olor característica del β -mercaptoetanol.

Anticòs	Empresa
Akt-P	Cell Signaling
Caspasa 3	PharMingen International
c/EBP α	Santa Cruz
c/EBP β	Santa Cruz
Ciclina D	Upstate
E2F-1	Santa Cruz
ERK-P	Cell Signaling
HIF-1 α	Transduction Laboratories
HIF-1 β	Abcam
iNOS	Santa Cruz
JNK	Cell Signaling
LPFK-2	Santa Cruz
NFKB p65	Santa Cruz
P38-P	Cell Signaling
P53	Abcam
P70S6K	Cell Signaling
α -tubulina	Sigma
γ -tubulina	Cedit per Biofísica
uPFK-2	Elaborat per nosaltres

Taula M.1. Anticossos i empresa proveïdora.

4.5 Extracte cel·lular per a determinació d'activitat luciferasa

Per a cèl·lules

Material:

- PBS.
- *Scrappers*.
- Tampó de luciferasa 5X.
- Agitador de plaques.
- TD 20/20 Luminòmetre.

Mètode:

- Es renten les cèl·lules dues vegades amb PBS, i s'afegeix la quantitat adequada de tampó de luciferasa.

- Es protegeix la placa de la llum amb paper de plata i s'agita a una velocitat elevada durant 10 minuts.
- A partir d'aquí es pot determinar l'activitat luciferasa amb el reactiu de luciferasa i determinar també proteïna per a fer western blot.

Per a teixits

Material:

- Balança.
- Tampó de luciferasa 5X.
- Reactiu de luciferasa.
- TD 20/20 Luminòmetre.
- Politró.

Mètode:

- Es pesen els teixits dels quals es vol mesurar l'activitat luciferasa, en el nostre cas és el lòbul caudal sencer del fetge.
- S'afegeix 10 vegades el pes del teixit de tampó de luciferasa.
- S'homogeneïtzen els fetges amb el politró.
- S'agafen 10 µl que s'analitzaran amb 100 µl de reactiu de luciferasa al luminòmetre.
- Normalitzem els resultats per la proteïna del teixit prèviament analitzada amb BCA.

4.6 Assaig de retardament en gel

Material:

- Aparell d'electroforesis.
- Sonda marcada radioactivament amb P³².
- Extractes proteics a analitzar.
- Secador de gels.
- Films per a revelar.
- Tampó d'unió.
- TBE.
- poly(dI-dC).
- Glicerol.

- T4PNK.
- Tampó A de la T4PNK
- Tampó d'electroforesis.
- ATPgamma.
- Comptador β -counter.
- Líquid de centelleig.
- Anticòs corresponent.

Mètode:

* Es prepara el gel només arribar:

5% Acrilamida:

Acrilamida	9.375 ml
TBE 10X	1.875 ml
Glicerol	1.875 ml
Aigua	fins a 75 ml
APS	577.5 μ l
Temed	75 μ l

- S'utilitza una pinta de 10 pous perquè interessa que corri la mostra el més prima possible.
- El tampó d'electroforesis que s'usa és TBE 10X 25ml, i aigua fins a 1L.
- S'usen només 25 ml de TBE 10X per si l'hibridació sonda-extracte nuclear és molt dèbil.
- Es fa un pre-running sense mostra ni LB de DNA, el posem a 25 mA i esperem una hora mínim a que l'amperatge disminueixi a 18 aprox.
- Mentre el gel corre sense cap mostra marquem la sonda a utilitzar:
 - 33 μ l d'aigua
 - 2.5 pmols oligo anellat (sonda, que la tindrem a 1 pmol/ml)
 - 0.5 μ l T4PNK
 - 10 μ l tampó A de la T4PNK
 - 4 μ l gamma ATP (es posa l'últim)
 - Vf: 50 μ L-----1.30 h a 37°C
- S'agafa 1 μ l de la sonda marcada i es posa a un paper *wathman*, es deixa a un potet que contingui líquid de centelleig per a comptar.
- La resta es passa per la columna de *sephadex G50* (que prèviament haurem centrifugat) i es centrifuga.

- De la sonda passada per la columna s'agafa 1 μl i es compta també en paper *wathman* i líquid de centelleig.
 - Es mira el cpm que obtenim i es carrega entre 50000 i 70000 cpm (que en teoria estan en 1 μl)
 - Es preparen les mostres a carregar al gel:
 - 8 μg extracte proteic (mínim)
 - 4 μl tampó d'unió 5X
 - 1 μl de poly(dI-dC)
 - 10' a t.amb.
 - S'afegeix la sonda marcada (1 μl) i 15' més a temperatura ambient.
- * En el cas de fer supershift incubem només 10' i després de posar 1 μg d'anticòs incubem 20' més
- Mentre s'esperen les incubacions, es carrega LB de DNA sol només fins que entri al gel.
 - Seguidament es carreguen les diferents mostres, l'electroforesi es realitza a la cambra freda a 20 mA si no s'escalfaria massa i no s'hibridaria la sonda amb l'extracte nuclear (on hi ha el factor de transcripció). Triga entre 3-4 hores.
 - Un cop acabat s'ha d'anar molt en compte amb el tampó d'electroforesi perquè està molt irradiat.
 - S'agafa un *wathman* més gran que el gel i es posa a l'assecador de buit, amb un altra *wathman* s'agafa el gel i es posa a l'assecador, s'embolcalla amb un paper de plàstic a sobre i es fa el buit. 45'.
 - Es posa amb el film i la pantalla intensificadora o/n a -80°C .
 - Es revela.

4.7 Extractes totals per assaig de retardament en gel

Material:

- PBS fred.
- *Scrappers*.
- Tampó C.
- Xeringa i agulla de 26G.

Mètode:

- Es renten les cèl·lules amb PBS fred un parell de vegades.
- Es fa *scrapping* en gel amb el mateix PBS fred.

- Se centrifuga a 1200rpm 5' i es desprecia el sobrenedant.
- S'afegeix de 2 a 3 volums del tampó C i es passa el contingut unes 8 vegades per la xeringa per tal de realitzar una bona lisi.
- Se centrifuga per segona vegada a 12000g 15' a 4°C. Aquesta vegada es recull el sobrenedant que es pot congelar directament a -80°C o quantificar amb el kit de assaig de proteïna de Pierce (BCA).

4.8 Assaig de precipitació d'oligonucleòtids biotinilats

Material:

- Tampó HKMG.
- Oligonucleòtid biotinilat d'interès.
- Poly(dI-dC).
- Columna estreptavidina-sefarosa (Amersham).
- Anticòs anti-HIF-1 α .

Mètode:

- Després del tractament d'hipòxia química o fisiològica a les cèl·lules T98G es lisen amb el tampó HKMG.
 - Se centrifuga 10' a 14000 rpm. i s'obté el sobrenedant.
 - Aquest s'incuba amb 1 μ g de l'oligonucleòtid biotinilat (conté les seqüències d'unió al factor de transcripció d'interès) i 10 μ g de poly(dI-dC) durant 16h.
 - La unió proteïna-DNA biotinilat es recull amb la columna d'estreptavidina-sefarosa després d'un contacte d'una hora.
 - Es renta amb tampó HKMG (aquest cop sense NP-40) i es carrega a un gel de SDS-poliacrilamida per a realitzar un western blot de les proteïnes unides al DNA biotinilat.
- * Aquest mètode ens demostra una unió directa del factor de transcripció al promotor del gen d'estudi.

4.9 Preparació d'òrgans per a immunofluorescències

Material:

- Paraformaldheid 4% en tampó fosfat (PFA 4%).
- PBS 1X amb 30% sacarosa.
- OCT.

- Motlle per a la criopreservació.

Mètode:

- Un cop eutanasiat el ratolí s'extreu el lòbul caudal del fetge (sempre el mateix) i el rentem amb sèrum fisiològic.
- Es col·loca seguidament a un tub amb 25 ml de PFA 4%, i el deixem a 4°C tota la nit, d'aquesta manera el teixit es fixa.
- L'endemà es passa a un tub que contindrà 25 ml de PBS 30% sacarosa, i ens esperarem a que el fragment de teixit es dipositi al fons del falcon, amb la sacarosa s'aconsegueix mantenir la forma del teixit.
- El fetge es col·locarà en el motlle de criopreservació amb OCT en la posició adequada per a fer crioseccions.

4.10 Immunofluorescències de crioseccions

Material:

- Porta-objectes tractats amb poly-l-lysina.
- Paraformaldheid 10% en aigua.
- PBS.
- PBS-Tritó 0.2%.
- Solució A: PBS, Tritó 0.2% i FCS 20%.
- Solució B: PBS, Tritó 0.2% i FCS 1%.
- Anticòs primari.
- Anticòs secundari.
- Topro III.
- Mowiol o Fluorsave.

Mètode:

- Primer es realitzen els talls, de 5 a 7 micres, de teixit al criostat. Aquests es col·loquen al porta-objectes poly-l-lysinat directament i es deixen assecat a temperatura ambient durant 10 minuts. Passat aquest temps es congelen a -20°C fins al seu ús o es pot començar la immunofluorescència.
- Si els talls provenen del congelador es deixaran temperar durant 15 minuts aproximadament.
- Els fixem amb 1 ml de paraformaldheid 10% en aigua durant 10 minuts.

- Es fan 5 rentats de dos minuts amb PBS en una cubeta anant en compte de no desenganxar el teixit.
 - Seguidament es permeabilitza la membrana amb la solució de PBS-Tritó 0.2% fent 3 rentats de 5 minuts.
 - Es realitza el bloqueig del teixit durant dues hores amb la solució A.
- * Els teixits mai es poden quedar secs, de manera que les incubacions sempre es realitzen en cambra humida.
- Després del bloqueig s'incuba amb anticòs primari a la cambra humida a 4°C o/n. L'anticòs es dilueix tal com indiqui la casa comercial en la solució B.
 - Es realitzen tres rentats de 5 minuts amb PBS-Tritó 0.1% i s'incuba amb l'anticòs secundari diluït 1/400 amb la solució B i amb Topro III (1/1000) per a marcar els nuclis. Una hora a la cambra humida i protegit de la llum.
 - Es renta l'anticòs secundari amb PBS-Tritó 0.1% tres vegades durant 5 minuts.
 - Es fa el muntatge del porta-objectes amb medi de muntatge aquós i que mantingui la fluorescència, com el Fluorsave o Mowiol, es deixa a 4°C i tapat de la llum per tal d'incrementar la fluorescència.

4.11 Extractes nuclears en fresc

Material:

- Morter i ma de morter petits.
- Tampó C1 i C2.
- Solució NP-40 al 10%.
- Solució KCl 4M.
- Centrifuga de 4°C.

Mètode:

- S'agafa sempre el mateix lòbul del fetge (lòbul caudal) i s'homogeneïtza amb el morter i 1 ml de tampó C1, en gel.
- S'afegeixen 20 µl de NP-40 i es vorteja.
- Es deixa 10 min en gel.
- Es torna a homogeneïtzar 5 cops més amb el morter.
- Es centrifuga 5 min a 1000 g a 4°C.

- Es descarta el sobrenadant i el precipitat es renta 3 vegades amb 1 ml de tampó C1 a 1000g, excepte l'últim rentat que es realitza a 1500g.
- Es resuspen el precipitat amb un volum igual a ell de tampó C2 (acostuma a ser entre 50 a 100 µl).
- S'afegeix entre 5 i 10 µl de 4M KCl (1/10 part del volum usat de tampó C2).
- Es deixa en gel durant 30 min, vortejant cada 10 min.
- Es fa l'última centrifugada 5 min, a 12000g a 4°C i el sobrenadant es guarda a -80°C fins al seu ús. La quantificació proteica és amb BCA.

5. Determinació de metabòlits

5.1 Determinació de la Fru-2,6-P₂ en teixits

Material:

- Tampó bàsic (50 mM NaOH).
- Tampó de reacció (50 mM Tris-acètic, 0.15 mM NADH, 2 mM acetat magnèsic, 1 mM Fru-6-P, 2.5 mM Gluc-6-P, 0.5 mM pirofosfat inorgànic, 1.7 U/ml G3PDH, 5 U/ml TPI, 1U/ml Aldolasa, 10 mU/ml PPI-PFK, pH 7.8).
- Patró de 0, 2, 4, 6 i 8 mM de Fru-2,6-P₂.
- Politró.
- Centrifuga a 4°C.
- Espectrofotòmetre.

Mètode:

- S'agafen aproximadament 100 mg de teixit (en el nostre cas, de fetge) i s'afageix 1 ml de tampó bàsic.
- S'homogeneïtza amb el politró.
- L'extracte obtingut s'escalfa 10 minuts a 85°C, per tal de degradar la Fru-1,6-P₂ i es centrifuga a 4°C durant 15 minuts a 14000rpm.
- Es recull el sobrenadant, 200 µl es neutralitzen amb acètic/acetat (de 3 µl en 3 µl i vortejant cada vegada) fins a pH:7.5-8. El pH es va comprovant amb les tires de pH. La resta es congela a -80°C.
- Es centrifuga la mostra neutralitzada durant 5 min a 4°C i 14000rpm.

- Es recull el sobrenedant.

Per a la lectura:

Blanc:

μl necessaris	Reactius i substrats
750	Tris/acetat sense NADH
190	H ₂ O _m Q
10	PPI-PFK
50	PPI (sempre s'afegeix l'últim)

Patró:

μl necessaris	Reactius i substrats
125	H ₂ O _m Q
50	Substrats
50	Enzims auxiliars
700	Tris/acetat amb NADH
15	De cada valor patró
10	PPI-PFK (s'agita primera vegada)
50	PPI (s'agita segona vegada)

Mostres:

μl necessaris	Reactius i substrats
110	H ₂ O _m Q
50	Substrats
50	Enzims auxiliars
700	Tris/acetat amb NADH
30	De cada mostra
10	PPI-PFK (s'agita primera vegada)
50	PPI (s'agita segona vegada)

5.2 Determinació de lactat

Material:

- Tampó àcid (HClO_4 70%)
- Tampó neutralitzador (3 M KOH, 3 M KHCO_3 , pH 5)
- Tampó de reacció (0.3 M hidrazina sulfat, 0.87 M glicina, 2.5 M NAD^+ , 0.19 mM EDTA, pH 9.5)
- Patró de lactat de 0; 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 1 $\mu\text{mol/ml}$.
- Lactat deshidrogenasa (LDH) 550 U/mg.

Mètode:

- Es pesen 100 mg de teixit i s'homogeneïtzen amb 500 μl de HClO_4 70% al politró.
- L'homogenat es centrifuga durant 15 min a 4°C 15000 rpm.
- Es recull el sobrenadant i 50 μl es neutralitzen amb (KOH/ KHCO_3).
- Es centrifuga durant 15 min a 4°C i 15000 rpm.
- Es barreja en una placa ELISA 350 μl de tampó de reacció amb la patró o la mostra portada a 75 μl amb aigua, es mesuren dues quantitats diferents de mostra. La lectura es fa a 340 nM com a blanc.
- S'afegeix 25 μl de LDH diluïda $\frac{1}{4}$ en aigua i s'incuba 20 minuts, es torna a llegir.

5.3 Determinació de la peroxidació lipídica

Material:

- Espectrofotòmetre.
- Cubetes de vidre per a la lectura.
- KCl 1.15 % en fred.
- Solució d'àcid tricloroacètic (TCA) 28% en aigua bidestil·lada (14 g / 50 ml).
- Solució de butilhidroxitoluè (BHT) al 0.2% en etanol.
- EDTA 0.14 mM.
- Solució d'àcid tiobarbitúric (TBA) a l'1% en solució d'àcid acètic al 50%. Es necessari escalfar per a aconseguir la dissolució completa del TBA.
- Solució patró de MDA: 0.25 ml s'enrasen a 100 ml amb aigua bidestil·lada (5 nmol/ml), es conserva en fred.
- Butanol.

Mètode:

- 350 mg fetge s'homogeneïtzen en 2.5 ml de KCl 1.15%. Es manté en gel. Si les mostres no s'analitzen al moment es poden congelar a -80°C
- S'afegeix 1 µl/ml d'homogenat de BHT.
- A 200 µl de mostra s'afegeixen 50 µl de TCA en gel. Es vorteja i es deixa 10 min en gel.
- Es centrifuga durant 10 min a 3000rpm. a 4°C.
- S'agafen 200 µl de sobrenedant i s'afegeixen els mateixos reactius que a la patró.
- S'escalfa a 95°C durant una hora.
- Es deixa 10 min en gel.
- S'agafen 220 µl de cada tub i s'addiciona 220 µl de butanol, es vorteja.
- Se centrifuga durant 15 min a 3000rpm. i 200 µl de sobrenadant es llegeixen a 540 λ.
- El blanc són 200 µl d'aigua bidestil·lada que es llegeixen a 620 λ.

µl	0	1	2	3	4	5	6	Mostra
MDA (mol/ml)	0	0.15	0.3	0.6	1.25	2.5	3.75	Mostra
Patró MDA 5 µM	0	6	12	24	50	100	150	0
Aigua bidestil·lada	200	194	188	176	150	100	50	0
Mostra	0	0	0	0	0	0	0	200
HCl 0.3N	100	100	100	100	100	100	100	100
TBA 1%	200	200	200	200	200	200	200	200
BHT 0.2% etanol	16	16	16	16	16	16	16	16
EDTA 0.14 mM	2	2	2	2	2	2	2	2

5.4 Determinació de la catalasa**Material:**

- Tampó fosfat 50 mM pH 7: s'obté a partir de 1.702 g KH_2PO_4 en 250 ml d'aigua a pH 4.7 (solució A), per altra banda es pesa 2.225 g de Na_2HPO_4 en 250 ml d'aigua pH 9.2 (solució B). Es barreja 1A amb 1.5B: a 40 ml de A s'afegeixen 60 ml de B fins a pH 7. Es guarda a nevera.

- H_2O_2 30 mM, 34 μl H_2O_2 (nevera) en 10 ml tampó fosfat. Es prepara el dia de l'assaig, i no es conserva.
- Catalasa 4000 U/ml, 2 mg catalasa 20000 U/mg en 10 ml de tampó fosfat. Es fan aliquotes de 200 μl en *ependorffs* i es mantenen congelades a -20°C .
- Catalasa 4 U/ml, 20 μl catalasa 4000 U/ml en 20 ml de tampó fosfat. Es prepara el dia de l'assaig.

Mètode:

- S'homogeneïtza 100 mg de teixit en 1 ml de tampó fosfat 50 mM pH 7.
- Es centrifuga durant 5 min a 12000rpm. a 4°C . En aquest punt el sobrenedant es pot guardar al congelador de -20°C .
- Es determina el coeficient d'extinció de H_2O_2 , es fa una lectura de H_2O_2 30 mM en Abs. Pel blanc es llegeix 1350 μl de tampó. Per la mostra 900 μl de tampó i 450 μl de H_2O_2 30 mM. Pels càlculs del coeficient d'extinció: Abs/conc. H_2O_2 (M).
- Es determina la catalasa patró, es fa auto zero: pel blanc es llegeix 900 μl catalasa 4 U/ml i 450 μl de tampó; per la mostra, 900 μl catalasa 4 U/ml en 450 μl de tampó. Per a fer la lectura de la catalasa en $\Delta\text{Abs}/\text{min}$, pel blanc es fa el mateix que l'auto zero i per la mostra 900 μl de catalasa 4U/ml i 450 de H_2O_2 .
- Es prepara la dilució del sobrenadant 1/100, 30 μl de sobrenadant en 3000 μl de tampó fosfat.
- Es determina la catalasa de la mostra, es fa auto zero, tant en el lloc del blanc com de la mostra es posa 900 μl de sobrenadant (1/100) en 450 μl de tampó. Per la lectura de la mostra en $\Delta\text{Abs}/\text{min}$, es fa en el lloc del blanc el mateix que l'auto zero i la lectura de la mostra es fa amb 900 μl de sobrenadant (1/100) en 450 μl de H_2O_2 .

6. Assaigs in vivo

6.1 Animals diabètics

Material:

- Estreptozotocina (STZ).
- Xeringues de 2ml.
- Solució cítric/citrat pH: 4.5.

Mètode:

- Es dejunen els animals a injectar durant 10 hores.
- Es prepara la solució de cítric/citrat (0.525 g/ 0.735 g per 50 ml) a pH: 4.5 i es filtra.
- Es pesa la quantitat necessària de STZ depenent del número d'animals que s'hagin d'injectar (100 mg/ Kg).
- Es dissol la STZ a la solució de cítric/citrat al moment abans d'injectar.
- Es repeteix el protocol durant dos dies.
- El dia 15 post-injecció s'obté el fetge per dislocació cervical.

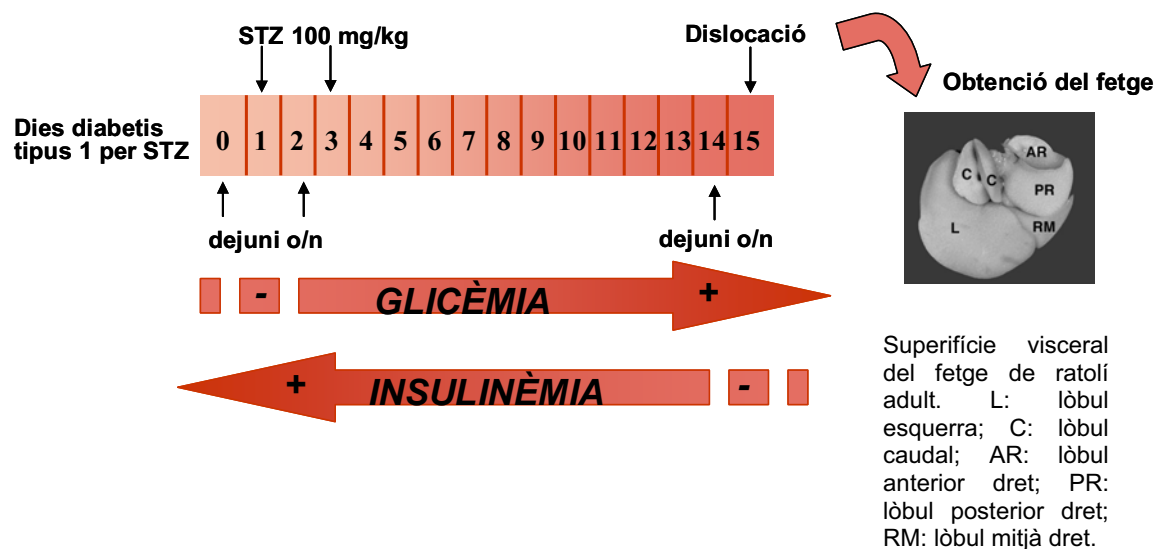


Fig. 1. Protocol d'injecció d'estreptozotocina i obtenció del fetge.

6.2 Transferència gènica per hidrodinàmia**Material:**

- Solució salina.
- Xeringues de 2 ml.
- Aigua calenta.
- Ratolins.

Mètode:

- Per tal de transfectar un plasmidi in vivo s'utilitza la tècnica de la transfecció hidrodinàmica per la cua del ratolí.

- Depenent del pes de l'animal s'injectarà un volum final o un altre (10% del pes del ratolí) però mantenint sempre la quantitat de plasmidi (30 µg).
- El primer pas és dilatar les venes de la cua del ratolí per a facilitar la injecció.
- S'immobilitza el ratolí i s'escalfa la cua durant un segons. Es realitza la punció per la vena de la cua més visible i s'injecta tot el volum d'un sol cop.
- Com que el primer pas d'aquesta injecció és el fetge, aquest òrgan es transfectarà per osmosi.
- Un cop realitzat el període de dejú s'eutanàsia per dislocació cervical i s'obté el lòbul caudal a partir de qual es realitzarà l'assaig d'activitat luciferasa.

7. Taula de plasmidis

Nom plasmidi	proteïna	promotor
<i>Pfkfb3/-3566</i>	luciferasa	<i>Pfkfb3</i>
<i>Pfkfb3/-2494</i>	luciferasa	<i>Pfkfb3</i>
<i>Pfkfb3/-1408</i>	luciferasa	<i>Pfkfb3</i>
<i>Pfkfb3/-1198</i>	luciferasa	<i>Pfkfb3</i>
<i>Pfkfb3/-938</i>	luciferasa	<i>Pfkfb3</i>
<i>Pfkfb3/-648</i>	luciferasa	<i>Pfkfb3</i>
<i>Pfkfb3/-247</i>	luciferasa	<i>Pfkfb3</i>
<i>Pfkfb3/-148</i>	luciferasa	<i>Pfkfb3</i>
<i>Pfkfb3/-55</i>	luciferasa	<i>Pfkfb3</i>
29Wt-cfos	luciferasa	c-fos/HRE
29Mut-cfos	luciferasa	c-fos/HRE
pCDNA3-HA-HIF-1 α (401 Δ 603)	HIF-1 α (401 Δ 603)	CMV
pCDNA3-HIF-1 β	HIF-1 β	CMV

Taula 2. Plasmidis utilitzats, proteïna que expressen i promotor del qual depenen.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA**A**

Arizmendi, C., Liu, S., Croniger, C., Poli, V. and Friedman, J.E.: The transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein beta regulates gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *J Biol Chem* 274 (1999) 13033-40.

Arsura, M. and Cavin, L.G.: Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 229 (2005) 157-69.

Atsumi, T., Chesney, J., Metz, C., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., Mitchell, R. and Bucala, R.: High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res* 62 (2002) 5881-7.

B

Baer, S.C., Casaubon, L. and Younes, M.: Expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in cutaneous neoplasia. *J Am Acad Dermatol* 37 (1997) 575-7.

Band, C.J., Mounier, C. and Posner, B.I.: Epidermal growth factor and insulin-induced deoxyribonucleic acid synthesis in primary rat hepatocytes is phosphatidylinositol 3-kinase dependent and dissociated from protooncogene induction. *Endocrinology* 140 (1999) 5626-34.

Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R. and Koike, T.: Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 5784-92.

Bares, R., Dohmen, B.M., Cremerius, U., Fass, J., Teusch, M. and Bull, U.: [Results of positron emission tomography with fluorine-18 labeled fluorodeoxyglucose in differential diagnosis and staging of pancreatic carcinoma]. *Radiologe* 36 (1996) 435-40.

Bartrons, R., Hue, L., Van Schaftingen, E. and Hers, H.G.: Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Journal* 214 (1983) 829-37.

Baulida, J., Onetti, R. and Bassols, A.: Effects of epidermal growth factor on glycolysis in A431 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183 (1992) 1216-23.

Beitner, R.: the role of glucose-1,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism in muscle. *Trends in Biochemical Science* 4 (1979) 228.

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E. and Vousden, K.H.: TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126 (2006) 107-20.

Bishop, J.M.: Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64 (1991) 235-48.

Blum, R., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G. and Kloog, Y.: Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha, causing glycolysis shutdown and cell death. *Cancer Res* 65 (2005) 999-1006.

Bobarykina, A.Y., Minchenko, D.O., Opentanova, I.L., Moenner, M., Caro, J., Esumi, H. and Minchenko, O.H.: Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. *Acta Biochim Pol* 53 (2006) 789-99.

Boros, L.G., Puigjaner, J., Cascante, M., Lee, W.N., Brandes, J.L., Bassilian, S., Yusuf, F.I., Williams, R.D., Muscarella, P., Melvin, W.S. and Schirmer, W.J.: Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation [see comments]. *Cancer Research* 57 (1997) 4242-8.

Bosca, L., Aragon, J.J. and Sols, A.: Fructose 2,6-bisphosphate and enzymatic activities for its metabolism in ascites tumor. *Current Topics in Cellular Regulation* 27 (1985a) 411-8.

Bosca, L., Mojena, M., Diaz-Guerra, J.M. and Marquez, C.: Phorbol 12,13-dibutyrate and mitogens increase fructose 2,6-bisphosphate in lymphocytes. Comparison of lymphocyte and rat-liver 6-phosphofructo-2-kinase. *European Journal of Biochemistry* 175 (1988) 317-23.

Bosca, L., Mojena, M., Ghysdael, J., Rousseau, G.G. and Hue, L.: Expression of the v-src or v-fps oncogene increases fructose 2,6-bisphosphate in chick-embryo fibroblasts. Novel mechanism for the stimulation of glycolysis by retroviruses. *Biochemical Journal* 236 (1986) 595-9.

Bosca, L., Rousseau, G.G. and Hue, L.: Phorbol 12-myristate 13-acetate and insulin increase the concentration of fructose 2,6-bisphosphate and stimulate glycolysis in chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (1985b) 6440-4.

Braeuning, A., Ittrich, C., Kohle, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A. and Schwarz, M.: Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *Febs J* 273 (2006) 5051-61.

Bruni, P., Farnararo, M., Vasta, V. and D'Alessandro, A.: Increase of the glycolytic rate in human resting fibroblasts following serum stimulation. The possible role of the fructose-2,6-bisphosphate. *Febs Letters* 159 (1983) 39-42.

Bruni, P., Vasta, V. and Farnararo, M.: Regulation of fructose 2,6-bisphosphate metabolism in human fibroblasts. *Biochimica Et Biophysica Acta* 887 (1986) 23-8.

Bruni, P., Vasta, V. and Farnararo, M.: Adenylate cyclase stimulating agents and mitogens raise fructose 2,6-bisphosphate levels in human fibroblasts. Evidence for a dual control of the metabolite. *Febs Letters* 222 (1987) 27-31.

Bustamante, E. and Pedersen, P.L.: High aerobic glycolysis in rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (1977) 3735.

Bustamante, E. and Pedersen, P.L.: Mitochondrial hexokinase of rat hepatoma cells in culture: solubilization and kinetic properties. *Biochemistry* 19 (1980) 4972.

C

Calvo, M.N., Bartrons, R., Castano, E., Perales, J.C., Navarro-Sabate, A. and Manzano, A.: PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay

and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett* 580 (2006) 3308-14.

Cantuaria, G., Fagotti, A., Ferrandina, G., Magalhaes, A., Nadji, M., Angioli, R., Penalver, M., Mancuso, S. and Scambia, G.: GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. *Cancer* 92 (2001) 1144-50.

Carling, D., Clarke, P.R., Zammit, V.A. and Hardie, D.G.: Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. *European Journal of Biochemistry* 186 (1989) 129-136.

Cascales, M., Martin-Sanz, P. and Bosca, L.: Phorbol esters, bombesin and insulin elicit differential responses on the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase system in primary cultures of foetal and adult rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* 207 (1992) 391-7.

Cianfrocca, M. and Goldstein, L.J.: Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 9 (2004) 606-16.

Colomer, D., Vives Corrons, J.L. and Bartrons, R.: Effect of TPA on fructose 2,6-bisphosphate levels and protein kinase C activity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Biochimica Et Biophysica Acta* 1097 (1991) 270-4.

Colomer, D., Vives-Corrons, J.L., Pujades, A. and Bartrons, R.: Control of phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate in B-lymphocytes and B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Research* 47 (1987) 1859-62.

Conti, P.S., Lilien, D.L., Hawley, K., Keppler, J., Grafton, S.T. and Bading, J.R.: PET and [18F]-FDG in oncology: a clinical update. *Nucl Med Biol* 23 (1996) 717-35.

Coutant, A., Rescan, C., Gilot, D., Loyer, P., Guguen-Guillouzo, C. and Baffet, G.: PI3K-FRAP/mTOR pathway is critical for hepatocyte proliferation whereas MEK/ERK supports both proliferation and survival. *Hepatology* 36 (2002) 1079-88.

Crabtree, H.G.: Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 23 (1929) 536-45.

Chan, D.A., Sutphin, P.D., Denko, N.C. and Giaccia, A.J.: Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 277 (2002) 40112-7.

Chance, B.: Was Warburg right? Or was it that simple? *Cancer Biol Ther* 4 (2005) 125-6.

Chesney, J., Mitchell, R., Benigni, F., Bacher, M., Spiegel, L., Al-Abed, Y., Han, J.H., Metz, C. and Bucala, R.: An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999) 3047-52.

Chevrollier, A., Loiseau, D., Chabi, B., Renier, G., Douay, O., Malthiery, Y. and Stepien, G.: ANT2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J Bioenerg Biomembr* 37 (2005) 307-16.

Cho, M.K. and Kim, S.G.: Hepatocyte growth factor activates CCAAT enhancer binding protein and cell replication via PI3-kinase pathway. *Hepatology* 37 (2003) 686-95.

D

Dabrosin, C.: Increased extracellular local levels of estradiol in normal breast in vivo during the luteal phase of the menstrual cycle. *J Endocrinol* 187 (2005) 103-8.

Dachs, G.U., Patterson, A.V., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J., Townsend, K.M., Stratford, I.J. and Harris, A.L.: Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat Med* 3 (1997) 515-20.

Dalmau, M., Bartrons, R. and Gil, J.: Control of fructose 2,6-bisphosphate metabolism by different mitogenic signals in Swiss 3T3 fibroblasts. *Experimental Cell Research* 212 (1994) 93-6.

Dang, C.V. and Semenza, G.L.: Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24 (1999) 68-72.

Darville, M.I., Crepin, K.M., Hue, L. and Rousseau, G.G.: 5' flanking sequence and structure of a gene encoding rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989) 6543-7.

Darville, M.I., Chikri, M., Lebeau, E., Hue, L. and Rousseau, G.G.: A rat gene encoding heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Febs Letters* 288 (1991) 91-4.

Denis, C., Paris, H. and Murat, J.C.: Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in the HT29 human colon adenocarcinoma cell line. Alpha 2-adrenergic agonists counteract effect of vasoactive intestinal peptide. *Biochemical Journal* 239 (1986) 531-6.

Denis-Pouxviel, C., Gauthier, T., Daviaud, D. and Murat, J.C.: Phosphofructokinase 2 and glycolysis in HT29 human colon adenocarcinoma cell line. Regulation by insulin and phorbol esters. *Biochemical Journal* 268 (1990) 465-70.

Dentin, R., Pegorier, J.P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferre, P., Fauveau, V., Magnuson, M.A., Girard, J. and Postic, C.: Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 279 (2004) 20314-26.

Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L. and Rider, M.H.: Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem* 272 (1997) 17269-75.

Dhabbi, J.M., Mote, P.L., Cao, S.X. and Spindler, S.R.: Hepatic gene expression profiling of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Technol Ther* 5 (2003) 411-20.

Di Chiro, G., DeLaPaz, R.L., Brooks, R.A., Sokoloff, L., Kornblith, P.L., Smith, B.H., Patronas, N.J., Kufta, C.V., Kessler, R.M., Johnston, G.S., Manning, R.G. and Wolf, A.P.: Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [¹⁸F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology* 32 (1982) 1323-9.

Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A. and Nebreda, A.R.: p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 11 (2007) 191-205.

Dupriez, V.J., Darville, M.I., Antoine, I.V., Gegonne, A., Ghysdael, J. and Rousseau, G.G.: Characterization of a hepatoma mRNA transcribed from a third promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-encoding gene and controlled by ets oncogene-related products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (1993) 8224-8.

E

Eigenbrodt, E., Gerbrach, U., Mazurek, S., Presek, P. and Friis, R.: *Carbohydrate Metabolism and Neoplasia: New Perspectives for Diagnosis and Therapy*. Academic Press, San Diego, 1994.

El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., Pilkis, J., Fox, E. and Pilkis, S.J.: Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982) 7603-7.

Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M. and Thompson, C.B.: Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64 (2004) 3892-9.

Exton, J.H.: Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetes/Metabolism Reviews* 3 (1987) 163-83.

Farnararo, M., Vasta, V., Bruni, P. and D'Alessandro, A.: The effect of insulin on Fructose-2,6-bisphosphate levels in human fibroblasts. *Febs Letters* 171 (1984) 117-20.

F

Fernandez de Mattos, S., Lam, E.W. and Tauler, A.: An E2F-binding site mediates the activation of the proliferative isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J* 368 (2002) 283-91.

Fister, P., Eigenbrodt, E., Presek, P., Renacher, M. and Schoner, W.: Pyruvate kinase M2 is phosphorylated in intact chicken liver cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 115 (1983) 409.

Foulstone, E., Prince, S., Zaccheo, O., Burns, J.L., Harper, J., Jacobs, C., Church, D. and Hassan, A.B.: Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol* 205 (2005) 145-53.

Fry, C.J. and Farnham, P.J.: Context-dependent transcriptional regulation. *J Biol Chem* 274 (1999) 29583-6.

Fukasawa, M., Takayama, E., Shinomiya, N., Okumura, A., Rokutanda, M., Yamamoto, N. and Sakakibara, R.: Identification of the promoter region of human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267 (2000) 703-8.

Fukasawa, M., Tsuchiya, T., Takayama, E., Shinomiya, N., Uyeda, K., Sakakibara, R. and Seki, S.: Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J Biochem (Tokyo)* 136 (2004) 273-7.

G

Garber, K.: Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J Natl Cancer Inst* 96 (2004) 1805-6.

- Garber, K.: Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 312 (2006) 1158-9.
- Gatenby, R.A.: The potential role of transformation-induced metabolic changes in tumor-host interaction. *Cancer Research* 55 (1995) 4151-6.
- Gatenby, R.A. and Gillies, R.J.: Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 891-9.
- Gebhardt, R.: Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 53 (1992) 275-354.
- Gillespie, K.M.: Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *Cmaj* 175 (2006) 165-70.
- Goldberg, M.A., Imagawa, S., Strair, R.K. and Bunn, H.F.: Regulation of the erythropoietin gene in Hep 3B cells. *Semin Hematol* 28 (1991) 35-40; discussion 40-1.
- Gomez-Valades, A.G., Vidal-Alabro, A., Molas, M., Boada, J., Bermudez, J., Bartrons, R. and Perales, J.C.: Overcoming diabetes-induced hyperglycemia through inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) with RNAi. *Mol Ther* 13 (2006) 401-10.
- Gonzalez-Cinca, N., Rivera, F., Carreras, J. and Climent, F.: Effects of hypoxia and thyroid hormone on mRNA levels and activity of phosphoglycerate mutase in rabbit tissues. *Horm Res* 59 (2003) 16-20.
- Groshong, S.D., Owen, G.I., Grimison, B., Schauer, I.E., Todd, M.C., Langan, T.A., Sclafani, R.A., Lange, C.A. and Horwitz, K.B.: Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Mol Endocrinol* 11 (1997) 1593-607.
- H**
- Haber, R.S., Rathan, A., Weiser, K.R., Pritsker, A., Itzkowitz, S.H., Bodian, C., Slater, G., Weiss, A. and Burstein, D.E.: GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer* 83 (1998) 34-40.
- Hamilton, J.A., Callaghan, M.J., Sutherland, R.L. and Watts, C.K.: Identification of PRG1, a novel progestin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Molecular Endocrinology* 11 (1997) 490-502.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (2000) 57-70.
- Hardie, D.G.: The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117 (2004) 5479-87.
- Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M.: The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67 (1998) 821-55.
- Hay, N. and Sonenberg, N.: Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18 (2004) 1926-45.
- Hennighausen, L. and Robinson, G.W.: Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev* 12 (1998) 449-55.

Hennipman, A., van Oirschot, B.A., Smits, J., Rijksen, G. and Staal, G.E.: Glycolytic enzyme activities in breast cancer metastases. *Tumour Biol* 9 (1988) 241-8.

Hernandez-Alcoceba, R., Pihalja, M., Nunez, G. and Clarke, M.F.: Evaluation of a new dual-specificity promoter for selective induction of apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 8 (2001) 298-307.

Herrman, C.E., Sanders, R.A., Klaunig, J.E., Schwarz, L.R. and Watkins, J.B., 3rd: Decreased apoptosis as a mechanism for hepatomegaly in streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicol Sci* 50 (1999) 146-51.

Hirata, T., Watanabe, M., Miura, S., Ijichi, K., Fukasawa, M. and Sakakibara, R.: Inhibition of tumor cell growth by a specific 6-phosphofructo-2-kinase inhibitor, N-bromoacetyethanolamine phosphate, and its analogues. *Biosci Biotechnol Biochem* 64 (2000) 2047-52.

Ho, E., Chen, G. and Bray, T.M.: Alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) inhibits NFkappaB activation offering protection against chemically induced diabetes. *Free Radic Biol Med* 28 (2000) 604-14.

Horecker, B.L. and Hiatt, H.H.: Pathways of carbohydrate metabolism in normal and neoplastic cells. *N Engl J Med* 258 (1958) 225-32 concl.

Hue, L. and Rider, M.H.: Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochemical Journal* 245 (1987) 313-24.

Hue, L., Rider, M.H. and Rousseau, G.G.: Fructose-2,6-bisphosphate in extra-hepatic tissues. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990.

Hue, L. and Rousseau, G.G.: Fructose 2,6-bisphosphate and the control of glycolysis by growth factors, tumor promoters and oncogenes. *Advances in Enzyme Regulation* 33 (1993) 97-110.

Hulthen, U.L., Cao, Z., Rumble, J.R., Cooper, M.E. and Johnston, C.I.: Vascular hypertrophy and albumin permeability in a rat model combining hypertension and diabetes mellitus. Effects of calcium antagonism, angiotensin converting enzyme inhibition, and angiotensin II-AT1-receptor blockade. *Am J Hypertens* 9 (1996) 895-901.

Hunt, J.V., Smith, C.C. and Wolff, S.P.: Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39 (1990) 1420-4.

I

Ibsen, K.H., Orlando, R.A., Garratt, K.N., Hernandez, A.M., Giorlando, S. and Nungarau, G.: Expression of multimolecular forms of pyruvate kinase in normal, benign and malignant human breast tissue. *Cancer Research* 42 (1983) 888.

Imagawa, M., Chiu, R. and Karin, M.: Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51 (1987) 251-60.

Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K.L.: TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115 (2003) 577-90.

Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y. and Semenza, G.L.: Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12 (1998) 149-62.

J

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J.: Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292 (2001) 468-72.

Jacobs, M.L., Chandrashekar, V., Bartke, A. and Weber, R.F.: Early effects of streptozotocin-induced diabetes on insulin-like growth factor-I in the kidneys of growth hormone-transgenic and growth hormone-deficient dwarf mice. *Exp Nephrol* 5 (1997) 337-44.

Jeng, M.H., Parker, C.J. and Jordan, V.C.: Estrogenic potential of progestins in oral contraceptives to stimulate human breast cancer cell proliferation. *Cancer Res* 52 (1992) 6539-46.

Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R. and Semenza, G.L.: Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271 (1996) 17771-8.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J. and Thompson, C.B.: AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18 (2005) 283-93.

Jungermann, K.: Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem Cell Biol* 103 (1995) 81-91.

Jungermann, K. and Katz, N.: Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev* 69 (1989) 708-64.

Jungermann, K. and Kietzmann, T.: Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 16 (1996) 179-203.

K

Kang, S.S., Chun, Y.K., Hur, M.H., Lee, H.K., Kim, Y.J., Hong, S.R., Lee, J.H., Lee, S.G. and Park, Y.K.: Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 93 (2002) 1123-8.

Ke, Q. and Costa, M.: Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70 (2006) 1469-80.

Kessler, R. and Eschrich, K.: Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6- bisphosphatase in human brain. *Brain Research. Molecular Brain Research* 87 (2001) 190-5.

Kim, J.W. and Dang, C.V.: Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 66 (2006) 8927-30.

Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L. and Dang, C.V.: HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3 (2006a) 177-85.

Kim, J.W., Zeller, K.I., Wang, Y., Jegga, A.G., Aronow, B.J., O'Donnell, K.A. and Dang, C.V.: Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 5923-36.

Kim, S.G., Manes, N.P., El-Maghrabi, M.R. and Lee, Y.H.: Crystal structure of the hypoxia-inducible form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3): a possible new target for cancer therapy. *J Biol Chem* 281 (2006b) 2939-44.

Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H. and Uyeda, K.: Phosphorylation of myocardial fructose-6-phosphate,2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Activation by phosphorylation and amino acid sequences of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* 263 (1988) 16796-801.

Kole, H.K., Resnick, R.J., Van Doren, M. and Racker, E.: Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in ras-transformed rat-1 fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 286 (1991a) 586-90.

Kole, H.K., Resnick, R.J., Van Doren, M. and Racker, E.: Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in ras-transformed rat-1 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 286 (1991b) 586-90.

Kopnin, B.P.: Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)* 65 (2000) 2-27.

Koshikawa, N., Takenaga, K., Tagawa, M. and Sakiyama, S.: Therapeutic efficacy of the suicide gene driven by the promoter of vascular endothelial growth factor gene against hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 60 (2000) 2936-41.

Krebs, H.A.: The effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays in Biochemistry* 8 (1972) 1.

Kurebayashi, J.: Resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 56 Suppl 1 (2005) 39-46.

L

Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A.: Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222 (1983) 771-778.

Lefebvre, V., Mechin, M.C., Louckx, M.P., Rider, M.H. and Hue, L.: Signaling pathway involved in the activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by insulin. *J Biol Chem* 271 (1996) 22289-92.

Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., Slingerland, J.M. and Mills, G.B.: The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 9 (2007) 218-24.

Loiseau, A.M., Rousseau, G.G. and Hue, L.: Fructose 2,6-bisphosphate and the control of glycolysis by glucocorticoids and by other agents in rat hepatoma cells. *Cancer Research* 45 (1985) 4263-9.

Lu, H., Forbes, R.A. and Verma, A.: Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277 (2002) 23111-5.

Lydon, J.P., Sivaraman, L. and Conneely, O.M.: A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5 (2000) 325-38.

M

Macallan, D.C., Fullerton, C.A., Neese, R.A., Haddock, K., Park, S.S. and Hellerstein, M.K.: Measurement of cell proliferation by labeling of DNA with stable isotope-labeled glucose: studies in vitro, in animals, and in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 708-13.

Macheda, M.L., Rogers, S. and Best, J.D.: Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* 202 (2005) 654-62.

Manzano, A., Perez, J.X., Nadal, M., Estivill, X., Lange, A. and Bartrons, R.: Cloning, expression and chromosomal localization of a human testis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Gene* 229 (1999) 83-9.

Manzano, A., Rosa, J.L., Ventura, F., Perez, J.X., Nadal, M., Estivill, X., Ambrosio, S., Gil, J. and Bartrons, R.: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphatase gene (PFKFB3). *Cytogenetics and Cell Genetics* 83 (1998) 214-7.

Marchand, M.J., Maisin, L., Hue, L. and Rousseau, G.G.: Activation of 6-phosphofructo-2-kinase by pp60v-src is an indirect effect. *Biochemical Journal* 285 (Pt 2) (1992) 413-7.

Marignol, L., Lawler, M., Coffey, M. and Hollywood, D.: Achieving hypoxia-inducible gene expression in tumors. *Cancer Biol Ther* 4 (2005) 359-64.

Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D. and Hue, L.: Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology* 10 (2000) 1247-55.

Marsin, A.S., Bouzin, C., Bertrand, L. and Hue, L.: The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* 277 (2002) 30778-83.

Mathupala, S.P., Heese, C. and Pedersen, P.L.: Glucose metabolism in cancer cells: the type-II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor supresor p53. *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 22776.

Mathupala, S.P., Ko, Y.H. and Pedersen, P.L.: Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* 25 (2006) 4777-86.

Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F. and Hwang, P.M.: p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312 (2006) 1650-3.

Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J.: Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 2423-7.

Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J.: The pVHL-hIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv Exp Med Biol* 502 (2001) 365-76.

Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Durr, P. and Eigenbrodt, E.: Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene* 20 (2001) 6891-8.

McGuire, W.L., Fojo, A., Goldie, J.H. and Ozols, R.: Chemotherapy drug resistance--a panel discussion. *Breast Cancer Res Treat* 10 (1987) 133-44.

Medina, M.A.: Glutamine and cancer. *J Nutr* 131 (2001) 2539S-42S; discussion 2550S-1S.

Michiels, C., Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Piret, J.P. and Raes, M.: HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life* 52 (2001) 49-53.

Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V. and Caro, J.: Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem* 277 (2002) 6183-7.

Minchenko, O., Opentanova, I. and Caro, J.: Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett* 554 (2003) 264-70.

Miralpeix, M., Azcon-Bieto, J., Bartrons, R. and Argiles, J.M.: The impairment of respiration by glycolysis in the Lewis lung carcinoma. *Cancer Letters* 50 (1990) 173-8.

Mojena, M., Bosca, L. and Hue, L.: Effect of glutamine on fructose 2,6-bisphosphate and on glucose metabolism in HeLa cells and in chick-embryo fibroblasts. *Biochemical Journal* 232 (1985) 521-7.

Montcourrier, P., Silver, I., Farnoud, R., Bird, I. and Rochefort, H.: Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* 15 (1997) 382-92.

N

Navarro-Sabaté, A., Manzano, A., Riera, L. and Bartrons, R.: The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene* 264 (2001) 131-137.

Neville, M.C., McFadden, T.B. and Forsyth, I.: Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7 (2002) 49-66.

Nishimura, M., Fedorov, S. and Uyeda, K.: Glucose-stimulated synthesis of fructose 2,6-bisphosphate in rat liver. Dephosphorylation of fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase and activation by a sugar phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 26100-6.

O

Obach, M., Navarro-Sabate, A., Caro, J., Kong, X., Duran, J., Gomez, M., Perales, J.C., Ventura, F., Rosa, J.L. and Bartrons, R.: 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* 279 (2004) 53562-70.

Ogawa, J., Inoue, H. and Koide, S.: Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int J Cancer* 74 (1997) 189-92.

Okamura, N. and Sakakibara, R.: A common phosphorylation site for cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C in human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62 (1998) 2039-42.

Okar, D., Manzano, A., Navarro-Sabaté, A., Riera, L., Bartrons, R. and Lange, A.J.: PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *TRENDS in Biochemical Science* 26 (2001) 30-35.

Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A. and Dang, C.V.: Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 275 (2000) 21797-800.

P

Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L. and Denko, N.C.: HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3 (2006) 187-97.

Park, K.S., Kim, N.G., Kim, J.J., Kim, H., Ahn, Y.H. and Choi, K.Y.: Differential regulation of MAP kinase cascade in human colorectal tumorigenesis. *Br J Cancer* 81 (1999) 1116-21.

Patterson, A.V., Williams, K.J., Cowen, R.L., Jaffar, M., Telfer, B.A., Saunders, M., Airley, R., Honess, D., van der Kogel, A.J., Wolf, C.R. and Stratford, I.J.: Oxygen-sensitive enzyme-prodrug gene therapy for the eradication of radiation-resistant solid tumours. *Gene Ther* 9 (2002) 946-54.

Peet, D. and Linke, S.: Regulation of HIF: asparaginyl hydroxylation. *Novartis Found Symp* 272 (2006) 37-49; discussion 49-53, 131-40.

Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R.H. and Huang, P.: Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25 (2006) 4633-46.

Pfeiffer, T., Schuster, S. and Bonhoeffer, S.: Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292 (2001) 504-7.

Pilkis, S.J.: Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Review of Biochemistry* 57 (1988) 755-783.

Pilkis, S.J., Claus, T.H., Kurland, I.J. and Lange, A.J.: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annual Review of Biochemistry* 64 (1995) 799-835.

Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J. and Claus, T.H.: Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 256 (1981a) 3610.

Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., Claus, T.H. and Cumming, D.A.: Fructose-2,6-bisphosphate. a new activator of phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry* 256 (1981b) 3171.

Plas, D.R. and Thompson, C.B.: Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24 (2005) 7435-42.

Ponticos, M., Lu, Q.L., Morgan, J.E., Hardie, D.G., Partridge, T.A. and Carling, D.: Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO Journal* 17 (1998) 1688-1699.

Pozuelo Rubio, M., Pegg, M., Wong, B.H., Morrice, N. and MacKintosh, C.: 14-3-3s regulate fructose-2,6-bisphosphate levels by binding to PKB-phosphorylated cardiac fructose-2,6-bisphosphate kinase/phosphatase. *Embo J* 22 (2003) 3514-23.

Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M. and Ratcliffe, P.J.: Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272 (1997) 11205-14.

Q

Qiao, L., MacDougald, O.A. and Shao, J.: CCAAT/enhancer-binding protein alpha mediates induction of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281 (2006) 24390-7.

R

Rajendran, J.G., Mankoff, D.A., O'Sullivan, F., Peterson, L.M., Schwartz, D.L., Conrad, E.U., Spence, A.M., Muzi, M., Farwell, D.G. and Krohn, K.A.: Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 2245-52.

Rempel, A., Mathupala, S.P., Griffin, C.A., Hawkins, A.L. and Pedersen, P.L.: Glucose catabolism in cancer cells: Amplification of the gene encoding type II hexokinase. *Cancer Research* 56 (1996) 2468.

Rider, M.H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P.A., Rousseau, G.G. and Hue, L.: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 381 (2004) 561-79.

Rider, M.H., van Damme, J., Vertommen, D., Michel, A., Vandekerckhove, J. and Hue, L.: Evidence for new phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett* 310 (1992) 139-42.

Riera, L., Manzano, A., Navarro-Sabate, A., Perales, J.C. and Bartrons, R.: Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1589 (2002) 89-92.

Riera, L., Obach, M., Navarro-Sabate, A., Duran, J., Perales, J.C., Vinals, F., Rosa, J.L., Ventura, F. and Bartrons, R.: Regulation of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway during myogenic C2C12 cell differentiation. *FEBS Lett* 550 (2003) 23-9.

Rousseau, G.G. and Hue, L.: Mammalian 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 45 (1993) 99-127.

Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G. and Sloane, B.F.: Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res* 54 (1994) 6517-25.

Ruley, H.E.: Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304 (1983) 602-606.

S

Sakai, A., Kato, M., Fukasawa, M., Ishiguro, M., Furuya, E. and Sakakibara, R.: Cloning of cDNA encoding for a novel isozyme of fructose 6-phosphate, 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase from human placenta. *Journal of Biochemistry* 119 (1996) 506-11.

Sakakibara, R., Kato, M., Okamura, N., Nakagawa, T., Komada, Y., Tominaga, N., Shimojo, M. and Fukasawa, M.: Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Journal of Biochemistry* 122 (1997) 122-8.

Sakata, J., Abe, Y. and Uyeda, K.: Molecular cloning of the cDNA and expression and characterization of rat testis fructose-6-phosphate-2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) 15764-15770.

Salceda, S. and Caro, J.: Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272 (1997) 22642-7.

Sanchez-Martinez, C. and Aragon, J.J.: Analysis of phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, murine mammary gland. *FEBS Lett* 409 (1997) 86-90.

Schering, B., Eigenbrodt, E., Linder, D. and Schoner, W.: Purification and properties of pyruvate kinase type M2 from rat lung. *Biochemical et Biophysical Acta* 717 (1982) 337.

Schornack, P.A. and Gillies, R.J.: Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia* 5 (2003) 135-45.

Seagroves, T.N., Ryan, H.E., Lu, H., Wouters, B.G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K. and Johnson, R.S.: Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 3436-44.

Semenza, G.L.: HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 13 (2001) 167-71.

Semenza, G.L.: HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 8 (2002) S62-7.

Semenza, G.L.: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 721-32.

Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P. and Giallongo, A.: Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271 (1996) 32529-37.

Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M. and Wang, G.L.: Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269 (1994) 23757-63.

Shankar, K., Vaidya, V.S., Apte, U.M., Manautou, J.E., Ronis, M.J., Bucci, T.J. and Mehendale, H.M.: Type 1 diabetic mice are protected from acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 73 (2003) 220-34.

Shao, J., Qiao, L., Janssen, R.C., Pagliassotti, M. and Friedman, J.E.: Chronic hyperglycemia enhances PEPCK gene expression and hepatocellular glucose production via elevated liver activating protein/liver inhibitory protein ratio. *Diabetes* 54 (2005) 976-84.

Shibata, T., Giaccia, A.J. and Brown, J.M.: Hypoxia-inducible regulation of a prodrug-activating enzyme for tumor-specific gene therapy. *Neoplasia* 4 (2002) 40-8.

Shim, H., Chun, Y.S., Lewis, B.C. and Dang, C.V.: A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998) 1511-6.

Smallbone, K., Gatenby, R.A., Gillies, R.J., Maini, P.K. and Gavaghan, D.J.: Metabolic changes during carcinogenesis: Potential impact on invasiveness. *J Theor Biol* 244 (2007) 703-713.

Stewart, H.B., el-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J.: Mechanism of activation of fructose-2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 261 (1986) 8793-8.

Sugiura, T.: Cloning and functional characterization of the 5'-flanking region of the human bone morphogenetic protein-2 gene. *Biochem J* 338 (Pt 2) (1999) 433-40.

Sutherland, R.L., Hall, R.E., Pang, G.Y., Musgrove, E.A. and Clarke, C.L.: Effect of medroxyprogesterone acetate on proliferation and cell cycle kinetics of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 48 (1988) 5084-91.

Szkudelski, T.: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50 (2001) 537-46.

T

Taylor, R.W. and Turnbull, D.M.: Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6 (2005) 389-402.

Telang, S., Yalcin, A., Clem, A.L., Bucala, R., Lane, A.N., Eaton, J.W. and Chesney, J.: Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* 25 (2006) 7225-34.

U

Uyeda, K., Furuya, E. and Sherry, A.D.: The structure of "activation factor" for phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry* 256 (1981) 8679-8684.

V

Van Schaftingen, E. and Hers, H.G.: Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (1981) 2861.

Van Schaftingen, E., Hue, L. and Hers, H.G.: Control of fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. Role of low-molecular-weight stimulator of phosphofructokinase. *Biochemical Journal* 192 (1980a) 887.

Van Schaftingen, E., Hue, L. and Hers, H.G.: Study of the fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate cycle in the liver in vivo. *Biochemical Journal* 192 (1980b) 263.

Van Schaftingen, E., Jett, M.F., Hue, L. and Hers, H.G.: Control of liver 6-phosphofructo-2-kinase by fructose-2,6-bisphosphate and others effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (1981) 3483.

Ventura, F., Ambrosio, S., Bartrons, R., el-Maghrabi, M.R., Lange, A.J. and Pilkis, S.J.: Cloning and expression of a catalytic core bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209 (1995) 1140-8.

Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Gil, J. and Bartrons, R.: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in rat brain. *Biochemical Journal* 276 (Pt 2) (1991) 455-60.

Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Pilkis, S.J. and Bartrons, R.: Bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Evidence for a neural-specific isozyme. *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992) 17939-43.

Vidal, H., Crepin, K.M., Rider, M.H., Hue, L. and Rousseau, G.G.: Cloning and expression of novel isoforms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from bovine heart. *Febs Letters* 330 (1993) 329-33.

Vizan, P., Boros, L.G., Figueras, A., Capella, G., Manges, R., Bassilian, S., Lim, S., Lee, W.N. and Cascante, M.: K-ras codon-specific mutations produce distinctive metabolic phenotypes in NIH3T3 mice [corrected] fibroblasts. *Cancer Res* 65 (2005) 5512-5.

Vogelstein, B. and Kinzler, K.W.: p53 function and dysfunction. *Cell* 70 (1992) 523-6.

Vousden, K.H. and Lu, X.: Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 594-604.

W

Walenta, S., Salameh, A., Lyng, H., Evensen, J.F., Mitze, M., Rofstad, E.K. and Mueller-Klieser, W.: Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol* 150 (1997) 409-15.

Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfor, K., Rofstad, E.K. and Mueller-Klieser, W.: High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60 (2000) 916-21.

Wallace, D.C.: Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70 (2005) 363-74.

Wang, G.L., Iakova, P., Wilde, M., Awad, S. and Timchenko, N.A.: Liver tumors escape negative control of proliferation via PI3K/Akt-mediated block of C/EBP alpha growth inhibitory activity. *Genes Dev* 18 (2004) 912-25.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L.: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 5510-4.

Wang, G.L. and Semenza, G.L.: Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 268 (1993a) 21513-8.

Wang, G.L. and Semenza, G.L.: Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82 (1993b) 3610-5.

Wang, G.L. and Semenza, G.L.: General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993c) 4304-8.

Wang, G.L. and Timchenko, N.A.: Dephosphorylated C/EBPalpha accelerates cell proliferation through sequestering retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 1325-38.

Warburg, O.: *Metabolism of Tumours*. Arnold Contestable, London (1930).

Warburg, O.: On the origin of cancer cells. *Science* 123 (1956) 309-314.

Watanabe, F., Sakai, A., Furuya, E. and Uyeda, K.: Molecular cloning and tissue specific expression of fructose-6-phosphate-2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase of rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 198 (1994) 335-340.

Wiebe, J.P., Muzia, D., Hu, J., Szwajcer, D., Hill, S.A. and Seachrist, J.L.: The 4-pregnene and 5alpha-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res* 60 (2000) 936-43.

Williams, A.C., Collard, T.J. and Paraskeva, C.: An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 18 (1999) 3199-204.

Wojtczak, L., Teplova, V.V., Bogucka, K., Czyz, A., Makowska, A., Wieckowski, M.R., Duszynski, J. and Evtodienko, Y.V.: Effect of glucose and deoxyglucose on the redistribution of calcium in ehrlich ascites tumour and Zajdela hepatoma cells and its consequences for mitochondrial energetics. Further arguments for the role of Ca(2+) in the mechanism of the crabtree effect. *Eur J Biochem* 263 (1999) 495-501.

Wolff, S.P. and Dean, R.T.: Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 245 (1987) 243-50.

Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M.N.: TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124 (2006) 471-84.

Y

Yamamoto, M., Tamakawa, S., Yoshie, M., Yaginuma, Y. and Ogawa, K.: Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog* 45 (2006) 901-13.

Yonekura, Y., Benua, R.S., Brill, A.B., Som, P., Yeh, S.D., Kemeny, N.E., Fowler, J.S., MacGregor, R.R., Stamm, R., Christman, D.R. and Wolf, A.P.: Increased accumulation of 2-deoxy-2-[18F]Fluoro-D-glucose in liver metastases from colon carcinoma. *J Nucl Med* 23 (1982) 1133-7.

Younes, M., Lechago, L.V., Somoano, J.R., Mosharaf, M. and Lechago, J.: Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res* 17 (1997) 2747-50.

Young, M.E., Radda, G.K. and Leighton, B.: Activation of glycogen phosphorylase and glycogenolysis in rat skeletal muscle by AICA riboside- an activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Letters* 382 (1996) 43-47.

Younges, M., Lechago, L.V., Somoano, J.R., Mosharaf, M. and Lechago, J.: Wide Expression of the Human Erythrocyte Glucose Transporter GLUT1 in Human Cancers. *Cancer Research* 56 (1996) 1164.

Younoszai, M.K. and Parekh, V.V.: Intestinal mucosal ornithine decarboxylase and brush border membrane vesicle Na(+)-H⁺ exchange activities in diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 204 (1993) 165-71.

Z

Zdychova, J. and Komers, R.: Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res* 54 (2005) 1-16.

Zhang, G., Gao, X., Song, Y.K., Vollmer, R., Stolz, D.B., Gasiorowski, J.Z., Dean, D.A. and Liu, D.: Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* 11 (2004) 675-82.

Zhang, Z., Olland, A.M., Zhu, Y., Cohen, J., Berrodin, T., Chippari, S., Appavu, C., Li, S., Wilhem, J., Chopra, R., Fensome, A., Zhang, P., Wrobel, J., Unwalla, R.J., Lyttle, C.R. and Winneker, R.C.: Molecular and pharmacological properties of a potent and selective novel nonsteroidal progesterone receptor agonist tanaproget. *J Biol Chem* 280 (2005) 28468-75.

Zheng, C.J., Ma, N.S., Dorman, T.E., Wang, M.T., Braunschweiger, K., Soares, L., Schuster, M.K., Rothschild, C.B., Bowden, D.W., Torrey, D. and al., e.: Development of 124 sequence-tagged sites and cytogenetic localization of 127 cosmids for human chromosome 10. *Genomics* 22 (1994) 55-67.

Zimmermann, A.: Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 19 Suppl 4 (2004) iv6-10.

PUBLICACIONES

MOLTES GRÀCIES



