



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## PFKFB3: un gen clau en la reprogramació de les cèl·lules canceroses

Ana Rodríguez García

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Programa de Doctorat en Biomedicina

## **PFKFB3: un gen clau en la reprogramació de les cèl·lules canceroses**

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

Els directors de la tesi

Ana Rodríguez García

Dr. Ramon Bartrons i Bach Dra. Àurea Navarro i Sabaté

Memòria presentada per Ana Rodríguez García per optar al grau de Doctorat per la Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, maig de 2017



*Llença't,  
cada insant és únic no es repetirà*

*“Lax'n'busto”*

*A mi família,  
a Dani*



Se me hace difícil poner en palabras todos los pensamientos que pasan por mi cabeza al recordar el día a día en Bellvitge junto a todos vosotros. Para mí ha sido una gran experiencia, en la que he aprendido muchísimo tanto profesional como personalmente y que recordaré siempre. Y por fin llegó el momento de agradecer a todos los que habéis hecho que esto sea así. Los que me conocéis sabéis que no se me da muy bien expresarme así que no me alargaré mucho.

Primero de todo agradecer a mis directores de tesis. A Ramon, por darme la oportunidad de formar parte de tu grupo, por tu apoyo y consejos. A Àurea por guiarme, ayudarme, sobre todo en mis momentos de máximo estrés, y por enseñarme. Gracias a los dos porque habéis hecho posible que esta tesis saliera adelante.

A Laura, la primera persona que me enseñó a trabajar en el laboratorio. Gracias por guiarme en mis primeros experimentos, por solucionarme todas las dudas y gracias especialmente por tu paciencia conmigo. Aprendí mucho de ti. A Anna Manzano por siempre estar dispuesta a ayudarnos a todos, por darlo todo hasta conseguirlo, a pesar de tener mil cosas antes que hacer, por tu optimismo, por tu energía, te lo agradezco de verdad. A Helga, creo que no podía haber tenido mejor compañera de laboratorio, no solo por lo trabajadora que eres sino también porque eres una gran persona, me he sentido muy a gusto compartiendo laboratorio contigo y sé que llegarás muy lejos!

A Pere y a Paula, por todo vuestro trabajo con el que habéis contribuido a la tesis, sois unos currantes! A Esther Adanero, la jefa del laboratorio. Gracias por el trabajo y hacer que en el laboratorio no haya un día igual. Sin ti no sería lo mismo. Y también a todos

los que habéis pasado en algún momento u otro por el grupo, a Clàudia gracias por las ganas de trabajar y ayudar siempre.

Gracias también a Natalia y Edu, mis dos primeros compis de doctorado, por hacerlo todo más fácil. Natalia, para mí has sido muy importante en esta etapa de mi vida, empezamos esto juntas y la verdad me alegra mucho haberlo compartido contigo. Gracias por nuestras charlas, por saber que en cualquier momento podía ir hablar contigo y explicarte mis ralladas, gracias por escucharme. En fin, por ser simplemente como eres!! Edu, me alegro mucho de haberte conocido, gracias por toda tu ayuda, por ser un amigo con el que puedo contar. Tai, gracias a ti también por tu amistad, tu alegría, tus consejos y por todas las veces que he podido contar contigo. Porque hemos podido compartir tanto los buenos momentos como los menos buenos del doctorado, sobre todo en ésta última etapa... Y todo este esfuerzo ha merecido la pena. Y como no, gracias por dejarnos compartir uno de los días más importantes de tu vida, fue una gran muy emotiva!

Y los días en el lab no hubiesen sido tan divertidos sin vosotros, Betta, Sonia, Petra, Jose, Pau. Gracias por todos los momentos que hemos compartido dentro y fuera del departamento. Han sido de gran ayuda esas tardes de cervezas!! Deberíamos haber empezado antes ;). Gracias Betta, Petra, Nat por resolverme todas mis dudas de papeleo, formatos, mil cosas, sé que he sido un poco pesadita, pero siempre me habéis ayudado! Sois un amor! Y tú también Sonia!! Eres una pequeña gran persona! A Dani, que a un recuerdo lo serio que me parecías antes de conocerte. Fuiste una de las personas que más me intimidó al empezar en el laboratorio con tus típicas preguntas de "que fas", "qui et cau millor"... y a Anna Maria, la persona más organizada que conozco, gracias por estar siempre dispuestos a ayudarnos, por vuestra forma de ser, por los momentos en la salita del café, sou molt bona gent! Gracias también a Bea,

Cris, Andy, Eddie, que aunque hace tiempo que no seguís por aquí también me ayudasteis en los primeros años, sobre todo cuando empecé hacer mis experimentos, con vuestras ideas y consejos, con los protocolos... Y gracias también a Carla, Héctor, Xavi, Juan y a las nuevas incorporaciones, Jose, Cristina, Chus, Arturo. Que aunque no hemos coincidido mucho, gracias siempre por los ánimos!! También quiero agradecer a todos los "jefes" del departamento, que en algún momento u otro de estos años me habéis ayudado y a Esther Castaño y Benja por su profesionalidad a la hora de trabajar.

No solo quiero agradecer a la gente de Bellvitge, sino que también a mis amigas de siempre, porque a pesar de que todavía no tenéis muy claro lo hago en el laboratorio jeje en parte culpa mía, lo sé, por intentar desconectar cuando nos vemos, gracias por todo lo que me dais!

Y sobre todo gracias a mi familia. A mis padres, gracias por todo lo que me habéis dado, sin vosotros no hubiese llegado hasta donde estoy ahora. A mi hermana Sara, mi amiga de toda la vida, gracias por estar siempre a mi lado, por todos los momentos compartidos y por los que nos quedan. A mi hermano Raul, que cada año que pasa estamos más unidos, gracias. A mi Yaya, la más grande de todas, gracias por todos tus ánimos. A mi Yayo, que a pesar de no haber estado presente en esta etapa de mi vida, siempre creíste en mí y has cuidado de todos nosotros. Y como no, a la peque de la casa, Lucía, que alegra todos mis días. Os quiero mucho!

También quería agradecer en especial a mi madre, el pilar más grande que tengo y la persona que mejor me conoce. Gracias a tu apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, por creer en mí, por escucharme y ayudarme, por tus consejos y por la fuerza que me transmites. Eres y serás siempre un ejemplo a seguir.



Y por último, gracias a ti, Dani, una de las personas más importantes para mí. Has estado a mi lado prácticamente desde que todo esto empezó, apoyándome, dándome ánimos y confiando en mí para sacarlo adelante. Estos años no hubiesen sido igual sin ti. Porque haces que me olvida de todo cuando estoy contigo, por quererme y compartir la vida conmigo, te quiero.

# Índex de continguts

---

<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Fenotip tumoral .....</b>	<b>3</b>
1.1 Activació de senyals de proliferació .....	4
1.2 Evasió de senyals antiproliferatius .....	5
1.3 Resistència a l'apoptosi .....	6
1.4 Potencial replicatiu il·limitat.....	7
1.5 Inducció de l'angiogènesi.....	7
1.6 Activació de la invasió i metàstasi .....	8
1.7 Evasió de la destrucció pel sistema immune .....	8
1.8 Fenotip glicolític .....	9
1.9 Inestabilitat genòmica i mutació .....	10
1.10 Inflamació promoguda pel tumor.....	10
1.11 Microambient tumoral .....	11
<b>2. El paper de la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses .....</b>	<b>14</b>
2.1 Metabolisme de la glucosa.....	20
2.2 El metabolisme glicolític del càncer com una perspectiva terapèutica ..	25
2.2.1 Transportadors de glucosa (GLUTs) .....	25
2.2.2 Hexoquinasa II (HK-II).....	25
2.2.3 Piruvat quinasa (PK).....	26

2.2.4 Fosfofructoquinasa 1 (PFK-1).....	27
2.2.5 Lactat deshidrogenasa (LDH).....	27
2.2.6 6-fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2) ...	28
<b>2.3 Oncogens, gens supressors de tumors i vies de senyalització implicades en la reprogramació metabòlica .....</b>	<b>28</b>
2.3.1 HIF-1 $\alpha$ .....	28
2.3.2 AMPK .....	30
2.3.3 Via de PI3K/Akt/mTOR.....	30
2.3.4 p53.....	31
2.3.5 MYC.....	32
2.3.6 RAS.....	33
<b>3. PFKFB3: un gen clau .....</b>	<b>34</b>
3.1 Paper de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 en el metabolisme de les cèl·lules canceroses .....	34
3.2 Isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2.....	37
3.3 Els gens PFKFB en mamífers.....	41
3.3.1 El gen PFKFB1 .....	41
3.3.2 El gen PFKFB2 .....	42
3.3.3 El gen PFKFB3 .....	42
3.3.4 El gen PFKFB4 .....	44
3.4 Expressió i regulació de PFKFB3 .....	45
<b>4. Metabolisme i vies de transducció de senyals.....</b>	<b>53</b>
4.1 Les vies de MAPKs convencionals .....	53

4.1.1 La via de Erk1/2 MAPK.....	57
4.1.2 La via de p38 MAPK.....	59
4.1.3 La via de JNK MAPK.....	62
4.2 Altres vies de senyalització: AMPK i PI3K/Akt.....	65
4.2.1 La via d'AMPK.....	65
4.2.2 La via de PI3K/Akt.....	67
4.3 Via de senyalització de TGF- $\beta$ .....	70

**OBJECTIUS .....77**

**RESULTATS ..... 81**

**Capítol 1: Regulació de PFKFB3 per insulina en les cèl·lules de càncer de colon HT29**

**1. Introducció ..... 85**

1.1 Via de senyalització de la insulina .....	85
1.2 Insulina i càncer.....	88
1.3 Insulina i glicòlisi.....	89

**2. Resultats ..... 92**

2.1 Inducció de l'expressió de PFKFB3 per insulina en HT29 .....	92
2.2 Regulació post-traduccional de PFKFB3 en resposta a insulina .....	94
2.3 Regulació transcripcional de PFKFB3 per insulina.....	99
2.4 Efecte de la inhibició de PFKFB3 sobre la via d'Akt .....	109

**3. Discussió..... 113**

**Capítol 2: Regulació de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en les cèl·lules de glioblastoma T98G**

**1. Introducció ..... 119**

1.1 Via de senyalització de TGF- $\beta$ ..... 119

1.2 TGF- $\beta$  i Càncer..... 122

1.2.1 TGF- $\beta$  com a supressor tumoral..... 123

1.2.2 TGF- $\beta$  com a promotor tumoral..... 123

1.3 TGF- $\beta$  i metabolisme glicolític..... 124

1.4 TGF- $\beta$  i glioblastoma ..... 125

**2. Resultats ..... 127**

2.1 Inducció de l'expressió de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 ..... 127

2.2 Regulació transcripcional de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 ..... 132

2.3 Vies de senyalització implicades en l'efecte de TGF- $\beta$ 1 en la regulació de PFKFB3..... 138

2.3.1 Estudi de la via canònica de TGF- $\beta$ 1 ..... 138

2.3.2 Estudi de les vies no canòniques de TGF- $\beta$ 1 ..... 143

2.4 Paper de PFKFB3 en la capacitat de formar colònies de les cèl·lules T98G en resposta a TGF- $\beta$ 1 ..... 150

<b>3. Discussió.....</b>	<b>152</b>
<b>DISCUSSIÓ GENERAL .....</b>	<b>159</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>169</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>173</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>219</b>
<b>PUBLICACIONS.....</b>	<b>265</b>



# Índex de Figures i Taules

---

## INTRODUCCIÓ

Figura 1. Les característiques del càncer. ....	4
Figura 2. Heterogeneïtat metabòlica del tumor. ....	12
Figura 3. Representació esquemàtica de les principals vies metabòliques implicades en la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses. ....	15
Figura 4. Representació esquemàtica del metabolisme de la glucosa de la cèl·lula normal i cèl·lula cancerosa. ....	22
Figura 5. Carcinoma ductal in situ .....	23
Figura 6. Estructura tridimensional del dímer PFK-2/FBPasa-2 de l'isoenzim ubic (PFKFB3). ....	35
Figura 7. Activitat de la PFK-2/FBPasa-2 .....	36
Taula 1. Propietats dels gens PFKFB. ....	40
Figura 8. Localització del gen PFKFB3 mitjançant l'ús de la tècnica d'hibridació in situ. ....	43
Figura 9. Estructura de l'extrem proper al 3' terminal del gen PFKFB3 .....	44
Figura 10. Esquema dels elements reguladors del promotor humà de PFKFB3..	47
Figura 11. Cascades de senyalització que fosforilen a l'isoenzim PFKFB3a la Ser 461 .....	49
Figura 12. Representació esquemàtica de l'estructura de les MAPKs convencionals i atípiques.....	54
Figura 13. Representació esquemàtica on es mostren les cascades de senyalització de MAPKs.....	55



Figura 14. Seqüències del <i>loop</i> d'activació de les diferents MAPKAPKs .....	56
Figura 15. Representació esquemàtica de la via de ERK MAPK.....	58
Figura 16. Representació esquemàtica de la via de p38 MAPK.....	61
Figura 17. Representació esquemàtica de la via de JNK MAPK.....	64
Figura 18. Representació esquemàtica de la regulació d'AMPK.....	67
Figura 19. Representació esquemàtica de la via de PI3K/Akt.....	69
Figura 20. Representació esquemàtica de la via de senyalització de la família de TGF- $\beta$ .....	75
Figura 21. Representació esquemàtica de la via de senyalització d'insulina.....	88
Figura 22. Representació esquemàtica de la via de senyalització de TGF- $\beta$ ...	121
Figura 23. Principals funcions de TGF- $\beta$ en la tumorigènesi .....	124
Figura 24. Representació esquemàtica de les diferents vies de regulació del gen i isoenzim de PFKFB3 i la seva contribució en el fenotip glicolític de les cèl·lules tumorals .....	167

## RESULTATS

### Capítol 1:

Figura R-1. Expressió relativa dels gens PFKFB al llarg del temps en cèl·lules HT29 .....	92
Figura R-2. Efecte del tractament amb insulina al llarg del temps sobre l'expressió de PFKFB3 en cèl·lules HT29.....	93
Figura R-3. Efecte del tractament amb insulina al llarg del temps sobre la concentració de Fru-2,6-P <sub>2</sub> i de lactat en cèl·lules HT29.....	94

Figura R-4. Efecte de la insulina sobre la fosforilació de PFKFB3 i PFKFB2 a temps curts en cèl·lules HT29 .....	96
Figura R-5. Efecte de la inhibició de la via d'Akt sobre la fosforilació de PFKFB3 i PFKFB2 a temps curts en cèl·lules HT29 .....	97
Figura R-6. Participació de l'isoenzim PFKFB3 i PFKFB2 en l'augment de Fru-2,6-P <sub>2</sub> a temps curts en resposta a insulina en cèl·lules HT29 ....	98
Figura R-7. Efecte de la inhibició de la via d'Akt sobre la regulació transcripcional de PFKFB3 a temps llargs en cèl·lules HT29 .....	100
Figura R-8. Efecte de la insulina sobre promotor de PFKFB3 humà en cèl·lules HT29 .....	101
Figura R-9. Anàlisi de la conservació evolutiva del promotor de PFKFB3 mitjançant el programa ECR Browser .....	103
Figura R-10. Efecte de la insulina sobre una construcció de 29 nucleòtids del promotor humà de PFKFB3 en cèl·lules HT29.....	104
Figura R-11. Efecte de la insulina sobre el factor de transcripció HIF-1 $\alpha$ .....	105
Figura R-12. Efecte de la insulina sobre el factor de transcripció SREBP1 .....	106
Figura R-13. Efecte de la silenciament de SREBP1 en la inducció de PFKFB3 per insulina en les cèl·lules HT29 .....	106
Figura R-14. Efecte de la sobreexpressió de SREBP-1c en la inducció de PFKFB3 per insulina en les cèl·lules HT29.....	107
Figura R-15. Efecte de l'IGF-I sobre l'expressió dels gens PFKFB3 i PFKFB2....	108
Figura R-16. Efecte de la silenciament de PFKFB3 sobre l'activació de la via d'Akt en resposta a insulina en cèl·lules HT29.....	110
Figura R-17. Efecte de la inhibició de PFKFB3 amb 3PO sobre l'activació de la via d'Akt en resposta a insulina en cèl·lules HT29.....	111

## Capítol 2:

Figura R-18. Efecte del tractament amb TGF- $\beta$ 1 al llarg del temps sobre l'expressió de GLUT1, HK-II i LDH-A en cèl·lules T98G .....	128
Figura R-19. Expressió relativa de les diferents isoformes dels gens PFKFB en cèl·lules T98G .....	129
Figura R-20. Dosi-resposta de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G .....	129
Figura R-21. Efecte del tractament amb TGF- $\beta$ 1 al llarg del temps sobre l'expressió de PFKFB3 en cèl·lules T98G .....	131
Figura R-22. Efecte del tractament amb TGF- $\beta$ 1 al llarg del temps sobre la concentració de Fru-2,6-P <sub>2</sub> i els nivells de lactat extracel·lular en cèl·lules T98G .....	132
Figura R-23. Mecanisme de regulació de l'expressió gènica de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G .....	133
Figura R-24. Efecte del TGF- $\beta$ 1 a nivell transcripcional de PFKFB3 en cèl·lules T98G .....	135
Figura R-25. Efecte de TGF- $\beta$ 1 en el promotor humà de PFKFB3 en cèl·lules T98G .....	136
Figura R-26. Anàlisi de regions conservades evolutivament del promotor de PFKFB3 utilitzant l'ECR Browser.....	137
Figura R-27. Efecte del TGF- $\beta$ 1 en l'activació de la via de Smad en cèl·lules T98G .....	138
Figura R-28. Mecanisme de regulació de l'activació de Smad2 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G .....	139
Figura R-29. Efecte de la silenciament de les Smads en la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.....	140

Figura R-30. Efecte de la sobreexpressió de Smad3 i Smad4 en la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.....	141
Figura R-31. Efecte de la inhibició de Smad3 en la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.....	142
Figura R-32. Efecte de TGF- $\beta$ 1 en l'activació de les vies no canòniques en cèl·lules T98G.....	143
Figura R-33. Efecte de la inhibició del T $\beta$ RI/II en l'activació de les vies no canòniques de TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.....	144
Figura R-34. Efecte de la inhibició de la via de p38 i PI3K en la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.....	146
Figura R-35. Efecte de la inhibició de la via de p38 en l'activació d'Akt per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.....	147
Figura R-36. Efecte de la inhibició de Smad3 en l'activació d'Akt i p38 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.....	148
Figura R-37. Efecte de la inhibició de Smad3, p38 i PI3K en la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.....	149
Figura R-38. Participació de PFKFB3 en la formació de colònies de cèl·lules T98G en resposta a TGF- $\beta$ 1.....	150

## DISCUSSIÓ

Figura 23. Representació esquemàtica de les diferents vies de regulació del gen i isoenzim de PFKF3 i la seva contribució en el fenotip glicolític de les cèl·lules tumorals.....	167
---	-----



## ABREVIATURES

---

**3PO:** 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one

**ACC:** Acetyl-CoA carboxylase; acetil-CoA carboxilasa

**ALK:** Activin-Like receptor Kinase; quinasas similar al receptor de activina

**AMPK:** AMP activated protein Kinase; proteïna quinasa activada per AMP

**BMP:** Bone Morphogenic Protein; proteïnes formadores d'ós

**bHLH:** basic Helix-Loop-Helix; motiu hèlix- bucle- hèlix de tipus bàsic

**BSA:** Bovine Serum Albumin; albúmina sèrica bovina

**cAMP:** cyclic Adenosine Monophosphate-3', 5'; adenosina monofosfat-3',5' cíclic

**ChIP:** Chromatin Immunoprecipitation; immunoprecipitació de cromatina

**ChREBP:** Carbohydrate Response Element-Binding Protein; proteïna d'unió a l'element de resposta a carbohidrats

**CIAP:** Calf Intestine Alkaline Phosphatase; fosfatasa alcalina d'intestí de vaca

**Co-Smad:** Common mediator Smad; Smad mediadora comú

**CRE:** cAMP Responsive Element; element de resposta a cAMP

**CREB:** cAMP Response Element-Binding protein; proteïna d'unió a l'element de resposta a cAMP

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium; medi de Eagle modificat per Dulbecco

**DMSO:** Dimethyl Sulfoxide; dimetil sulfòxid

**DTT:** Dithiothreitol; ditiotreitòl

**EGF:** Epidermal Growth Factor; factor de creixement epidèrmic

**EMT:** epithelial-mesenchymal transition; transició epiteli-mesènquima

**ERK:** Extracellular signal-Regulated Kinase; quinasa regulada per senyals extracel·lulars

**FAS:** *Fatty Acid Synthase*; àcid gras sintasa

**FBPasa-1:** *Fructose-1,6-bisphosphatase*; fructosa-1,6-bisfosfatasa

**FBPasa-2:** *Fructose-2,6-bisphosphatase*; fructosa-2,6-bisfosfatasa

**FBS:** *Fetal Bovine Serum*; sèrum fetal boví

**Fru-1,6-P<sub>2</sub>:** *Fructose-1,6-bisphosphate*; fructosa-1,6-bisfosfat

**Fru-2,6-P<sub>2</sub>:** *Fructose-2,6-bisphosphate*; fructosa-2,6-bisfosfat

**Fru-6-P:** *Fructose-6-phosphate*; fructosa-6-fosfat

**GAPDH:** *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*; gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa

**GDF:** *Growth and Differentiation Factor*; factor de creixement i diferenciació

**GFP:** *Green Fluorescent Protein*; proteïna verda fluorescent

**GLUT:** *Glucose Transporter*; transportador de glucosa

**HER2:** *Human Epidermal growth factor Receptor 2*; receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà

**HIF-1:** *Hypoxia-Inducible Factor-1*; factor induïble per hipòxia-1

**HK:** *Hexokinase*; hexoquinasa

**HRE:** *Hypoxia Response Element*; element de resposta a hipòxia

**Hsp25:** *Heat shock protein 25*; proteïna de xoc tèrmic

**I-Smad:** *Inhibitory Smads*; Smad inhibidora

**IGF:** *Insulin-like Growth Factor*; factor de creixement semblant a la insulina

**iPFK-2 ò iPFKFB3:** *inducible PFK-2/FBPasa-2*; isoenzim induïble de la PFK-2/FBPasa-2

**JNK:** *c-Jun N-terminal Kinase*; quinasa c-Jun N-terminal

**LAP:** *Latency-associated Peptide*; pèptid associat a latència

**LPS:** *Lipopolysaccharide*; lipopolisacàrid

**MAD:** *Mothers Against Decapentaplegic*

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinase*; proteïna quinasa activada per mitògens

**MAPKK o MKK:** *MAPK Kinase*; quinasa MAPK

**MAPKKK:** *MAPKK Kinase*; quinasa MAPKK

**MCT:** *Monocarboxylate Transporter*; transportadors d'àcids monocarboxílics

**MEC:** *Extracellular Matrix*; matriu extracel·lular

**MEFs:** *Mouse Embryonic Fibroblasts*; fibroblasts embrionaris de ratolí

**MEF2:** *Myocyte Enhancer Factor 2*; factor potenciador específic de miòcits

**MEK1:** *MAP/ERK Kinase 1*; quinasa MAP/ERK 1

**MK2:** *MAPK-activated protein Kinase-2*, també *MAPKAPK2*; proteïna quinasa 2 activada per MAPK

**MNK:** *MAPK-interacting Kinase*; quinasa que interactua amb MAPK

**MSK:** *Mitogen and Stress activated protein Kinase*; proteïna quinasa activada per mitògens i estrès

**mTOR:** *mammalian Target of Rapamycin*; diana de rapamicina en mamífers

**NF-κB:** *Nuclear Factor-κB*; factor nuclear κB

**p70S6K:** *p70 ribosomal protein S6 quinasa*; proteïna p70 ribosomal S6 quinasa

**PAGE:** *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*; electroforesi en gels de poliacrilamida

**PDGF:** *Platelet-derived Growth Factor*; factor de creixement derivat de plaquetes

**PDK-1:** *Pyruvate-Dehydrogenase kinase 1*; piruvat deshidrogenasa quinasa 1

**PEP:** *Phosphoenolpyruvate*; fosfoenolpiruvat

**PET:** *Positron Emission Tomography*; tomografia d'emissió de positrons

**PFK-1:** *Phosphofructokinase-1*; fosfofructoquinasa-1

**PFK-2:** *Phosphofructokinase-2*; fosfofructoquinasa-2



**PFK-2/FBPasa-2:** *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase*;  
6-fosfofructoquinasa-fructosa-2,6-bisfosfatasa

**PFKFB1-4:** isoenzims de la 6-fosfofructoquinasa-fructosa-2,6-bisfosfasa codificats pels gens *PFKFB1-4*, respectivament

**PI3K:** *Phosphatidylinositol-3-kinase*; fosfatidilinositol-3-quinasa

**PI(3,4)P<sub>2</sub>:** *Phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphate*; fosfatidilinositol-3,4-bifosfat

**PI(3,4,5)P<sub>3</sub>:** *Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate*; fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfat

**PK:** *Pyruvate Kinase*; piruvat quinasa

**PKA:** *cAMP-dependent Protein Kinase A*; proteïna quinasa A dependent de cAMP

**PKB:** *Protein Kinase B*; proteïna quinasa B

**PKM2:** *M2 isoform of Pyruvate Kinase*; isoforma M2 de la piruvat quiansa

**PPP:** *Pentose Phosphate Pathway*; via de les pentoses fosfat

**PR:** *Progesterone Receptor*; receptor de progestàgens

**pRb:** *Retinoblastoma protein*; proteïna del retinoblastoma

**PRE:** *Progesterone Response Element*; element de resposta a progesterona

**PTEN:** *Phosphatase and TENsin homolog*; homologa de fosfatasa i tensina

**R-Smad:** *Receptor-regulated Smad*; Smad regulada per receptor

**ROS:** *Reactive Oxygen Species*; espècies reactives d'oxigen

**RSK:** *Ribosomal S6 Kinase*; quinasa ribosomal S6

**RTK:** *Receptor Tyrosine Kinase*; receptor tirosina quinasa

**S6:** *protein ribosomal S6*; proteïna ribosomal S6

**SBE:** *Smad binding element*; element d'unió a Smad

**siRNA:** *small Interference RNA*; RNA d'interferència petit

**SREBP:** *Sterol Response Element-Binding Protein*; proteïna d'unió a l'element regulador d'esterol

**STAT:** *Signal Transducer and Activator of Transcription*; transductor de senyals i activador de la transcripció

**TCA:** *Tricarboxylic Acid Cycle*; cicle dels àcids tricarboxílics

**TGF- $\beta$ :** *Transforming Growth Factor  $\beta$* ; factor de creixement transformat  $\beta$

**T $\beta$ R:** *TGF- $\beta$  receptor*; receptor de TGF- $\beta$

**TIGAR:** *TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*; regulador de la glicòlisi i l'apoptosi induït per TP53

**TSC1/2:** *Tuberous Sclerosis Complex 1/2*; complex 1/2 d'esclerosi tuberosa

**uPFK-2:** *ubiquitous PFK-2*; isoenzim ubic de la PFK-2/FBPasa-2

**UTR:** *Untranslated regions*; regió no traduïda

**VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*, factor de creixement vascular endotelial



# INTRODUCCIÓ

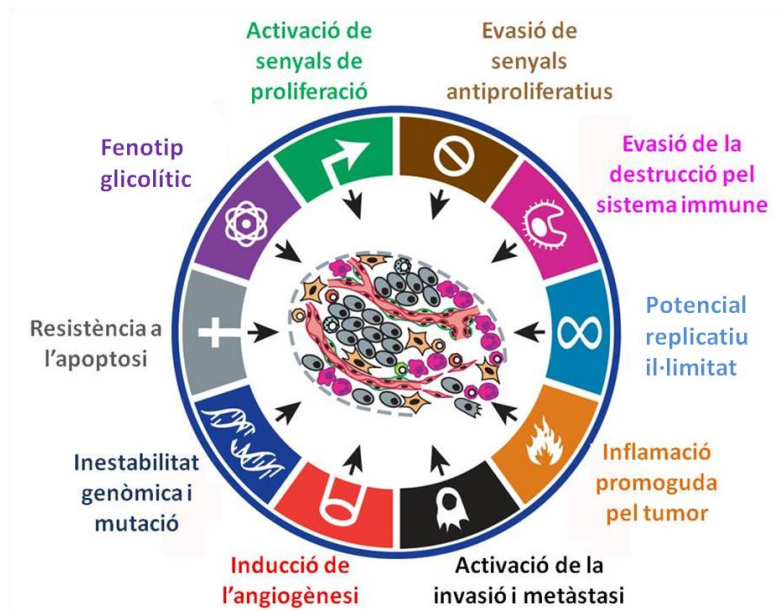
---



## 1. Fenotip del càncer

La cèl·lula, en condicions normals, disposa de diferents mecanismes per controlar el metabolisme, la diferenciació, la proliferació i la mort en funció dels senyals externs i interns que li arriben, així com també, de la disponibilitat de nutrients. Aquests mecanismes permeten que la cèl·lula sobrevisqui, prolifereixi o bé entri en un procés de senescència o d'apoptosi. En canvi, en els processos tumorals el control sobre aquests mecanismes es perd donant lloc a una proliferació cel·lular descontrolada, a la invasió dels teixits que l'envolten i a la metastasi. En aquesta formació i progressió del tumor hi estan implicats diferents gens, els quals presenten alteracions de guany de funció, com és el cas dels oncogens i protooncogens (Land et al., 1983; Raley, 1983), o bé d'una pèrdua d'aquesta, com succeeix amb els gens supressors (Bishop, 1991; Levine and Puzio-Kuter, 2010; Vogelstein and Kinzler, 1992).

Els investigadors Robert Weinberg i Douglas Hanahan van suggerir que la majoria de tumors, independentment de les peculiaritats genètiques de cada un, s'originen gràcies a l'adquisició de diferents habilitats fenotípiques que, de forma col·lectiva, permeten el creixement desdiferenciat (anaplàsia), descontrolat (neoplàsia) i desorganitzat (displàsia) del tumor. Aquestes habilitats, conegudes com els trets distintius del càncer o "*Hallmarks of cancer*", inclouen l'activació de senyals de proliferació, l'evasió de senyals antiproliferatius, la resistència a l'apoptosi, el potencial replicatiu il·limitat, la inducció de l'angiogènesi, l'activació de la invasió i metastasi, l'evasió de la destrucció pel sistema immune, el fenotip glicolític, la inestabilitat genòmica i la inflamació promoguda pel tumor (**Figura 1**) (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).



**Figura 1. Les característiques del càncer.** Esquema on s'il·lustren els requeriments de les cèl·lules per assolir el fenotip tumoral juntament amb les habilitats que ajuden a les cèl·lules a esdevenir canceroses (Figura adaptada de (Hanahan and Weinberg, 2011).

## 1.1 Activació de senyals de proliferació

Les cèl·lules normals necessiten senyals de creixement per promoure tant la proliferació, per mantenir l'homeòstasi en el número de cèl·lules, com el manteniment de la funció i arquitectura normal del teixit. La producció i l'alliberament d'aquests senyals proliferatius es troba sota un control molt estricte i, generalment, es transmeten a l'interior de la cèl·lula a través de receptors transmembrana als quals s'uneixen diferents factors de creixement donant lloc a l'activació de vies de senyalització intracel·lulars que regulen diferents processos. (Hanahan and Weinberg, 2011). En canvi, les cèl·lules tumorals presenten una elevada taxa de proliferació ja que són menys dependents dels senyals mitogènics. Els mecanismes moleculars que garanteixen aquesta autonomia proliferativa són:

- 
- La producció autocrina dels seus propis factors de creixement. Alternativament, les cèl·lules tumorals poden enviar senyals per estimular a les cèl·lules normals del voltant del tumor perquè alliberin factors de creixement per a les cèl·lules tumorals (Bhowmick et al., 2004; Cheng et al., 2008; Martinez-Outschoorn et al., 2017).
  - L'alteració dels receptors de membrana de les cèl·lules canceroses a causa de la seva sobreexpressió o a mutacions activadores, fent que els receptors siguin molt més sensibles al lligand, fins i tot a baixes concentracions d'aquest, o bé que estiguin sempre activats (Slamon, 1987; Wee and Wang, 2017).
  - L'activació constitutiva dels components de les vies de transducció de senyals sense la necessitat d'activar-se en resposta a la unió del lligand als receptors. Per exemple, en molts tumors s'han detectat mutacions activadores en proteïnes reguladores de les vies de senyalització de receptors transmembrana com Ras i PI3K (*Phosphatidylinositol-3-kinase*) o bé mutacions inactivadores en reguladors negatius com PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) (Fernández-Medarde and Santos, 2011; Jiang and Liu, 2009; Yuan and Cantley, 2008).

## 1.2 Evasió de senyals antiproliferatius

Les cèl·lules que formen part d'un teixit normal a més de respondre a senyals de creixement també responen a d'altres d'inhibidores de creixement (antiproliferatius) que les fan sortir del cicle cel·lular, per entrar en senescència o apoptosi, o bé n'indueixen la seva diferenciació. En canvi, les cèl·lules canceroses són insensibles a aquests senyals antiproliferatius i, per tant, tenen la capacitat de dividir-se de forma descontrolada. Dos dels gens supressors de tumors que s'han trobat mutats en molts tipus de càncers són Rb i TP53, els quals codifiquen per la proteïna pRb (*Retinoblastoma protein*) i la proteïna p53, respectivament. Aquestes proteïnes dirigeixen la cèl·lula cap a la proliferació o cap a l'activació de programes de senescència o d'apoptosi. Per una banda, la pRb integra senyals externs i interns de proliferació i decideix si la cèl·lula es troba en condicions de



progressar en el cicle cel·lular, concretament en la transició G1/S (Burkhardt and Sage, 2008). En càncer, aquesta proteïna es troba hiperactivada causant la insensibilitat als senyals antiproliferatius que normalment bloquegen la transició a la fase S. Per altra banda, p53 rep estímuls de sensors d'estrès, de manera que si el dany al genoma és molt gran o bé els senyals que promouen el creixement, la glucosa, la quantitat de nucleòtids i l'oxigenació no són òptims, p53 pot aturar la progressió del cicle cel·lular fins que les condicions tornin a la normalitat. En canvi, si el dany al DNA és prou gran p53 indueix apoptosi per tal de que les mutacions al DNA no es transmetin a les cèl·lules filles. Per tant, mutacions en p53 provoquen la pèrdua de la seva activitat supressora de tumor (Vousden and Lu, 2002).

### 1.3 Resistència a l'apoptosi

El creixement descontrolat de les cèl·lules tumorals no només està determinat per la seva taxa de proliferació, sinó que també per la seva taxa de mort cel·lular. La disminució del número de cèl·lules es dona principalment per apoptosi o mort cel·lular programada. L'apoptosi és un procés programat genèticament i conservat evolutivament, essencial pel desenvolupament normal d'òrgans, la remodelació de teixits, la resposta immune i la supressió tumoral, essent clau pel manteniment de l'homeòstasi corporal (Iannolo et al., 2008). Entre els mecanismes fonamentals per desactivar l'apoptosi s'inclou la pèrdua de la funció del gen supressor de tumors TP53 i el guany de la funció de gens inhibidors d'apoptosi com BCL-2. S'ha vist que en més del 50% de càncers humans, el gen TP53 es troba mutat donant lloc a una inactivació funcional de p53 i, per tant, fa que les cèl·lules tumorals no es puguin reparar correctament o induir apoptosi en resposta al dany al DNA, permetent que les cèl·lules proliferin en presència d'aquestes anomalies. A més, la proteïna p53 també actua com a factor de transcripció activant gens com TIGAR (antioxidant) o NOXA i PUMA (inductors de l'apoptosi) (Vousden and Prives, 2009). Alternativament, els tumors poden evitar l'apoptosi sobreexpressant reguladors antiapoptòtics com BCL-2 o BCL-X<sub>L</sub> o senyals de supervivència (IGF 1/2) o bé inhibint els factors proapoptòtics com BAX, BIM i PUMA.

## 1.4 Potencial replicatiu il·limitat

Les cèl·lules normals es divideixen unes 50-70 vegades al llarg de la seva vida abans d'entrar en dos estats no-proliferatius, la senescència o mort per apoptosi (crisis). En canvi, les cèl·lules tumorals requereixen d'un potencial replicatiu il·limitat per generar tumors macroscòpics. L'adquisició d'aquesta característica està relacionada principalment amb l'acció de l'enzim telomerasa. Aquest enzim és gairebé absent en les cèl·lules no immortalitzades però s'expressa a nivells funcionals en el 90% de les cèl·lules immortalitzades espontàniament, protegint els extrems dels cromosomes i, d'aquesta manera, evitant la mort o senescència de les cèl·lules tumorals (Blasco, 2005; Shay and Wright, 2000).

## 1.5 Inducció de l'angiogènesi

L'angiogènesi és el mecanisme de formació de nous vasos sanguinis necessari per captar nutrients i oxigen i també per eliminar residus metabòlics i diòxid de carboni a través del torrent sanguini. Tant les cèl·lules normals com tumorals requereixen del procés d'angiogènesi per satisfer aquestes necessitats. En els tumors té lloc una ràpida expansió clonal, per tant, presenten una expressió elevada de factors pro-angiogènics que estimulen el procés d'angiogènesi, afavorint el creixement tumoral i la metastasi. Un dels principals factors que inicien el procés d'angiogènesi és el factor de creixement de l'endoteli vascular, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), el qual és activat transcripcionalment en condicions d'hipòxia pel factor de transcripció HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$* ) (Carmeliet, 2005; Folkman, 1995; Hunt et al., 2007; Semenza, 2002).

## 1.6 Activació de la invasió i metàstasi

Durant el desenvolupament del tumor, algunes cèl·lules poden adquirir la capacitat d'envair teixits adjacents i colonitzar altres òrgans. L'adquisició d'aquesta capacitat per part de les cèl·lules tumorals implica principalment la pèrdua de molècules d'adhesió cèl·lula-cèl·lula, d'unió a la matriu extracel·lular i metaloproteases de la matriu extracel·lular (Orlichenko and Radisky, 2008). El procés d'invasió i metàstasi comença amb la invasió local i la motilitat mitjançant el fenomen conegut com a transició epitelial-mesènquima (EMT) (Leber and Efferth, 2009). Aquest fenomen es basa en el canvi de les característiques típiques de les cèl·lules canceroses d'origen epitelial per adoptar un fenotip de tipus mesenquimal, incloent un augment en la capacitat de motilitat, invasió i resistència a l'apoptosi. Una de les proteïnes clau en aquest procés és la E-cadherina, una molècula que participa en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula, ja que s'ha vist que el programa EMT pot ser reactivat en molts tumors per la repressió de l'expressió d'aquesta molècula. A més, en molts carcinomes humans s'ha observat una disminució de l'expressió o mutacions per inactivació de E-cadherina (Bex and van Roy, 2009; Cavallaro and Christofori, 2004). El procés de metàstasi continua amb la intravasació de les cèl·lules canceroses cap als vasos sanguinis i limfàtics pròxims. Durant aquest procés, algunes d'aquestes cèl·lules escapen de la llum dels vasos cap al parènquima de teixits més llunyans (extravasació) i comencen a formar petits nòduls de cèl·lules canceroses (micrometàstasi). Finalment, aquestes últimes creixen donant lloc a tumors macroscòpics (colonització) (Talmadge and Fidler, 2010). La metàstasi és la principal causa de mort per càncer (Leber and Efferth, 2009).

## 1.7 Evasió de la destrucció pel sistema immune

Les cèl·lules del sistema immune són les responsables de reconèixer les cèl·lules tumorals, a causa de que expressen antígens que són detectats com a estranys, i d'eliminar-les, evitant així el seu creixement i expansió. Les cèl·lules canceroses evadeixen els mecanismes immunològics que els poden atacar, en especial, la resposta per limfòcits T i B, macròfags i cèl·lules NK (*Natural Killer*). Per tant, l'alteració del correcte

funcionament d'aquest mecanisme de vigilància per part del sistema immune dóna lloc al creixement i progressió del tumor i la seva posterior propagació per l'organisme de forma descontrolada. La majoria de tumors presenten diferents mecanismes per evitar les respostes immunes de l'organisme. Per una banda, les cèl·lules canceroses presenten una menor expressió d'antígens, reduint la resposta immune. A més, degut al ràpid creixement i propagació del tumor, moltes vegades sobrepassen la capacitat del sistema immune per eliminar totes les cèl·lules tumorals. Per altra banda, les cèl·lules canceroses poden secretar factors immunosupressors que fan disminuir el funcionament del sistema immune (Shields et al., 2010; Yang et al., 2010).

## 1.8 Fenotip glicolític

En condicions normals, les cèl·lules presenten un metabolisme principalment basat en la fosforilació mitocondrial oxidativa. En canvi, la majoria de cèl·lules tumorals reprogramen el seu metabolisme cap a un principalment glicolític, inclús en presència d'oxigen, conegut com *efecte Warburg* (Bartrons and Caro, 2007; Chen et al., 2007; DeBerardinis et al., 2008; Warburg, 1925, 1956). Malgrat que d'entrada pugui semblar contraproductiu, especialment a nivell energètic, el canvi cap al fenotip glicolític confereix un avantatge proliferatiu a les cèl·lules canceroses respecte les cèl·lules normals adjacents. Entre els diferents avantatges trobem que les cèl·lules canceroses presenten una ràpida obtenció d'energia en forma d'ATP, són capaces de sintetitzar els intermediaris necessaris per diferents vies biosintètiques i estableixen un microambient de pH intracel·lular i extracel·lular àcid provocant apoptosi a les cèl·lules normals (Liberti and Locasale, 2016).

Independentment del tipus de càncer, diversos gens glicolítics o relacionats amb la via glicolítica es troben sobreexpressats en les cèl·lules tumorals, esdevenint una característica comuna que s'utilitza per identificar la malignitat d'un tumor i la possible resposta terapèutica (Cuevas et al., 2002; Lum et al., 2007; Porporato et al., 2011; Tarrado-Castellarnau et al., 2016; Yu et al., 2015). Els factors inicials responsables del fenotip glicolític, o reprogramació metabòlica, que pateixen les cèl·lules tumorals es tractaran en profunditat més endavant.

A part de les característiques fins aquí descrites, l'adquisició del fenotip tumoral és possible gràcies a dues altres habilitats que permeten que això sigui possible, la inestabilitat genòmica i mutació i la inflamació promoguda pel tumor.

### **1.9 Inestabilitat genòmica i mutació**

El manteniment de l'estabilitat genòmica és important per la supervivència cel·lular i depèn del correcte funcionament dels mecanismes de resposta al dany al DNA i dels sistemes de reparació. Les cèl·lules canceroses presenten defectes en aquests mecanismes de manteniment del DNA, fent que aquestes cèl·lules tinguin una taxa de mutacions més elevada que les cèl·lules normals afavorint la progressió del tumor. Les alteracions genètiques associades a la progressió del tumor inclouen mutacions puntuals, inestabilitats cromosòmiques, com el guany o pèrdua de cromosomes sencers, i reorganitzacions estructurals, com delecions, amplificacions, inversions o translocacions (Lee et al., 2016; Venkatesan et al., 2015). També, en la tumorogènesi estan implicades les alteracions en els mecanismes epigenètics com les modificacions d'histones, la metilació del DNA i els RNA no-codificant (Feinberg and Tycko, 2004; Yen et al., 2016). De fet, els tumors normalment presenten patrons de metilació alterats com hipermetilació en els promotors de gens supressors de tumors, donant lloc a la repressió transcripcional, i hipometilació d'oncogens, reforçant la seva activació (Feinberg and Tycko, 2004; Gokul and Khosla, 2013). També, s'ha observat que les modificacions epigenètiques regulen l'efecte *Warburg* i coordinen de manera general el metabolisme cel·lular, afectant a l'activitat de diferents enzims metabòlics (Nordgren and Skildum, 2015; Wang and Jin, 2010). L'estrès oxidatiu també té un paper important en la tumorogènesi ja que està involucrat tant en les modificacions genètiques com en les epigenètiques (Yen et al., 2016).

### **1.10 Inflamació promoguda pel tumor**

Les cèl·lules tumorals presenten un estat inflamatori pre-maligne que facilita la progressió tumoral ja que les cèl·lules inflamatòries alliberen molècules bioactives al microambient del tumor, com són factors de creixement, que permeten l'activació de

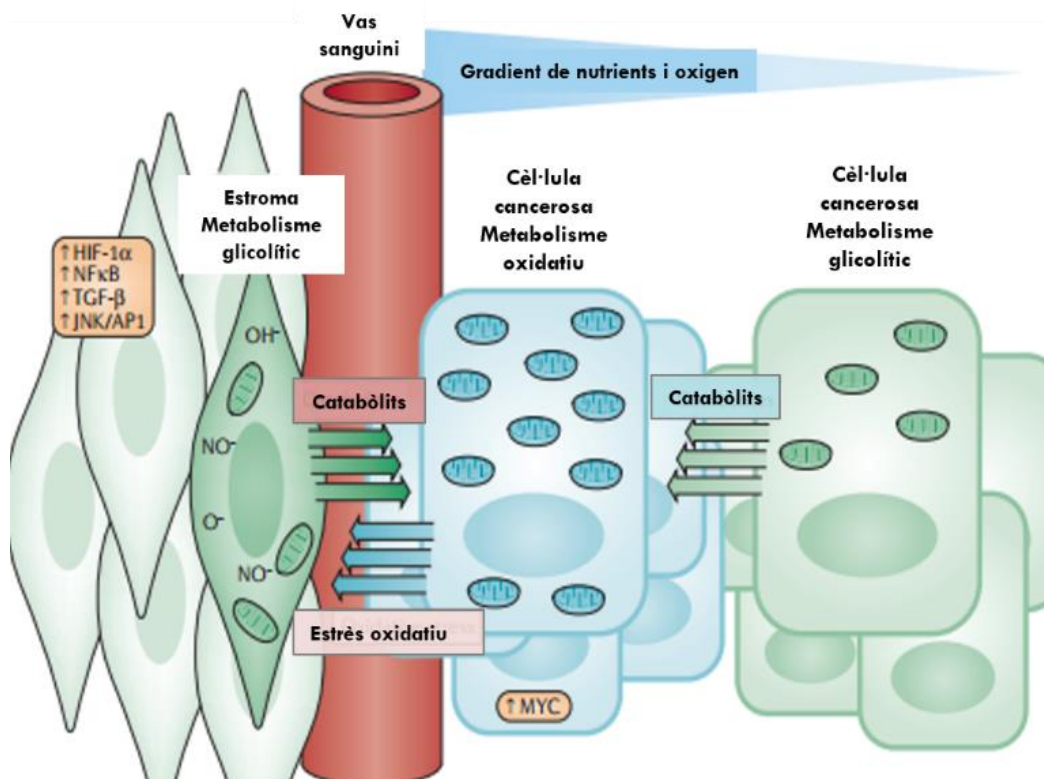
senyals proliferatius, factors de supervivència, que eviten la mort cel·lular, factors pro-angiogènics, que alteren la matriu extracel·lular facilitant l'angiogènesi, invasió i metastasi i senyals que donen lloc a l'activació del programa EMT (Grivennikov et al., 2010; Qian and Pollard, 2010). A més, les cèl·lules inflamatòries també poden secretar espècies reactives de l'oxigen (ROS) que acceleren la progressió tumoral (Grivennikov et al., 2010).

A més de les habilitats fins aquí esmentades de les cèl·lules canceroses, recentment cada vegada està agafant més importància el fet que la pròpia cèl·lula cancerosa ni està aïllada, ni és l'únic tipus cel·lular que està en l'anomenat microambient tumoral. Les interaccions entre aquest microambient tumoral s'estan demostrant com claus per a la progressió i creixement tumoral.

## **1.11 Microambient tumoral**

Les investigacions dels últims anys reforcen cada cop més la importància de la influència del microambient i de tots els tipus de cèl·lules que formen part d'aquest en la generació i progressió tumoral (Martinez-Outschoorn et al., 2011, 2017; Pavlova and Thompson, 2016). Les cèl·lules canceroses no existeixen com a poblacions homogènies pures, sinó que estan integrades en colònies envoltades per les cèl·lules del estroma, entre les quals trobem els fibroblasts, cèl·lules del sistema immunològic i les cèl·lules endotelials. Aquestes pateixen canvis fenotípics com a conseqüència de la seva proximitat al tumor (Hanahan et al., 2012). La interacció entre les cèl·lules canceroses i les de l'estroma comporta l'intercanvi de catabòlits entre cèl·lules, la secreció de factors de creixement i alteracions de la matriu extracel·lular i de les interaccions cèl·lula-cèl·lula. Segons la disponibilitat de nutrients, algunes de les cèl·lules que formen part del tumor són predominantment glicolítiques, mentre que d'altres presenten un metabolisme basat en la fosforilació oxidativa. Aquesta heterogeneïtat metabòlica entre les diferents poblacions de cèl·lules afavoreix la proliferació i el creixement del tumor (Martinez-Outschoorn et al., 2017). De fet, quan les cèl·lules canceroses són cocultivades amb fibroblasts, les cèl·lules canceroses augmenten la massa mitocondrial, mentre que els fibroblasts perden els mitocondris. Això és degut a que l'estrès oxidatiu, produït per la ràpida proliferació

de les cèl·lules canceroses, induïx factors com HIF-1 $\alpha$ , NF $\kappa$ B, TGF- $\beta$ , entre d'altres, que activen l'autofàgia d'òrgànuls i mitocondris de les cèl·lules de l'estroma i recluten macròfags que produeixen citocines i inflamació. Com a conseqüència dels ROS i els factors induïts per aquests, s'indueix el fenotip glicolític de les cèl·lules de l'estroma produint lactat, glutamina i cossos cetònics que són utilitzats per les cèl·lules canceroses (Figura 2).



**Figura 2. Heterogeneïtat metabòlica del tumor.** El metabolisme de les cèl·lules canceroses del tumor varia en funció de les influències del microambient tumoral i de la distància al sistema vascular. Les cèl·lules canceroses que es troben més pròximes als vasos sanguinis tenen accés als nutrients i a l'oxigen i, per tant, generen ATP de forma aeròbica a través de la fosforilació oxidativa i l'activació de les vies anabòliques, donant lloc a una ràpida proliferació. L'estrès oxidatiu causat per aquesta ràpida proliferació de les cèl·lules canceroses induïx la glicòlisi i autofàgia en les cèl·lules de l'estroma més properes, les quals generen catabòlits, com lactat o cossos cetònics, que són captats per les cèl·lules canceroses i utilitzats per a la producció d'ATP. Les cèl·lules canceroses que es troben més allunyades del vas sanguini, com que tenen una baixa disponibilitat de nutrients i oxigen, presenten un metabolisme catabòlic, similar al de les cèl·lules de l'estroma, per adaptar-se i satisfer les seves necessitats energètiques. Figura adaptada de (Martinez-Outschoorn et al., 2017).

Per tant, aquest model, anomenat *efecte Warburg invertit*, indueix el catabolisme de les cèl·lules de l'estroma a través de l'autofàgia, i això facilita nutrients i fomenta el creixement anabòlic de les cèl·lules tumorals, la progressió del tumor i la metàstasi (Martinez-Outschoorn et al., 2011; Pavlides et al., 2009).



## 2. El paper de la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses

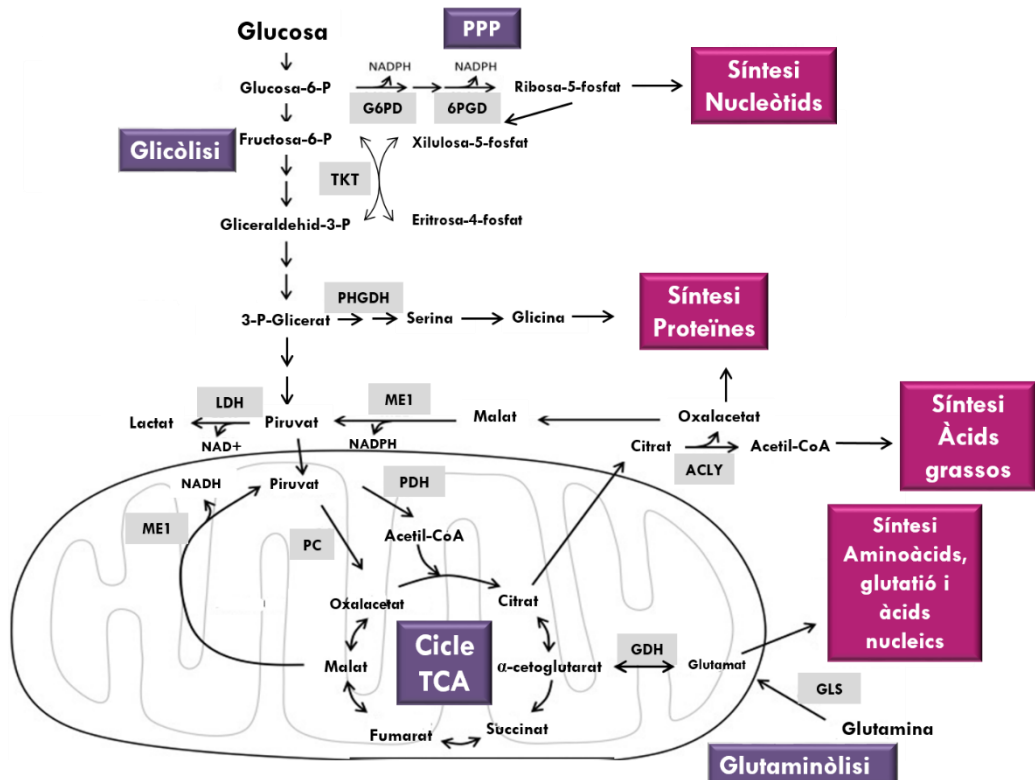
El metabolisme és el conjunt de reaccions químiques implicades en el creixement, proliferació i supervivència de les cèl·lules. Aquestes reaccions són catalitzades per enzims que es troben altament regulats i proporcionen energia, poder reductor i macromolècules per satisfer les necessitats cel·lulars. Les reaccions metabòliques es classifiquen en vies catabòliques, que són les que produeixen energia, i vies anabòliques, les quals sintetitzen molècules consumint energia.

La majoria de cèl·lules tumorals reprogramen el seu metabolisme respecte el seu teixit d'origen per tal de poder fer front a les exigències de creixement i divisió cel·lular. Aquesta reprogramació metabòlica tumoral implica l'increment de diverses vies metabòliques clau com la glicòlisi, la via de les pentoses fosfat, la glutaminòlisi, el metabolisme de lípids, àcids nucleics i aminoàcids (**Figura 3**) (Moreno-Sánchez et al., 2007; Porporato et al., 2011; Tarrado-Castellarnau et al., 2016; Yu et al., 2015).

L'increment de la via glicolítica és l'alteració metabòlica més notable del metabolisme energètic de les cèl·lules tumorals ja que la producció d'energia d'aquestes cèl·lules recau principalment en la glicòlisi, fins i tot en presència d'oxigen suficient. Aquest fenotip, que canvia la fosforilació oxidativa per una glicòlisi aeròbica per generar lactat i ATP, es coneix com *efecte Warburg* en honor al científic que ho va descriure per primer cop (Warburg, 1925, 1956).

Actualment, la dependència de les cèl·lules tumorals per captar glucosa amb més avidesa que les cèl·lules normals s'utilitza per la detecció i monitorització de tumors mitjançant la tomografia d'emissió de positrons (PET). Aquesta tècnica fa ús d'un anàleg de la glucosa unida amb fluor radioactiu com a marcador ( $[^{18}\text{F}]$ fluorodeoxiglucosa) (Abbey et al., 2006). La tomografia d'emissió de positrons ha permès constatar que la majoria de tumors presenten una captació de glucosa d'aproximadament un ordre de magnitud superior a la d'un teixit normal (Gatenby, 1995). Més del 90% de tumors primaris i metastàtics tenen

un elevat consum de glucosa i existeix una bona correlació entre l'agressivitat del tumor i la taxa d'utilització de la glucosa (Smallbone et al., 2005).



**Figura 3. Representació esquemàtica de les principals vies metabòliques implicades en la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses.** En la figura es mostren les principals vies catabòliques i anabòliques que permeten el creixement cel·lular i la supervivència de les cèl·lules canceroses. Els enzims es mostren dins d'un quadre gris i les vies dins d'un quadre lila. Abreviatures: 6PGD, 6-fosfogluconat deshidrogenasa; ACLY, ATP-citrat liasa; CoA, coenzim A; GLS, glutaminasa; GDH, glutamat deshidrogenasa; G6PD, glucosa-6-fosfat deshidrogenasa; LDH, lactat deshidrogenasa; ME1, forma citoplasmàtica de l'enzim màlic; ME2, forma mitocondrial de l'enzim màlic; PC, piruvat carboxilasa; PDH, piruvat deshidrogenasa i PHGDH, 3-fosfoglicerat deshidrogenasa. Figura adaptada de (Tarrado-Castellarnau et al., 2016).

Donat que el gen d'estudi d'aquesta tesi s'emmarca dins de la via glicolítica, dedicarem tot seguit un apartat a descriure en detall aquesta via i la seva regulació en cèl·lules

tumorals. Abans, però, introduïrem breument la resta de vies metabòliques alterades en les cèl·lules tumorals (Tarrado-Castellarnau et al., 2016).

- **Via de les pentoses fosfat**

La via de les pentoses fosfat (PPP) és una de les principals vies metabòliques que permet la proliferació cel·lular del tumor ja que proporciona els substrats per la síntesi d'àcids nucleics, els quals són necessaris per a la replicació del DNA i la producció del RNA. La ribosa-5-fosfat, que és el substrat inicial per a la síntesi de DNA i RNA, es sintetitza principalment a través d'aquesta via, la qual també genera NADPH, que és un cofactor essencial per la biosíntesi de lípids i aminoàcids i per la modulació de l'estrès oxidatiu (Patra and Hay, 2014).

La PPP es divideix en dues branques, la oxidativa i la no oxidativa. La branca oxidativa, que és irreversible, catalitza el pas de la glucosa-6-fosfat a ribosa-5-fosfat a través de tres reaccions que generen NADPH. L'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) catalitza el primer pas d'aquesta via i es considera un enzim clau en el control d'aquesta (Boren et al., 2002). En la branca no oxidativa, que és reversible, les pentoses produïdes en la branca oxidativa s'intercanvien entre sí a través d'una sèrie de reaccions que permeten l'intercanvi de les seves molècules de carboni per formar gliceraldehid-3-fosfat i fructosa-6-fosfat. Aquestes últimes molècules poden entrar directament a la via de la glicòlisi o bé ser reintroduïdes a la PPP. L'enzim que principalment regula la branca no oxidativa és la transcetolasa (TKT).

Diferents oncogens i gens supressors de tumors regulen la via de les pentoses fosfat indicant l'existència d'una relació entre la reprogramació metabòlica d'aquesta via amb la progressió tumoral. Per exemple, s'ha descrit que mutacions en l'oncogen K-Ras indueixen l'activació de la G6PD (de Aauri et al., 2011), fent que aquesta via es trobi augmentada. En canvi, el supressor de tumors p53 inhibeix directament l'activitat de la G6PD i per tant la via de les pentoses fosfat (Jiang et al., 2011).

- **Metabolisme lipídic**

Els lípids estan implicats en la transducció de senyals i participen en la regulació del creixement cel·lular, proliferació, diferenciació, supervivència, apoptosi, homeòstasi, motilitat i resistència a fàrmacs (Huang and Freter, 2015; Santos and Schulze, 2012). En la reprogramació metabòlica de les cèl·lules tumorals té lloc un augment de la biosíntesi de lípids que permet la formació de les membranes cel·lulars i orgànuls per poder mantenir l'elevada taxa proliferativa d'aquestes cèl·lules. Aquest augment de la lipogènesi es dona gràcies a l'augment dels precursors per a la síntesi d'àcids grassos a través del transport de glucosa i glutamina, de la glicòlisi i de la PPP i de la sobreexpressió dels enzims que controlen la síntesi de lípids, com són l'ATP-citrat liasa (ACLY), l'àcid gras sintasa (FAS) i l'acetil-CoA carboxilasa (ACC), donant lloc a un augment en l'activació d'aquest metabolisme respecte les cèl·lules normals (Zhang and Du, 2012). A més, les vies de senyalització que regulen la síntesi de lípids es troben alterades en càncer, com són les vies relacionades amb el factor de transcripció SREBP, el qual està regulat per supressors de tumors com p53, pRB i AMPK, i activat per oncogens com PI3K i Akt (Porstmann et al., 2005).

- **Metabolisme d'aminoàcids**

Els aminoàcids són necessaris per a la supervivència cel·lular ja que, a part de formar part de les proteïnes, poden ser metabolitzats com a font de carboni i nitrogen per la biosíntesi d'altres molècules i, per tant, permeten mantenir el metabolisme proliferatiu de les cèl·lules (Tsun and Possemato, 2015). A continuació s'expliquen alguns dels aminoàcids més importants en aquesta síntesi.

- **Metabolisme de la glutamina**

Com s'ha comentat anteriorment, la glucosa és el principal substrat energètic de les cèl·lules, però no és l'únic. Les cèl·lules tumorals utilitzen la glutamina, que és l'aminoàcid més abundant en el plasma, per generar lactat i ATP, procés que es coneix com

glutaminòlisi (Daye and Wellen, 2012). Aquesta via metabòlica, que es troba sobreexpressada en molts tipus de càncer, a part de proporcionar energia en forma d'ATP, proporciona poder reductor en forma de NADPH, el qual és necessari per la síntesi de nucleòtids i d'àcids grassos, com l' $\alpha$ -cetoglutarat, i reomple els intermediaris del cicle de Krebs o cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) (anaplerosi). Finalment, pot convertir-se en lactat en el citosol, o bé en àcids grassos, aminoàcids, nucleòtids o glutatió (Daye and Wellen, 2012; DeBerardinis and Cheng, 2010). Per tant, tot i que la glutamina és un aminoàcid no essencial, les cèl·lules tumorals consumeixen una gran quantitat de glutamina en comparació amb les cèl·lules normals i s'ha vist que indueixen l'activació dels transportadors de glutamina (Chen et al., 1993).

Per tant, la glucosa i la glutamina són les dues fonts principals de nutrients que permeten la proliferació de les cèl·lules tumorals ja que no només aporten ATP sinó que també precursors per a la síntesi de proteïnes, lípids i àcids nucleics. De fet, algunes cèl·lules canceroses canvien la seva font de carboni en funció de la disponibilitat de nutrients. Aquesta adaptació que presenten aquestes cèl·lules s'ha de tenir en comte alhora de dissenyar teràpies contra el càncer (Tarrado-Castellarnau et al., 2016).

### - Metabolisme de la serina i glicina

En alguns tipus de càncer s'ha observat un augment de la biosíntesi de la serina i la glicina (Davis et al., 1970; Snell, 1984). Aquesta via proporciona els precursors essencials per a la síntesi de proteïnes, àcids nucleics i lípids que són importants per al creixement cel·lular del tumor. A més, la biosíntesi de la serina i glicina afecta a la capacitat antioxidantiva de la cèl·lula, mantenint la homeòstasi redox del tumor (Yang and Vousden, 2016).

La síntesi de serina es dona a partir de 3-fosfoglicerat, el qual és un intermediari de la glicòlisi, a través de tres reaccions. A partir de la serina s'obté la glicina per eliminació d'un àtom de carboni, el qual es transfereix a altres vies metabòliques, conegut com el metabolisme d'un carboni, i s'utilitza per a la síntesi de proteïnes, lípids, àcids nucleics i altres cofactors. Un dels enzims importants en aquesta via és el 3-fosfoglicerat deshidrogenasa (PHGDH), que oxida el 10 % del 3-fosfoglicerat en 3-

fosfohidroxipiruvat, el qual és un precursor de la serina (Locasale, 2013). Aquest enzim s'ha trobat sobreexpressat en una proporció elevada de càncers i en melanoma (Possemato et al., 2011). També s'ha descrit que l'activació de la biosíntesi de la serina està implicada en la proliferació de les cèl·lules canceroses i predispesa a les cèl·lules epitelials normals a la transformació cel·lular (Amelio et al., 2014; Mattaini et al., 2016). Per exemple, la serina actua com un activador al·lostèric de la PKM2. Per tant l'acumulació d'aquest aminoàcid dona lloc a l'augment de la glicòlisi i a la producció de lactat, processos que són clau per al creixement i supervivència del tumor (Ye et al., 2012).

- **Metabolisme mitocondrial**

El metabolisme mitocondrial és essencial per les cèl·lules canceroses ja que està implicat en nombrosos processos cel·lulars com la generació d'ATP, la regulació de l'apoptosi i la regulació de vies de transducció de senyals a través de la producció de ROS, de la modulació dels nivells de calci al citosol i del tràfic de petits metabòlits. Una de les vies que té lloc al mitocondri és el TCA, aquest proporciona precursors per la biosíntesi de lípids, àcids nucleics i proteïnes com també NADH i FADH per a la producció d'ATP. Mutacions en gens que codifiquen per enzims d'aquesta via s'han associat amb alguns tipus de càncers (Desideri et al., 2015; Gaude and Frezza, 2014). A més, el genoma mitocondrial codifica per proteïnes que formen part de la cadena respiratòria, de manera que mutacions en aquest DNA afecten a la funcionalitat de la cadena respiratòria. (Carew and Huang, 2002; Singh and Trigun, 2010; Taylor and Turnbull, 2005). Aquest tipus de mutació s'ha trobat en càncer de pròstata (Chen and Kadlubar, 2004) i leucèmia (Carew and Huang, 2002). La generació de ROS, per part del mitocondri com a conseqüència de l'elevat metabolisme oxidatiu, és un dels factors implicats en les mutacions al DNA mitocondrial a causa de la seva proximitat física amb aquestes molècules (Trachootham et al., 2009). Una disfunció en la fosforilació oxidativa fa que les cèl·lules hagin d'utilitzar la via glicolítica com a font d'obtenció d'ATP. Donat que l'eficiència energètica de la glicòlisi (2 mols d'ATP per mol de glucosa) és molt menor que la de la fosforilació oxidativa (36 mols d'ATP per mol de glucosa), caldria un augment

important en el consum glucosa i glicòlisi per mantenir el balanç energètic en condicions en què hi hagi pèrdua de funció respiratòria (Pelicano et al., 2006).

Cal dir que hi ha carcinomes que presenten mutacions mitocondrials que correlacionen amb una taxa respiratòria baixa i viabilitat reduïda (Carew and Huang, 2002; Gaude and Frezza, 2014). Però també hi ha càncers que tenen uns nivells de mutacions mitocondrials molt baixos (Moreno-Sánchez et al., 2007; Wallace, 2012; Weinberg et al., 2010).

### **2.1 Metabolisme de la glucosa**

Com ja s'ha comentat, les cèl·lules necessiten energia en forma d'ATP per tal de sobreviure i proliferar. En condicions fisiològiques, aquesta s'obté principalment de dues fonts: la glicòlisi i el TCA-cadena respiratòria mitocondrial. En condicions d'aerobiosi, les cèl·lules normals degraden la glucosa fins a piruvat, el qual entra al mitocondri on és oxidat en el TCA generant energia per mitjà de la cadena respiratòria a través de la fosforilació oxidativa mitocondrial. Així doncs, en presència d'oxigen lliure, a partir d'un mol de glucosa la cèl·lula s'obtenen 36 mols d'ATP, es generen precursors metabòlics per a la síntesi d'altres molècules i es regula el potencial redox de la cèl·lula a través de la generació de NADH i NADPH (Deberardinis et al., 2008). En canvi, en un ambient on l'oxigen és limitant, és a dir, en condicions anaeròbies, el procés de fosforilació oxidativa no és actiu i, per tant, la cèl·lula opta per una via alternativa en la que el piruvat no és oxidat a acetil-CoA sinó que és transformat a lactat a través d'una reacció catalitzada per la lactat deshidrogenasa (LDH). El lactat produït és secretat per la cèl·lula a través dels transportadors d'àcids monocarboxílics (MCT). Aquest mecanisme es coneix com glicòlisi anaeròbica i té un rendiment energètic molt més baix que la glicòlisi aeròbica ja que només s'obtenen dues molècules d'ATP per mol de glucosa. En funció de les condicions ambientals les cèl·lules escullen una via o l'altra.

A diferència de les cèl·lules normals, les cèl·lules tumorals metabolitzen la major part de la glucosa a lactat, fins i tot en presència d'oxigen. Aquest canvi en el metabolisme va ser

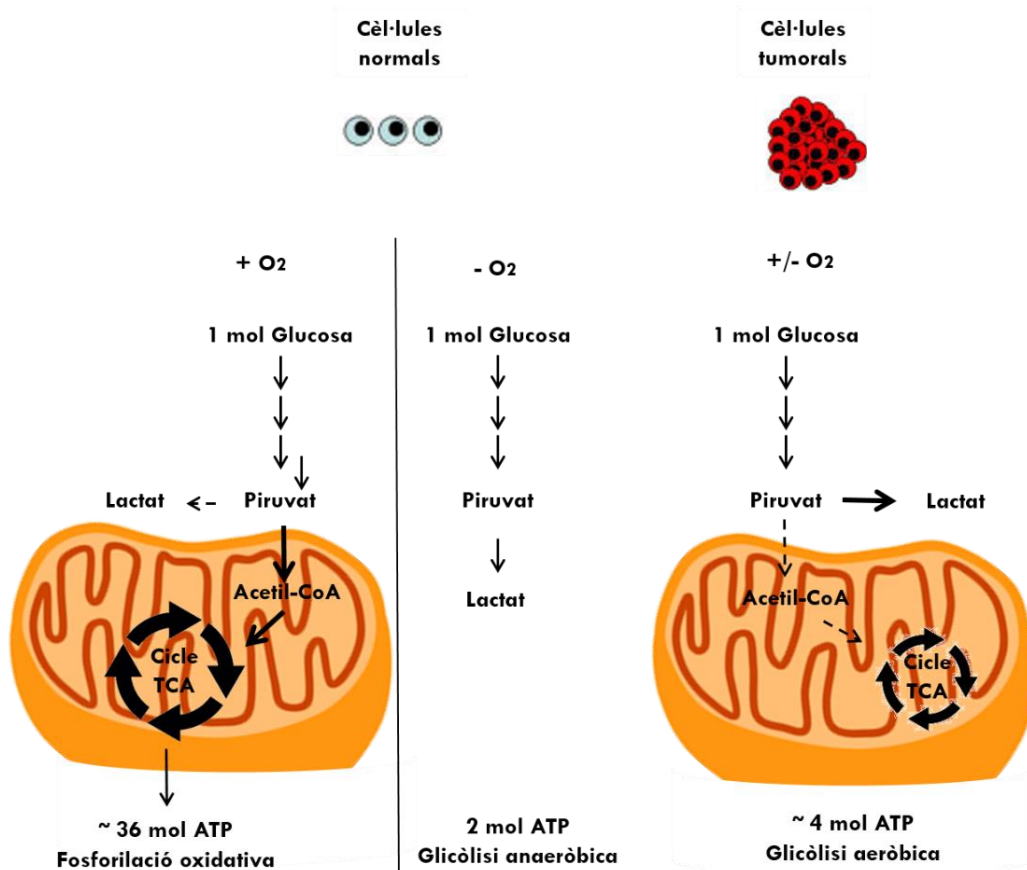
observat per primer cop per Otto Warburg al 1924 i es coneix com l'efecte *Warburg* (Warburg, 1925, 1956), el qual és la major diferència metabòlica entre les cèl·lules normals i tumorals.

Després de que Warburg presentés per primer cop els seus resultats van sorgir nombrosos estudis que donaven suport al què ell havia descrit i pel que obtingué el premi Nobel l'any 1931, tot i que anteriorment s'havien publicat alguns treballs que apuntaven en la direcció de Warburg. Per exemple, Carl i Gerty Cori van realitzar diversos experiments *in vivo* per estudiar el metabolisme de carbohidrats en cèl·lules tumorals (Cori, 1925; Cori CF., 1925). Aquests autors van observar que diferents tipus de tumors mostraven un contingut de glucosa lliure més baix que la resta de teixits analitzats, suggerint que un increment en el consum de glucosa era compatible amb un canvi de respiració a fermentació. A la mateixa època que Warburg, Herbert Grace Crabtree va descriure un fenomen semblant. Va observar que alguns tumors presentaven una disminució de la respiració cel·lular quan s'incrementaven els nivells de glucosa (Crabtree, 1929). Aquest fet, anomenat *efecte Crabtree*, s'ha descrit en cèl·lules altament proliferants i tumorals, com les que es troben a la mucosa intestinal o als espermatozous (Guppy et al., 1993; Wojtczak et al., 1999), mentre que la majoria de les cèl·lules diferenciades no presenten aquest comportament.

Malgrat que algunes cèl·lules tumorals no presenten una glicòlisi elevada (Zu and Guppy, 2004), l'efecte *Warburg* s'ha observat en una gran varietat de càncers humans, tal i com s'ha pogut comprovar a l'analitzar molts tipus de tumors per la tècnica PET, com també en cèl·lules i teixits proliferants com limfòcits T i teixits embrionaris (Bortner et al., 2016; Fernández-Ramos et al., 2016). Warburg va hipotetitzar que el motiu pel qual les cèl·lules canceroses depenien de la glicòlisi per sobreviure era que presentaven defectes en la funció mitocondrial. De fet, tant, l'efecte *Warburg* com l'efecte *Crabtree* es podrien explicar per alteracions enzimàtiques de la cadena respiratòria i, per aquesta raó, la glicòlisi aeròbica permetria a les cèl·lules canceroses adaptar-se a la manca de generació d'ATP per fosforilació oxidativa. Però, posteriorment, es va descriure que els defectes mitocondrials són en general rars (Frezza and Gottlieb, 2009) i que molts tumors mantenen la capacitat de fer la fosforilació oxidativa.

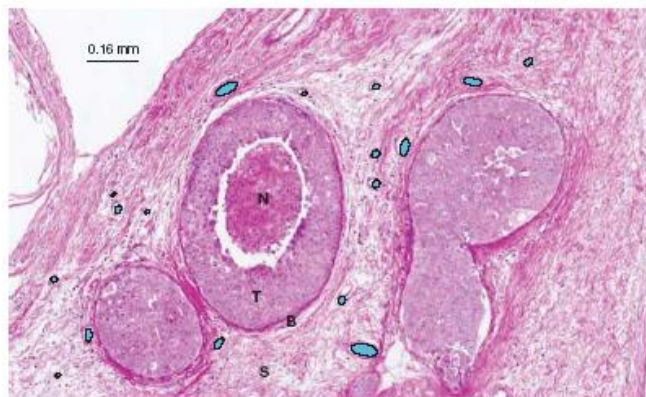


Com que la majoria de les cèl·lules tumorals depenen de la glicòlisi aeròbica per obtenir ATP, independentment de la presència d'oxigen, i presenten una fosforilació oxidativa reduïda, el seu rendiment energètic es molt més baix que el de les cèl·lules normals, obtenint fins a 4 mols d'ATP per cada molècula de glucosa (Vander Heiden et al., 2009) (Figura 4).



**Figura 4. Representació esquemàtica del metabolisme de la glucosa de la cèl·lula normal i cèl·lula cancerosa.** Quan la concentració d'oxigen no és limitant, les cèl·lules normals metabolitzen la glucosa a piruvat, el qual es transforma a Acetil-CoA per a entrar a la cadena respiratòria mitocondrial. Quan la concentració d'oxigen és limitant, el piruvat es metabolitza a lactat en el citosol. Les cèl·lules canceroses principalment oxiden el piruvat a lactat, independentment de la presència d'oxigen (*efecte Warburg*). Figura adaptada de (Zhang et al., 2015).

Tot i això, el percentatge d'ATP produït per la glicòlisi pot arribar a superar el de la respiració mitocondrial (DeBerardinis et al., 2008). La producció glicolítica d'ATP té lloc a una velocitat 100 vegades superior respecte de l'oxidació mitocondrial i, per tant, supera la velocitat d'oxidació del piruvat, de manera que les cèl·lules han d'eliminar aquest piruvat utilitzant una altra via que tingui un alt flux, és a dir, a través de la conversió a lactat. L'augment d'aquesta via confereix a les cèl·lules tumorals una sèrie d'avantatges proliferatius. En les primeres etapes del procés de carcinogènesi, els càncers són avasculars, per tant, la primera limitació a la que es veuen sotmeses les cèl·lules neoplàsiques és una concentració baixa d'oxigen. S'ha proposat que la glicòlisi sorgeix com una adaptació a les restriccions ambientals inicials (hipòxia) durant el procés de la carcinogènesi per obtenir ATP en absència d'oxigen (Gatenby and Gillies, 2004). A partir de models de difusió i estudis empírics s'ha observat que la pressió d'oxigen disminueix més ràpid que els nivells de glucosa al recórrer la mateixa distància des dels vasos sanguinis fins a les cèl·lules tumorals (Gatenby and Gillies, 2004) (**Figura 5**).



**Figura 5. Carcinoma ductal in situ.** Mostra d'una biòpsia tenyida amb hematoxilina/ eosina. Els vasos sanguinis (blau) 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). Figura extreta de (Gatenby and Gillies, 2004).

Els mateixos autors van suggerir que la hipòxia és el factor ambiental que afavoreix el canvi cap al fenotip glicolític. Com a conseqüència d'aquest increment de la glicòlisi, té

lloc l'acidificació del microambient, deguda a la producció de lactat, la qual facilita la invasió tumoral per mitjà de la destrucció de les cèl·lules normals adjacents, l'alliberació, per part dels fibroblasts i macròfags, d'enzims proteolítics que degraden la matriu extracel·lular facilitant així la invasió, la metàstasi i l'estimulació de l'angiogènesi per la secreció de factors com VEGF (Gillies et al., 2008; Montcourrier et al., 1997; Rozhin et al., 1994). També s'ha descrit que el lactat produït per les cèl·lules hipòxiques d'un tumor pot ser utilitzat com a substrat energètic per les cèl·lules aeròbiques que l'envolten més properes als vasos sanguinis. Per tant, utilitzant el lactat com a font d'energia, les cèl·lules no consumeixen la glucosa i per tant augmenta la seva disponibilitat per les cèl·lules hipòxiques del tumor (Semenza, 2008).

El fenotip glicolític dóna a la cèl·lula la capacitat de captar quantitats de glucosa un ordre de magnitud superior respecte de la cèl·lula normal, a causa de l'augment de transportadors de glucosa. Estudis recents suggereixen que el major avantatge de l'efecte *Warburg* no és la generació d'ATP a través de la glicòlisi, sinó que la generació de diversos metabòlits intermediaris, a través de la degradació de la glucosa, que poden actuar com a precursors per diferents vies anabòliques com la PPP i la síntesi de serina. Aquestes vies sintetitzen les biomolècules essencials, com ara àcids nucleics, proteïnes i lípids, necessàries per duplicar els components cel·lulars durant la divisió. A més, la reducció de l'entrada del piruvat al mitocondri fa que disminueixin els nivells de ROS i per tant l'apoptosi (Vander Heiden et al., 2009; Liberti and Locasale, 2016; Moreno-Sánchez et al., 2007). Aquest avantatge es dóna per l'activació d'oncogens que estimulen l'expressió d'enzims glicolítics que permeten obtenir un elevat flux d'oxidació de la glucosa a lactat (Levine and Puzio-Kuter, 2010; Tarrado-Castellarnau et al., 2016; Yu et al., 2015). Els diferents oncogens que activen la glicòlisi s'explicaran en un dels següents apartats.

---

## **2.2 El metabolisme glicolític del càncer com una perspectiva terapèutica**

Donat que les cèl·lules tumorals depenen principalment de la glucosa per obtenir energia, actualment molts estudis es centren en el desenvolupament d'agents terapèutics contra diferents enzims glicolítics o transportadors de productes de la glicòlisi. A continuació es presenten els diferents enzims glicolítics o relacionats amb aquesta via que estan sobreexpressats en tumors. Actualment, existeixen diferents compostos en assajos pre-clínic i clínic amb potencial ús mèdic (Yu et al., 2015).

### **2.2.1 Transportadors de glucosa (GLUTs)**

Els transportadors de glucosa (GLUTs) permeten el pas d'aquest metabòlit a través de la membrana cel·lular. Les cèl·lules tumorals presenten un increment del transport de glucosa que s'ha associat a un augment de l'expressió de GLUT (Macheda et al., 2005). Existeixen diferents isoformes de GLUT (GLUT1-4) amb propietats cinètiques diferents. GLUT1 té una alta afinitat per la glucosa (Medina and Owen, 2002) i la transcripció del gen de GLUT1 està regulat per HIF-1 (Chen et al., 2001), c-myc (Osthus et al., 2000) i Akt (Kroemer and Pouyssegur, 2008; Rathmell et al., 2003). Tant GLUT1 com GLUT3 s'han trobat sobreexpressats en diferents tipus de tumors com pulmó, ovari, mama i colon (Baer et al., 1997; Cantuaria et al., 2001; Haber et al., 1998; Kang et al., 2002; Ogawa et al., 1997; Younes et al., 1997). La sobreexpressió d'aquests transportadors de glucosa en diferents tipus de tumors s'utilitza com a indicador de baixa supervivència (Ayala et al., 2010; Fenske et al., 2009; Kim et al., 2002; Macheda et al., 2005).

### **2.2.2 Hexoquinasa II (HK-II)**

L'hexoquinasa II (HK-II) és un membre de la família d'enzims HK que catalitza la primera reacció de la glicòlisi, en la qual la glucosa es fosforila a glucosa-6-fosfat (Glu-6-P) de manera que aquesta no pot sortir del citoplasma cel·lular, esdevenint un punt clau del control del flux glicolític. S'ha observat que l'enzim HK es troba sobreexpressat en cèl·lules tumorals-II (Lyshchik et al., 2007; Mathupala et al., 1997; Palmieri et al., 2009;

Peng et al., 2008; Rempel et al., 1996; Rho et al., 2007) i que promou el creixement tumoral i metàstasi regulant la producció de lactat en cèl·lules de càncer de pàncrees (Anderson et al., 2014). El gen codificant per la HK-II està regulat per HIF (Rankin and Giaccia, 2008). L'HK-II pot unir-se a la membrana mitocondrial externa a través de la interacció entre 15 aminoàcids hidrofòbics de la regió amino-terminal amb el canal d'anions dependent de voltatge (Pastorino et al., 2002). Aquesta unió permet que l'HK-II sigui menys sensible a la inhibició per la Glu-6-P (Pedersen, 2007) i té més fàcil accés a l'ATP, generat als mitocondris mitjançant fosforilació oxidativa, per canalitzar-lo cap a la fosforilació d'hexoses (Arora and Pedersen, 1988; Bessman and Fonyo, 1966) contribuint així al fenotip glicolític alhora que bloqueja l'alliberament del citocrom c, protegint a la cèl·lula de l'apoptosi (Majewski et al., 2004).

### 2.2.3 Piruvat quinasa (PK)

La piruvat quinasa (PK) és un enzim clau que catalitza un pas limitant de la glicòlisis, la desfosforilació del fosfoenolpiruvat (PEP) a piruvat per produir ATP. La PK de múscul (PKM) és un dels enzims clau de l'efecte Warburg i del metabolisme tumoral. Les isoformes PKM1 i PKM2 són produïdes per *splicing* alternatiu del gen PKM. La isoforma PKM1 és constitutivament activa i s'expressa en teixits diferenciats com múscul i cervell. En canvi, la isoforma PKM2 s'expressa en teixits que tenen funcions anabòliques, incloent cèl·lules proliferants i canceroses. En la majoria de cèl·lules canceroses, PKM2 es troba sobreexpressada i per tant pot ser considerada com una diana terapèutica contra el càncer. La PKM2 es caracteritza per tenir una menor afinitat pel PEP (Schering et al., 1982) i el seu principal activador alostèric és la fructosa-1,6-bisfosfat (Fru-1,6-P<sub>2</sub>) (Dombrauckas et al., 2005; Jurica et al., 1998). A més, l'aminoàcid serina és un regulador positiu de la PKM2. L'activitat de la PKM2 també es regula per modificacions post-traduccionals com fosforilació, acetilació i oxidació. La disminució de l'activitat de la PKM2 al citoplasma facilita l'acumulació d'intermediaris glicolítics i la seva entrada a vies anabòliques com la síntesi de glicerol i la PPP, la qual produeix NADPH per inhibir la producció de ROS i està involucrada en la síntesi de nucleòtids (Dong et al., 2016).

### 2.2.4 Fosfofructoquinasa-1 (PFK-1)

La fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) catalitza la fosforilació de la Fru-6-P a Fru-1,6-P<sub>2</sub>, consumint ATP. Aquesta reacció és un pas limitant de la via glicolítica ja que és una reacció irreversible i, a més a més, el producte d'aquesta activa la HK i la PK que, com hem comentat, catalitzen la conversió de la glucosa a Glu-6-P i la del PEP a piruvat, respectivament, que són passos que controlen el flux glicolític. Per tant, la PFK-1 és de gran importància en la regulació de la glicòlisi en resposta a la transformació tumoral. La PFK-1 és un enzim multimodulat ja que la seva activitat està regulada de manera al·lostèrica per dos substrats de la reacció, l'ATP i la Fru-6-P. L'ATP actua com a efector al·lostèric negatiu, mentre que la Fru-6-P allibera l'enzim d'aquesta inhibició per l'ATP. La PFK-1 també està regulada per altres efectors negatius com el citrat, glicerol-3-P i la concentració de protons i per efectors positius com l'AMP que reforcen l'acció dels substrats. Però, l'activador al·lostèric més potent de la PFK-1 és la fructosa-2,6-bisfosfat (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) (Hers and Van Schaftingen, 1982; Rider and Bartrons, 2010). La regulació de la PFK-1 per la Fru-2,6-P<sub>2</sub> es tractarà més endavant.

Les cèl·lules tumorals expressen majoritàriament la forma L de la PFK-1 (PFK-1L) que es caracteritza per presentar una activitat més alta, ser menys sensible a la inhibició per ATP i citrat i ser més sensible a l'activació per Fru-2,6-P<sub>2</sub> (Colomer et al., 1987; Vora et al., 1985). A més a més, la PFK-1L està induïda per HIF (Marín-Hernández et al., 2009). L'activitat de la PFK-1 està incrementada en línies cel·lulars transformades i en cèl·lules tumorals i també pot activar-se per sobreexpressió dels oncogens RAS i SRC (Boscá et al., 1985; Hennipman et al., 1988; Kole et al., 1991).

### 2.2.5 Lactat deshidrogenasa (LDH)

La lactat deshidrogenasa (LDH) catalitza l'últim pas de la glicòlisi, el qual redueix el piruvat a lactat. La LDH és un tetràmer format per dues subunitats, la subunitat LDH-H, que es codifica pel gen LDH-B i s'expressa de forma ubiqa en teixits sans, i la subunitat LDH-M, codificada pel gen LDH-A, el qual és díana de HIF-1. La LDH-M presenta una major *K<sub>m</sub>* pel piruvat i una major *V<sub>max</sub>* per la reducció del piruvat comparat amb la LDH-

H (Markert et al., 1975), per tant, juga un paper important en el manteniment de l'elevat flux glicolític de les cèl·lules canceroses.

### **2.2.6 6-fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2)**

L'enzim 6-fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2) catalitza la síntesi de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> a partir de Fru-6-P. Com ja s'ha comentat, la Fru-2,6-P<sub>2</sub> és un regulador important de la glicòlisi, ja que activa al·lostèricament a la PFK-1, que és un dels enzims clau en la regulació d'aquesta via. Tant el paper d'aquest enzim com la seva regulació es tractaran amb més profunditat en un dels següents apartats.

## **2.3 Oncogens, gens supressors de tumors i vies de senyalització implicades en la reprogramació metabòlica**

La reprogramació metabòlica de les cèl·lules tumorals és el resultat d'alteracions de vies de senyalització intracel·lulars degudes a mutacions en oncogens i gens supressors de tumors. De fet, en molts càncers l'activació d'oncogens o la inhibició de gens supressors per aquestes mutacions és el que determina el fenotip metabòlic del tumor proporcionant un avantatge a les cèl·lules tumorals sobre les cèl·lules normals (Levine and Puzio-Kuter, 2010; Tarrado-Castellarnau et al., 2016; Yu et al., 2015). A continuació s'explica el paper de diferents oncogens, gens supressors de tumors i vies de senyalització implicades en la reprogramació metabòlica.

### **2.3.1 HIF-1 $\alpha$**

Un dels punts claus per entendre el fenotip glicolític és el factor de transcripció HIF-1 $\alpha$  (Courtney et al., 2015; Semenza, 2002, 2008). Els nivells de la proteïna HIF-1 $\alpha$  s'han trobat augmentats en la majoria de càncers humans (Zhong et al., 1999) i, en biòpsies de tumors primaris, els nivells elevats d'HIF-1 $\alpha$  s'han associat amb un increment del risc de mortalitat (Semenza, 2010). Com s'ha explicat anteriorment, durant el procés de la carcinogènesi arriba un moment en què les cèl·lules que estan creixent a l'epiteli superen

el límit de difusió d'oxigen i passen a estar en un ambient hipòxic. S'ha proposat que és en aquest moment en el que les cèl·lules inicien el canvi cap al fenotip glicolític (Abbey et al., 2006). Durant el creixement desorganitzat de les cèl·lules (displàsia) es produeix una hipòxia intermitent que afavoreix l'estabilització de HIF-1 (Dewhirst, 2007; Martinive et al., 2006). Mitjançant l'activació transcripcional dels seus gens diana, HIF actuaria afavorint aquelles cèl·lules menys dependents de l'oxigen i amb un fenotip més glicolític. Aquestes cèl·lules de glicòlisi incrementada produirien un increment de l'àcid làctic intersticial causant acidosi. Aquests dos fenòmens, hipòxia i acidosi podrien causar la mort cel·lular per necrosi o apoptosi de les cèl·lules no transformades, afavorint encara més la proliferació de les cèl·lules amb un fenotip més resistent al pH baix. També s'ha descrit que l'acidificació del microambient tumoral facilita la invasió del tumor per la degradació àcida de la matriu extracel·lular, de manera que les cèl·lules que adquireixen motilitat poden superar la membrana basal i accedir així als vasos sanguinis i limfàtics formats de nou pel procés de l'angiogènesi (Smallbone et al., 2005).

El factor HIF-1 $\alpha$  indueix gens que participen en l'angiogènesi, el transport d'oxigen, la glicòlisi, la captació de glucosa, la senyalització per factors de creixement, l'apoptosi, la invasió i la metastasi (Arias et al., 2000; Dayan et al., 2006; López-Barneo et al., 2001; Mezquita et al., 1998; Pouyssegur et al., 2006; Semenza, 2002, 2008). Aquest factor contribueix a l'augment de la glicòlisi en els tumors a través de l'activació directa de GLUT1, HK-II, PDK1, PKM2 (Denko, 2008). Per exemple, HIF-1 bloqueja el TCA i la respiració mitocondrial a través de la inducció de la PDK1, que inhibeix, per fosforilació, l'activitat de la piruvat deshidrogenasa (PDH). D'aquesta manera, es limita el piruvat que entra al TCA, fent que les cèl·lules hipòxiques acumulin aquest metabòlit que convertiran a lactat amb l'activitat de la LDH-A, regenerant així el NAD<sup>+</sup> necessari per la glicòlisi d'aquestes cèl·lules (Kim et al., 2006a; Papandreou et al., 2006). Al inhibir-se el complex de la PDH no només es frena la respiració mitocondrial sinó que també disminueix la producció mitocondrial de ROS en aquestes cèl·lules hipòxiques, estimulant la supervivència cel·lular (Cairns et al., 2006; Kim et al., 2006a; Papandreou et al., 2006). També s'ha demostrat que HIF-1 $\alpha$  regula PFKFB3, una de les isoformes del gen PFKFB que codifiquen per la família d'isoenzims de PFK-2/FBPasa-2, en condicions d'hipòxia (Obach et al., 2004).



### 2.3.2 AMPK

La quinasa activada per AMP (AMPK) és un important sensor energètic cel·lular que detecta el balanç entre la producció i consum d'ATP (Oakhill et al., 2011). Aquesta quinasa s'activa al incrementar la ratio AMP/ATP, com succeeix quan el subministrament de nutrients és limitat, en condicions d'hipòxia o mitjançant altres quinases (Liang et al., 2007). Un cop activada, AMPK fosforila a proteïnes que participen en la parada del cicle cel·lular (DeFeo-Jones et al., 2005) i en el control del metabolisme energètic (Hardie, 2011). A més a més, s'ha descrit que en situacions d'hipòxia, AMPK fosforila a l'isoenzim PFKFB3, incrementant els nivells del metabòlit Fru-2,6-P<sub>2</sub> i, per tant, activant la via glicolítica (Marsin et al., 2002). També s'ha demostrat que AMPK fosforila a PFKFB3 per dirigir el metabolisme cel·lular cap a la glicòlisi, augmentant la supervivència de les cèl·lules durant la mitosi (Doménech et al., 2015).

### 2.3.3 Via de PI3K/Akt/mTOR

La via de PI3K/Akt/mTOR normalment es troba hiperactivada en tumors i és la principal via de senyalització implicada en el desenvolupament i progressió del càncer ja que regula la proliferació cel·lular, el creixement, la supervivència i la reprogramació metabòlica (Thorpe et al., 2015). Akt és una serina/treonina quinasa que promou el creixement del càncer, activa la glicòlisi i permet que les cèl·lules tumorals depenguin de la glicòlisi per sobreviure (Elstrom et al., 2004). Akt regula la glicòlisi induint l'expressió de HK-II (Zhuo et al., 2015) i de GLUT1 (Barthel et al., 1999). També, Akt fosforila i inactiva a TSC2, un regulador negatiu de mTOR, i indueix la fosforilació i activació d'un dels isoenzims de PFK-2-FBPasa-2 (Deprez et al., 1997; Pozuelo Rubio et al., 2003). A més, Akt activa la síntesi de la proteïna HIF-1 $\alpha$  per la via de PI3K/AKT/mTOR en condicions normals de pressió parcial d'oxigen (Gordan and Simon, 2007; Semenza, 2003) i de PKM2 (Sun et al., 2011).

Els factors de transcripció FOXO (*Forkhead box O*) també són dianes d'Akt i regulen vies del cicle cel·lular, el creixement, la reparació del DNA, la supervivència, l'apoptosi, el metabolisme, la diferenciació cel·lular i la resistència a l'estrès oxidatiu (Greer and Brunet, 2005; Wątroba et al., 2012). Molts càncers presenten hiperactivació de la via de

---

PI3K/Akt a causa de la inactivació de les proteïnes FOXO fet que els fa considerar com a supressors de tumors (Altomare and Testa, 2005; Wang et al., 2014).

La fosfatasa PTEN és un regulador negatiu de la PI3K. S'ha descrit que la pèrdua de PTEN sovint facilita la progressió tumoral i afavoreix la susceptibilitat al càncer (Li et al., 1997), és per això que incrementar PTEN podria ser una bona diana terapèutica pel càncer. Recentment, s'ha vist que l'augment de PTEN en cèl·lules MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) (provinents de ratolins super-PTEN mutants) dóna un canvi metabòlic que afecta de forma negativa a la glutaminòlisi i a l'efecte Warburg, dues de les principals característiques de les cèl·lules canceroses. Concretament, aquests autors assenyalen que l'increment de PTEN de les cèl·lules MEFs provoca una disminució de PFKFB3 i glutaminasa a través de promoure l'activitat APC/C-Cdh1 (Garcia-Cao et al., 2012).

### 2.3.4 p53

En la transformació oncogènica també hi participa la inactivació del gen supressor de tumors TP53 (Bensaad and Vousden, 2007). Aquest gen codifica per la proteïna p53 que indueix la parada del cicle cel·lular i la mort cel·lular en resposta a dany en el DNA, contribuint a l'estabilitat genòmica, però també, té un paper important en la inducció la fosforilació oxidativa mitocondrial i la inhibició de la glicòlisi (Liang et al., 2013). p53 bloqueja la glicòlisi inhibint l'expressió dels transportadors de glucosa (Schwartzenberg-Bar-Yoseph et al., 2004), induint la degradació de la fosfoglicerat mutasa, induint a PTEN, regulador negatiu de PI3K, i activant a AMPK i TSC2, reguladors negatius de mTOR (Feng et al., 2007). També inhibeix la glicòlisi a través de TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*), ja que aquest enzim disminueix la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> redirigint l'oxidació de glucosa cap a la via de les pentoses fosfat, fet que permet la generació de NADPH i, en conseqüència, incrementa el glutatió reduït (GSH), el qual és un substrat necessari per la reconversió dels ROS (Bensaad et al., 2006). Un altre gen diana de p53 és PFKFB3. p53 indueix la biosíntesi de nucleòtids en resposta al dany al DNA bloquejant l'expressió de PFKFB3 que augmenta el flux de la glucosa a través de la via de les pentoses fosfat per augmentar la producció de nucleòtids (Franklin et al., 2016). Per tant, p53 optimitza el seu control sobre la glicòlisi i la PPP inhibint a PFKFB3 i

induint l'expressió de TIGAR en resposta estrès. S'ha descrit que en tumors la proteïna p53 sovint es troba mutada donant lloc a una pèrdua o canvi de la seva activitat que provoca la inducció de la proliferació de les cèl·lules tumorals (Ciriello et al., 2013; Vousden and Lu, 2002).

### **2.3.5 MYC**

El producte del gen MYC és un factor de transcripció multifuncional ja que regula la proliferació cel·lular, la progressió del cicle cel·lular, el creixement, metabolisme, apoptosi, diferenciació i les respostes a estrès a través de la regulació transcripcional dels seus gens diana (Gabay et al., 2014; Meyer and Penn, 2008). L'expressió del gen MYC es troba alterada en molts càncers ja sigui per translocació cromosòmica o amplificació genètica. A més, l'estabilitat de la seva proteïna i del seu mRNA pot estar també alterada, induint la tumorigènesi a través de la proliferació cel·lular descontrolada, inhibició de la diferenciació cel·lular, adaptació metabòlica, angiogènesi, reducció de l'adhesió cel·lular i la inestabilitat genòmica (Adhikary and Eilers, 2005; Gabay et al., 2014; Meyer and Penn, 2008; Wahlström and Henriksson, 2015). S'ha descrit que MYC incrementa la captació de glucosa per activació de GLUT1 i la glicòlisi a través de l'activació de gens glicolítics com HK-II, GAPDH, ENO1 i PK, entre d'altres (Dang et al., 2006, 2008; Osthus et al., 2000; Valera et al., 1995). A més, s'ha observat que c-MYC induïx la producció de lactat augmentant l'expressió del gen LDH-A i el transportador de lactat MCT1 (Adhikary and Eilers, 2005; Gordan et al., 2007; Rimpi and Nilsson, 2007). La majoria d'enzims glicolítics presenten seqüències consens conservades per a MYC (E-boxes) (5'-CACGTG-3') en els seus promotors (Dang et al., 2009).

Per altra banda, MYC induïx l'expressió dels transportadors de glutamina (ASCT2 i SLC7A25) i la glutaminasa mitocondrial permetent que la glutamina s'incorpori al TCA en forma de glutamat o  $\alpha$ -cetoglutarat (Dang et al., 2009; Liu et al., 2012). D'aquesta manera, les cèl·lules poden utilitzar la glutamina com a substrat, que pot acabar donant lloc a lactat o bé utilitzar-se per la síntesi de molècules com nucleòtids, aminoàcids, àcids grassos o glutatió (Wise et al., 2008). També, s'ha vist que MYC activa la biosíntesi de

nucleòtids induint gens implicats en el seu metabolisme (Bello-Fernandez et al., 1993; Dang et al., 2006; Liu et al., 2008; Rimpi and Nilsson, 2007) com també redirigeix el flux glicolític cap a la síntesi de serina i glicina a partir de 3-fosfoglicerat (Vazquez et al., 2011). MYC s'ha descrit com una de les dianes de RAS (Kole et al., 1991), el qual s'ha vist que incrementa el transport de glucosa i la glicòlisi en cèl·lules transformades (Dang and Semenza, 1999; Mazurek, 2011; Shaw and Cantley, 2006).

### **2.3.6 RAS**

RAS és un dels altres oncogens que es troba freqüentment mutat en càncer. Les proteïnes RAS són codificades per tres isoformes, H-RAS, K-RAS i N-RAS. Aquestes proteïnes són GTPases que regulen vies responsables de la proliferació i supervivència cel·lular. Mutacions en la isoforma K-RAS són les més freqüents (Prior et al., 2012). S'ha vist que, mutacions en l'oncogèn RAS augmenten l'expressió de GLUT1, la captació de glucosa, la glicòlisi i la producció de lactat (Yun et al., 2009). Per exemple, s'ha vist que K-RAS activa mTOR a través de la via PI3K/Akt/mTOR estimulando la glicòlisi a través de la inducció de HIF (Düvel et al., 2010).

### 3. PFKFB3: un gen clau

#### 3.1 Paper de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 en el metabolisme de les cèl·lules canceroses

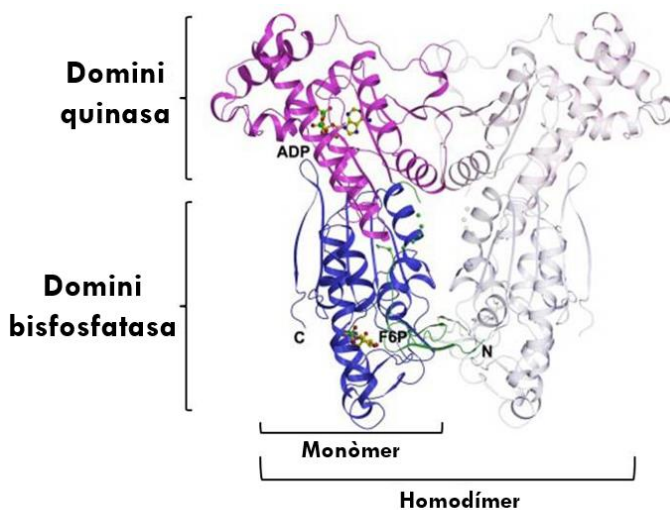
L'enzim PFK-2/FBPasa-2 té un paper molt important en el metabolisme de les cèl·lules canceroses ja que és el responsable de la síntesi i degradació de la Fru-2,6-P<sub>2</sub>, metabòlit regulador de la glicòlisi. La Fru-2,6-P<sub>2</sub> va ser descoberta a principis dels anys vuitanta pel grup del professor Henry G Hers, mentre aquest estudiava l'acció del glucagó en la gluconeogènesi hepàtica. Aquest metabòlit és l'activador al·lostèric més potent de la PFK-1, el qual catalitza la fosforilació de la Fru-6-P a Fru-1,6-P<sub>2</sub> en presència d'ATP, que es converteix a ADP, i és considerat un dels enzims reguladors de la via glicolítica (Hers and Van Schaftingen, 1982; Rider and Bartrons, 2010).

Els primers estudis que es van fer per esbrinar el paper de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> van mostrar que té una doble funció, incrementa l'afinitat de la PFK-1 per la Fru-6-P alhora que allibera a l'enzim de la inhibició per l'ATP. També incrementa l'afinitat de la PFK-1 per l'AMP, un efector al·lostèric positiu, que al seu torn inhibeix la fructos-1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1), la qual catalitza el pas de Fru-1,6-P<sub>2</sub> a Fru-6-P (Pilkis et al., 1995; Van Schaftingen, 1987). D'aquesta manera, les variacions en la concentració d'aquest metabòlit regulen l'activitat de la PFK-1 en tots els teixits i, de forma indirecta, modulen la intensitat i la direcció de la glicòlisi i la gluconeogènesi a través del control de la PFK-1 i la FBPasa-1. Aquest metabòlit es va descobrir en fetge de rata, però des de llavors s'ha trobat en totes les espècies eucariotes estudiades (Rider and Bartrons, 2010). Generalment, la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en cèl·lules tumorals és clarament superior a les que es troben en les cèl·lules normals (Colomer et al., 1987; Riera et al., 2002) i s'han dut a terme molts estudis per investigar el paper de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> en la regulació del flux glicolític en diferents condicions experimentals en què s'estimula la proliferació cel·lular.

Tal i com s'acaba de comentar, la Fru-2,6-P<sub>2</sub> és sintetitzada per l'enzim PFK-2/FBPasa-2 (EC 2.7.1.105/ EC 3.1.3.46) a partir de Fru-6-P i ATP. Per tant, el balanç entre l'activitat

6-fosfoructoquinasa-2 (PFK-2), que sintetitza la Fru-2,6-P<sub>2</sub>, i l'activitat fructosa-2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2), que la degrada, és el que determina la concentració d'aquest metabòlit (Okar et al., 2001; Pilkis et al., 1995; Rider et al., 2004; Van Schaftingen, 1987).

La PFK-2/FBPasa-2 és un enzim homodimèric bifuncional de 110 KDa format per dues subunitats de 55 KDa cadascuna. Cada monòmer presenta les dues activitats en la mateixa cadena polipeptídica, on el domini quinasa es troba a l'extrem N-terminal de la proteïna i el domini bisfosfatasa al C-terminal (**Figura 6**) (El-Maghrabi et al., 1982; Kim et al., 2006b; Okar et al., 2001; Pilkis et al., 1995; Rider and Bartrons, 2010; Rider et al., 2004).

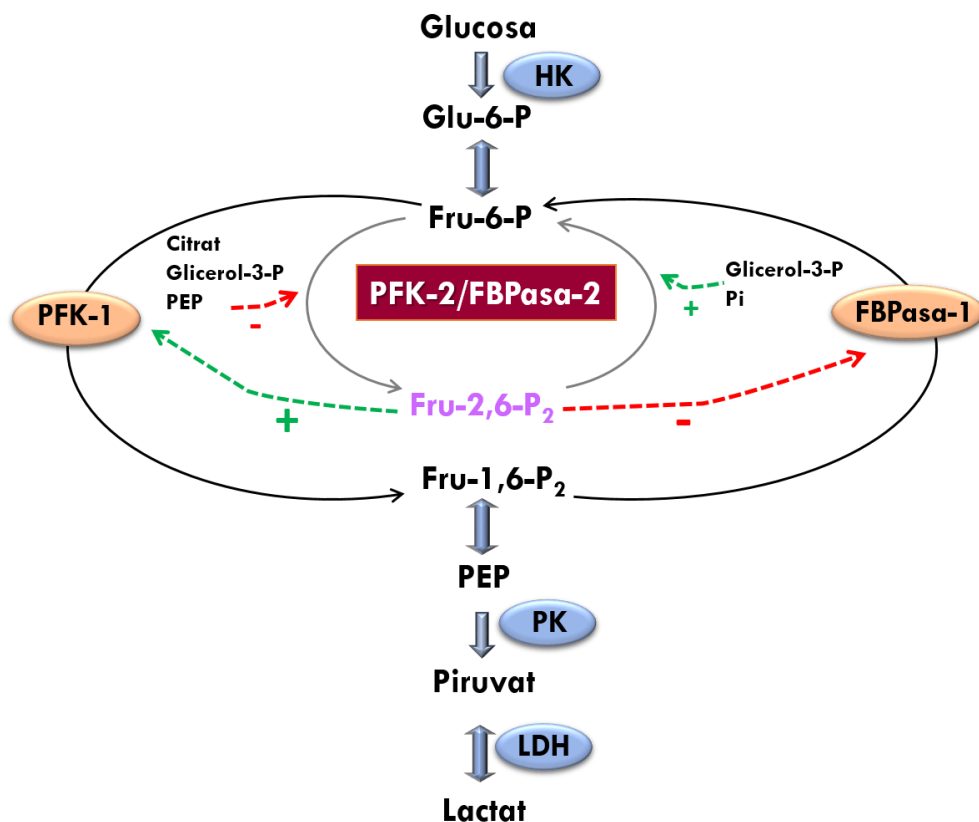


**Figura 6.** Estructura tridimensional del dímer PFK-2/FBPasa-2 de l'isoenzim ubic (PFKFB3). El domini quinasa es representa de color lila i on es troba unit l'ADP correspon al centre catalític. El domini bisfosfatasa és de color blau i al centre catalític s'hi representa la Fructosa-6-P (Kim et al., 2006b).

Els aminoàcids localitzats a prop dels extrems N-terminal i C-terminal de la proteïna són residus fosforilables i, per tant, responsables de part de la seva regulació post-traducciona. Aquesta proteïna deriva de la fusió de dos gens que expressen un domini quinasa, evolutivament relacionat amb la família de proteïnes que enllacen mononucleòtids, com l'adenilat ciclase, i un domini bisfosfatasa, relacionat amb la família de les fosfoglicerat mutases i fosfatases àcides (Okar et al., 2001). Els dos monòmers interaccionen per diversos contactes proteïna-proteïna entre els dominis quinasa de cadascun mentre que els dominis bisfosfatasa tenen molt poques interaccions entre ells

(Okar et al., 2001). En llevats, en canvi, les activitats PFK-2 i FBPasa es localitzen en proteïnes diferents (Kretschmer and Fraenkel, 1991; Kretschmer et al., 1987).

Les propietats d'aquest enzim bifuncional van ser descrites per primera vegada en fetge, d'on es purificà per primer cop. Es va constatar que l'activitat PFK-2 es troba activada per Fru-6-P i inhibida per citrat, PEP i sn-glicerol-3-fosfat (Glicerol-3-P), a concentracions fisiològiques d'aquests metabòlits a l'hepatòcit. L'activitat bisfosfatasa, en canvi, és estimulada per Glicerol-3-P i nucleòsids trifosfats i està inhibida per la Fru-6-P (Bartrons et al., 1983; Rousseau and Hue, 1993) (**Figura 7**).



**Figura 7. Activitat de la PFK-2/FBPasa-2.** En condicions d'elevada activitat bisfosfatasa la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> disminueix facilitant així el pas de Fru-1,6-P<sub>2</sub> a Fru-6-P. En canvi, quan l'activitat quinasa és la predominant, la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> augmenta i activa al·lostèricament l'enzim PFK-1 i, consegüentment, incrementa el flux glicolític.

---

La importància que té la Fru-2,6-P<sub>2</sub> en el control del metabolisme dels glúcids no és igual en tots els teixits, ja que la concentració d'aquest metabòlit depèn de l'activitat relativa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 en tots ells. Mentre que la relació entre la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i la regulació del flux glicolític i gluconeogènic al fetge és molt evident, en teixits com el múscul esquelètic, el testicle o el cervell aquest metabòlit passa a tenir un paper permissiu per mantenir la PFK-1 activa tot i la presència d'inhibidors al·lostèrics (ATP). Això és degut a que el paper de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> està directament relacionat amb la importància de l'enzim PFK-1, fent que en teixits on la glicòlisi és la principal font d'energia, com el cervell, la funció d'aquest metabòlit està limitada a mantenir la via permanentment activa (Hue and Rider, 1987; Okar et al., 2001; Pilkis et al., 1988a; Rider and Bartrons, 2010; Ventura et al., 1991).

El grau de complexitat que representa la regulació dels nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en cada teixit i condició fisiològica, tenint en compte les diferents necessitats energètiques que aquests o els diferents tipus cel·lulars de l'organisme requereixen, expliquen l'existència de diferents isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2 amb capacitat per respondre de forma eficient a les diferents demandes bioenergètiques en cada moment. Mitjançant estudis on es comparaven les propietats enzimàtiques de la PFK-2/FBPasa-2 de fetge amb les característiques dels enzims aïllats d'altres teixits, com cor i múscul, es va evidenciar l'existència de diferents isoenzims amb especificitat tissular (el-Maghrabi et al., 1986; Okar et al., 2001; Rider and Hue, 1985).

### **3.2 Isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2**

Des de la descoberta de l'isoenzim de PFK-2/FBPasa-2 de fetge de rata, s'han descrit més isoenzims localitzats inicialment a múscul esquelètic (Darville et al., 1989), cor (Darville et al., 1991), cervell (Manzano et al., 1998; Ventura et al., 1992, 1995; Watanabe et al., 1994), testicle (Manzano et al., 1999; Sakata et al., 1991), així com un isoenzim fetal clonat a partir de cèl·lules FTO2B d'hepatoma de rata similar a les isoformes de fetge i múscul (Rider et al., 2004). També s'ha identificat un nou isoenzim de



cor que, respecte al identificat anteriorment, només difereix en l'extrem C-terminal (Vidal et al., 1993).

Aquests isoenzims són el resultat de l'expressió de quatre gens (PFKFB1-PFKFB4) (Okar et al., 2001). El gen PFKFB1 codifica pels isoenzims identificats originàriament a fetge, múscul i la isoforma fetal (*F-type*). El gen PFKFB2 codifica per l'isoenzim identificat a cor i ronyó. El gen PFKFB3 codifica pels isoenzims trobats inicialment a cervell, placenta i teixit adipós i és el més abundant a les cèl·lules proliferants i canceroses. Finalment, el gen PFKFB4 codifica per l'isoenzim de testicle, tot i que també s'ha identificat en diverses línies tumorals (Minchenko et al., 2005a) (**Taula 1**).

Els diferents isoenzims estan altament conservats en el seu centre catalític (85%), però presenten diferències en les seves activitats enzimàtiques, és a dir, en la seva relació quinasa:bisfosfatasa, i en la resposta a diferents senyals que els regulen. Aquestes diferències són degudes majoritàriament a diferències en els seus dominis reguladors dels extrems N- i C-terminals que podrien conferir variacions estructurals a la proteïna (Okar et al., 2001). A més, petites diferències en la seqüència dels dominis catalítics que constitueixen els residus secundaris que envolten els centres actius també contribueixen a les diferències cinètiques (Cavalier et al., 2012). Els isoenzims codificats pels gens PFKFB1, PFKFB2 i PFKFB4 mostren una relació quinasa:bisfosfatasa molt similar, mentre que el producte del gen PFKFB3 presenta una relació quinasa:bisfosfatasa molt superior (al voltant de 700) (Sakakibara et al., 1997), fent que la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> resultant sigui alta, activant així l'enzim PFK-1 i, consegüentment, la via glicolítica. A causa de l'elevada activitat quinasa que presenta l'isoenzim PFKFB3, s'ha suggerit com l'isoenzim que majoritàriament contribueix a l'elevada activitat glicolítica de les cèl·lules tumorals (Yalcin et al., 2009). La baixa activitat bisfosfatasa de PFKFB3, la qual és un ordre de magnitud menys que la dels altres isoenzims, és degut a la presència d'un residu de serina a la posició 302 (Ser302) en comptes d'una arginina, que sí que està conservat en els altres isoenzims (Cavalier et al., 2012; Kim et al., 2006b).

Els diferents isoenzims PFK-2/FBPasa-2 es troben regulats per modificacions post-traduccionals que modulen les seves activitats quinasa/bisfosfatasa. Aquest mecanisme de regulació fa que la producció de Fru-2,6-P<sub>2</sub> es trobi sota el control de vies de

---

senyalització cel·lular i facilita la regulació de l'activitat glicolítica en resposta a estímuls extracel·lulars com hormones o factors de creixement. Per tant, aquest metabòlit juga un paper important en l'adaptació cel·lular a canvis del microambient o de l'estat metabòlic.

De les tres isoformes del gen PFKFB1, únicament la isoforma de fetge es fosforila a la Ser32 per mitjà de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (PKA) en resposta a glucagó. Aquesta fosforilació a l'extrem N-terminal de la proteïna dóna un canvi conformacional en el dímer (Okar et al., 2001), disminuint així l'activitat quinasa i augmentant la bisfosfatasa (Bartrons et al., 1983; Stewart et al., 1986). Això comporta la disminució del flux glicolític i l'increment de la gluconeogènesi en les cèl·lules del fetge (Bartrons et al., 1983). L'efecte contrari es dóna quan l'enzim és desfosforilat en resposta a insulina (Nishimura et al., 1994; Pilkis et al., 1988b).

A diferència de l'isoenzim PFKFB1, la fosforilació de l'isoenzim PFKFB2 dóna lloc a un augment de l'activitat PFK-2. Aquest isoenzim presenta dos residus de serina, Ser466 i Ser483, que es poden fosforilar a l'extrem C-terminal del seu domini regulador en resposta a insulina i adrenalina per les quinases Akt, coneguda també com proteïna quinasa B (PKB), i PKA, respectivament, estimulants la glicòlisi (Deprez et al., 2000; Narabayashi et al., 1985; Rider et al., 1992). PFKFB2 també és substrat de PKC, la qual fosforila les serines 84, 466 i 475 (Rider and Hue, 1992) i la Thr476 (Kitamura et al., 1988), malgrat que el paper fisiològic d'aquestes fosforilacions encara avui no està clar. La glicòlisi al cor també s'estimula quan l'aportació d'oxigen és insuficient (*efecte Pasteur*), condició en què l'única font d'ATP és la glicòlisi. Al disminuir la concentració d'ATP i incrementar els nivells d'AMP s'activa AMPK (Hardie et al., 1998) que estimula la glicòlisi incrementant la translocació de GLUT4 i activant la PFKFB2 de cor per fosforilació en la Ser466 (Marsin et al., 2000). També s'ha descrit que, en resposta a aminoàcids, PFKFB2 es fosforila en la Ser483 en les cèl·lules canceroses Hela i MCF7 per Akt, augmentant la producció de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, el consum de glucosa i la producció de lactat. Resultats similars s'han observat en cardiomiòcits de rata tractats amb aminoàcids (Novellademunt et al., 2013a).

En el cas de l'isoenzim PFKFB4, actualment no s'ha descrit cap regulació a nivell de fosforilació però és possible que l'activitat d'aquest isoenzim es moduli per canvis en la

concentració de substrat i producte o per la presència d'activadors o inhibidors. La regulació de l'isoenzim PFKFB3 s'explicarà en un dels següents apartats.

Aquests isoenzims també presenten diferències en la seva distribució en les cèl·lules i els teixits. De fet, encara que els diferents isoenzims es coneixen amb el nom del teixit del qual es van purificar originàriament, se sap que varies isoformes es poden coexpressar en un mateix teixit i fins i tot en una mateixa cèl·lula (Duran et al., 2009; Minchenko et al., 2003) (**Taula 1**).

Gen	Localització al cromosoma humà	Relació quinasa/bisfosfatasa	Isoenzims identificats	Quinases que fosforilen
<b>PFKFB1</b>	Xq27-q28	2.5 (fetge de rata) 0.4 (a múscul de rata)	IPFK-2 (fetge) mPFK-2 (múscul) fPFK-2 (fetal)	PKA
<b>PFKFB2</b>	1q31	1.8 (cor boví)	hPFK-2 (cor)	PKA, PKC, PKB, AMPK
<b>PFKFB3</b>	10p14-p15	710 (placenta humana) 3.1 (cervell boví)	uPFK-2 (cervell, placenta, ubic) iPFK-2 (induïble)	AMPK, PKC, PKA, RSK, MK2
<b>PFKFB4</b>	3p22-p21	0.9 (testicle humà) 4.9 (testicle de rata)	tPFK-2 (testicle)	

**Taula 1. Propietats dels gens PFKFB.** Taula on es mostren els gens que codifiquen per la família PFK-2/FBPasa-2 en mamífers indicant la seva localització al cromosoma, la relació quinasa:bisfosfatasa (especificant el teixit on s'ha fet la determinació), els isoenzims identificats i les quinases que els fosforilen.

---

### 3.3 Els gens PFKFB en mamífers

En mamífers hi ha quatre gens PFKFBs independents (PFKFB1-PFKFB4) que codifiquen pels quatre isoenzims de PFK-2/FBPasa-2 que es van anomenar amb el nom del teixit originari d'on es van purificar. L'expressió d'aquests gens depèn del tipus cel·lular o teixit i de la fase de desenvolupament (Goren et al., 2000). Els gens PFKFB presenten una organització similar, tenen diferents isoformes generades per *splicing* alternatiu i contenen més mRNAs a causa de l'existència de diversos promotors i d'exons 5' no codificants.

#### 3.3.1 El gen PFKFB1

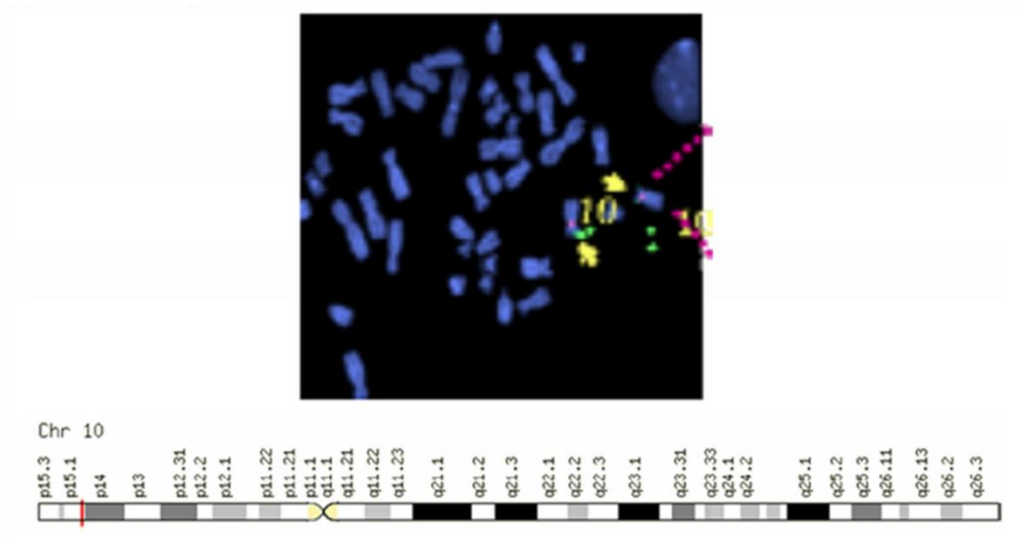
El gen PFKFB1 codifica per l'isoenzim originalment identificat a fetge (PFKFB1). Aquest gen es localitza a la regió p11.21 del cromosoma X en humans (Batra et al., 1997) i conté al voltant de 65 kb amb 14 exons. En rata, el gen PFKFB1 es localitza a la regió q22-q31 del cromosoma X (Olson et al., 1989). Aquest gen dona lloc a tres mRNAs diferents generats per *splicing* alternatiu i cada un d'ells es transcriu sota el control de promotors diferents per donar els mRNAs L, M i F (Darville et al., 1989, 1992; Dupriez et al., 1993). La isoforma L s'expressa en fetge, múscul esquelètic i teixit adipós blanc i codifica per l'isoenzim IPFK-2. El primer exó de la isoforma L codifica per l'extrem N-terminal que conté un residu de serina a la posició 32 (Ser32), el qual és responsable de la regulació de l'isoenzim hepàtic per glucagó i cAMP (Bartrons et al., 1983). La isoforma M s'expressa en múscul esquelètic i teixit adipós blanc i codifica per l'isoenzim mPFK-2. Finalment, la isoforma F s'expressa en fibroblasts i teixit fetal i codifica per l'isoenzim f-PFK-2 (Ros and Schulze, 2013). Tot i que tots els mRNA dels gens PFKFB s'han trobat sobreexpressats en càncer humà de pulmó respecte al teixit normal (Minchenko et al., 2005a), encara no s'ha caracteritzat el possible paper de PFKFB1 en càncer. L'expressió de la isoforma F s'ha trobat induïda en cèl·lules proliferants donant lloc a un augment del flux glicolític (Darville et al., 1992).

### 3.3.2 El gen PFKFB2

El gen PFKFB2 codifica per l'isoenzim identificat a cor i ronyó (h-PFK-2, PFKFB2) i va ser identificat per primera vegada en rata, a la regió q24-q25 del cromosoma 13. En humans està localitzat al cromosoma 1, a la posició 1q31-q32.2 i conté 22 Kb amb 15 exons (Heine-Suñer et al., 1998; Rodríguez-García et al., 2014). Els diferents trànscrips del gen PFKFB2 s'originen a partir de promotors diferents i només difereixen en la seqüència no codificant de l'extrem 5'. Les proteïnes resultants presenten diferències en la seqüència d'aminoàcids de l'extrem C-terminal. L'*splicing* alternatiu, amb deleció de l'exó 15, dona lloc a una isoforma més curta, de 54 KDa, isoforma b, enlloc dels 58 KDa, isoforma a, (Tsuchiya and Uyeda, 1994; Vidal et al., 1993). Aquest exó constitueix una zona reguladora de l'enzim ja que conté residus susceptibles de ser fosforilats per proteïnes quinasa, de les quals s'ha descrit la fosforilació de PFKFB2 per PKA, PKC i PKB (Deprez et al., 1997; Kitamura et al., 1988). Els trànscrips H1, H2 i H4 codifiquen per la isoforma a i l'H3 codifica per la isoforma b. S'ha descrit que el gen PFKFB2 s'indueix en cèl·lules de càncer de pròstata via el receptor d'andrògens (Massie et al., 2011). En cèl·lules LNCaP de càncer de pròstata PFKFB2 s'indueix en resposta al tractament amb andrògens per la unió del receptor d'andrògens activat per lligand al promotor de PFKFB2 (Moon et al., 2011).

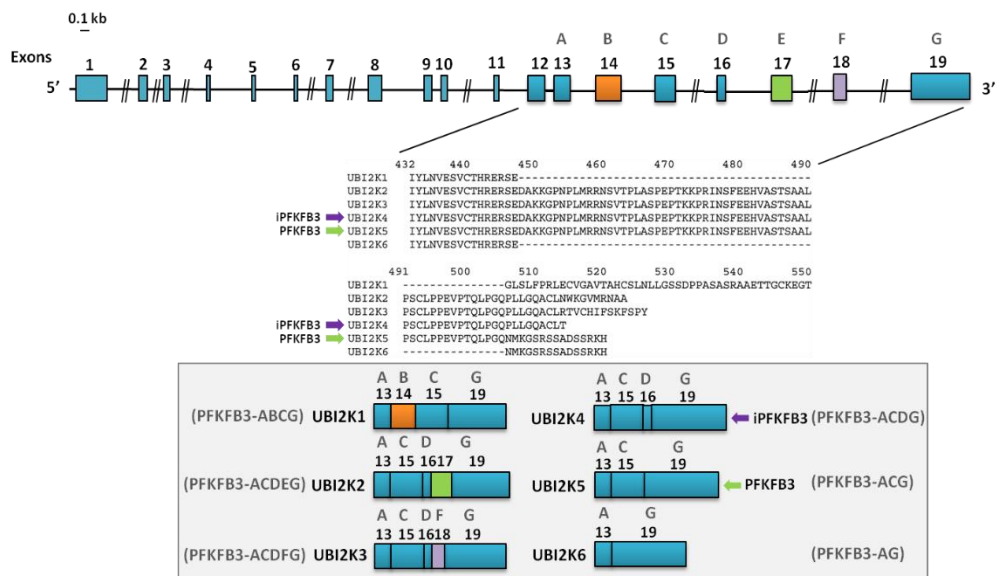
### 3.3.3 El gen PFKFB3

El gen PFKFB3 originàriament es va clonar a partir d'una llibreria de cervell fetal (Manzano et al., 1998; Ventura et al., 1991), de placenta humana (Sakai et al., 1996) i de cèl·lules de càncer de mama (Hamilton et al., 1997). PFKFB3 s'expressa de forma ubíqua i és la isoforma més abundant a les cèl·lules proliferants i canceroses (Novellasmunt et al., 2013b). El gen PFKFB3 es localitza al cromosoma 10 humà, a la posició 10p15.1 (Manzano et al., 1999) (**Figura 8**) i conté al voltant de 90.6 Kb amb 19 exons que, per *splicing* alternatiu, donen lloc a, com a mínim, 6 mRNAs diferents anomenats UBI2K1-6 (Kessler and Eschrich, 2001; Navarro-Sabaté et al., 2001) (**Figura 9**).



**Figura 8. Localització del gen PFKFB3 mitjançant l'ús de la tècnica d'hibridació in situ.** Figura extreta de (Novellasdemunt et al., 2013b)

S'han identificat tres proteïnes d'aquests sis mRNAs. Per *splicing* alternatiu de l'exó 16 s'obtenen les dues principals isoformes que difereixen per una regió de la seqüència C-terminal (Navarro-Sabaté et al., 2001). Aquestes són la isoforma ubíqua (uPFK-2, PFKFB3) (Hamilton et al., 1997) que conté 15 exons i la isoforma induïble que conté 16 exons (iPFK-2, iPFKFB3) (Chesney et al., 1999a). També s'ha identificat la isoforma RB2K3 (k3-PFKFB3) que conté 17 exons i es diferencia de les anteriors per l'existència d'un exó extra (Chesney et al., 1999a; Duran et al., 2008a; Manzano et al., 1998). Així doncs, les proteïnes iPFKFB3 i PFKFB3 tenen el mateix pes molecular (59 KDa) mentre que la proteïna RB2K3 és una mica més gran a causa de l'exó extra.



**Figura 9. Estructura de l'extrem proper al 3' terminal del gen PFKFB3.** Esquema on es mostren els transcrits per *splicing* alternatiu i la seqüència proteica. Les seqüències de les isoformes UBI2K4 i UBI2K5 corresponen a la iPFKFB3 i PFKFB3 ubiqua, respectivament. Figura extreta de (Novellasdemunt et al., 2013b).

### 3.3.4 El gen PFKFB4

El gen PFKFB4 codifica per l'isoenzim originalment identificat a testicle (tPFK-2, PFKFB4) (Gómez et al., 2005; Manzano et al., 1999; Sakata et al., 1991). Aquest isoenzim consisteix en 469 aminoàcids amb un pes molecular de 55 KDa i presenta una elevada homologia amb el producte del gen PFKFB1. Aquest gen es localitza al braç curt del cromosoma 3 humà, a la posició 3p21.31 i conté al voltant de 44 kb amb 19 exons. S'han identificat diferents mRNAs no només en testicle sinó que també en diferents teixits de rata (Minchenko et al., 2008). Aquests transcrits presenten deleccions o insercions en la regió FBPassa-2 de manera que es diferencien en la longitud i la seqüència d'aminoàcids de l'extrem C-terminal. En canvi, el domini catalític de PFK-2 és idèntic en totes les variants. PFKFB4 s'expressa en testicle i en moments específics de la maduració de l'esperma (Gómez et al., 2009; Manzano et al., 1999). S'ha descrit que la secreció paracrina de FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) per les cèl·lules de Sertoli podria modular l'expressió

---

dels isoenzims PFKFB durant l'espermatogènesi (Gómez et al., 2012). Malgrat que l'expressió de l'isoenzim PFKFB4 és bastant específica de testicle, l'expressió del gen PFKFB4 també s'indueix en línies cel·lulars de càncer de mama, colon, pulmó, pàncrees i càncer gàstric (Bobarykina et al., 2006; Minchenko et al., 2004, 2005a, 2005b, 2005c). PFKFB4 s'indueix per hipòxia a través de l'element de resposta a hipòxia (HRE) present en el promotor del gen PFKFB4 (Minchenko et al., 2004). A més, s'ha descrit que PFKFB4 es troba sobreexpressat en astrocitoma (Goidts et al., 2012).

### 3.4 Expressió i regulació de PFKFB3

PFKFB3 s'expressa de forma ubiqua i és la isoforma més abundant a les cèl·lules proliferants i canceroses. Bando i col·laboradors van analitzar l'expressió de les diferents variants d'*splicing* del gen PFKFB3 en diferents línies cel·lulars de tumors humans: HepG2, HCT15, MCF7, U937 i Jurkat. De totes les isoformes de PFKFB3, només dues d'elles es van trobar en les línies estudiades que corresponien a la PFKFB3 ubiqua i la UBI2K6 (Bando et al., 2005). Els mateixos autors van analitzar l'expressió dels transcrits del gen PFKFB3 en mostres de carcinoma de còlon humà i van observar que l'expressió de la isoforma PFKFB3 ubiqua era significativament major en les mostres de càncer de còlon respecte els controls (Bando et al., 2005). Mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*, altres autors han detectat també una major expressió del mRNA del gen PFKFB3 en tumors humans i, molt especialment, en les cèl·lules neoplàsiques de càncer de pròstata, de mama, d'ovari i de tiroïdes (Atsumi et al., 2002).

El grup de Hamilton i col·laboradors va demostrar la presència del mRNA del gen PFKFB3 en diferents línies cel·lulars de càncer de mama, on observaren que aquest gen s'indueix ràpidament amb l'ús d'anàlegs de progesterona, fet que va suggerir que PFKFB3 podria estar involucrat en la progressió del càncer de mama (Hamilton et al., 1997). Tant el mRNA del gen PFKFB3 com el producte d'aquest s'han trobat sobreexpressats en diferents línies cel·lulars de leucèmia i adenocarcinoma comparat amb les cèl·lules normals (Atsumi et al., 2002; Chesney et al., 1999a). En aquest sentit, diversos estudis realitzats al nostre laboratori han mostrat la presència del mRNA de PFKFB3 en diferents línies tumorals com



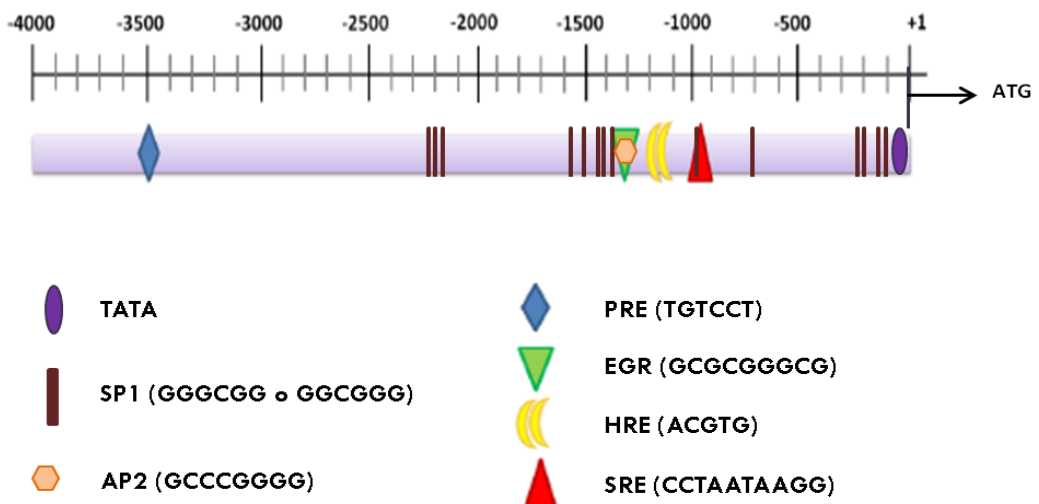
cèl·lules HeLa (càncer de cèrvix), HT29 (adenocarcinoma de còlon), T98G (glioblastoma multiforme), MCF7 i T47D (càncer de mama) (Calvo et al., 2006; Navarro-Sabaté et al., 2001; Novellasdemunt et al., 2012; Obach et al., 2004; Riera et al., 2002). Per tant, la importància del gen PFKFB3 sobre la via glicolítica en models de cèl·lules transformades ha fet que nombrosos grups hagin invertit esforços en l'estudi de la regulació d'aquest gen i de la proteïna que codifica.

L'any 2000, Fukasawa i col·laboradors van aïllar i caracteritzar el DNA genòmic corresponent al gen PFKFB3, incloent la seva regió promotora. Aquest grup va localitzar el lloc d'inici de la transcripció a la posició 329 respecte el codó d'inici de la traducció. Aproximadament el 75% d'aquesta seqüència conté bases guanina (G) i citosina (C), per tant aquesta regió és molt rica en G i C. Les zones 5'UTR (*Untranslated Regions*) són riques en G i C i es localitzen en mRNAs que codifiquen per factors de creixement, receptors de membrana i també alguns proto-oncogens (Fukasawa et al., 2000). En el promotor del gen PFKFB3, la caixa TATA es localitza entre les posicions -23 i -32, prenent com a referència la posició +1 d'inici de la transcripció (Fukasawa et al., 2000; Navarro-Sabaté et al., 2001). Al voltant de la caixa TATA, s'han identificat quatre regions que es corresponen amb la seqüència consens d'unió al factor de transcripció SP1 (*Specific Protein 1*) que es troben a les posicions -191, -287, -98 i -83, però també en altres regions del promotor de PFKFB3. SP1 pot activar la transcripció funcionant com un element basal de promotor o com un activador de la transcripció, dependent del context del promotor (Fry and Farnham, 1999). També s'han localitzat varies regions d'unió a AP2 (*Activator protein 2*) i diverses *E-boxes* (Navarro-Sabaté et al., 2001). La proteïna AP2 participa en l'activació transcripcional com a resposta a dues vies de transducció de senyals: una implica a la proteïna quinasa activada per diacilglicerol C i els èsters de forbol i l'altra involucra la PKA (Imagawa et al., 1987). Les *E-boxes* habitualment són importants en gens que no tenen caixa TATA, però el gen PFKFB3 sí que en té, així que podria ser un element de resposta a factors de transcripció per ell mateix o bé cooperant amb el factor SP1.

A més a més, el promotor del gen PFKFB3 conté varies seqüències consens per la unió de HIF-1, anomenades HRE (*Hypoxia Response Element*) i localitzades als nucleòtids -1279 i -1288 respecte l'inici de transcripció. Com ja s'ha comentat anteriorment, una part dels tumors es caracteritzen per estar sotmesos a condicions d'hipòxia mentre estan creixent

(Dang and Semenza, 1999). S'ha demostrat que el gen PFKFB3 s'indueix en resposta a hipòxia per unió de HIF-1 $\alpha$  en aquestes HRE en cèl·lules de glioblastoma (T98G) (Obach et al., 2004), però també en altres línies tumorals de pàncrees, de leucèmia mieloide aguda i de tumors gàstrics (Bobarykina et al., 2006; Feng and Wu, 2017; Fukasawa et al., 2004) i a diferents òrgans d'un animal sotmès a hipòxia (Minchenko et al., 2003).

El nostre grup també ha descrit la presència d'un element de resposta a progestàgens (PRE) i d'un element de resposta a sèrum (SRE) al voltant de la posició -3490 i -938 relatiu a l'inici de la transcripció, respectivament (Novellasdemunt et al., 2012, 2013c). També s'ha descrit que PFKFB3 és un gen de resposta primerenca a estradiol a través de la unió de ER (*Estrogen Receptor*) a l'element de resposta ERE (*ER Response Element*) present en el promotor de PFKFB3 en cèl·lules de càncer de mama (Imbert-Fernandez et al., 2014). Aquestes regions (**Figura 10**), juntament amb altres seqüències consens localitzades al promotor del gen PFKFB3, podrien contribuir a la regulació de l'expressió d'aquest gen en diferents cèl·lules o teixits.



**Figura 10. Esquema dels elements reguladors del promotor humà de PFKFB3.** Fragment del promotor humà de PFKFB3 on s'indica la posició dels diferents elements reguladors descrits.

També s'ha descrit que l'expressió del gen PFKFB3 també es pot induir per insulina (Riera et al., 2002), per molècules pro-inflamatòries, com la interleuquina IL-6 (Ando et al., 2010; Chesney et al., 1999b), LPS (*Lipopolysaccharide*) i adenosina (Ruiz-Garcia et al., 2011).

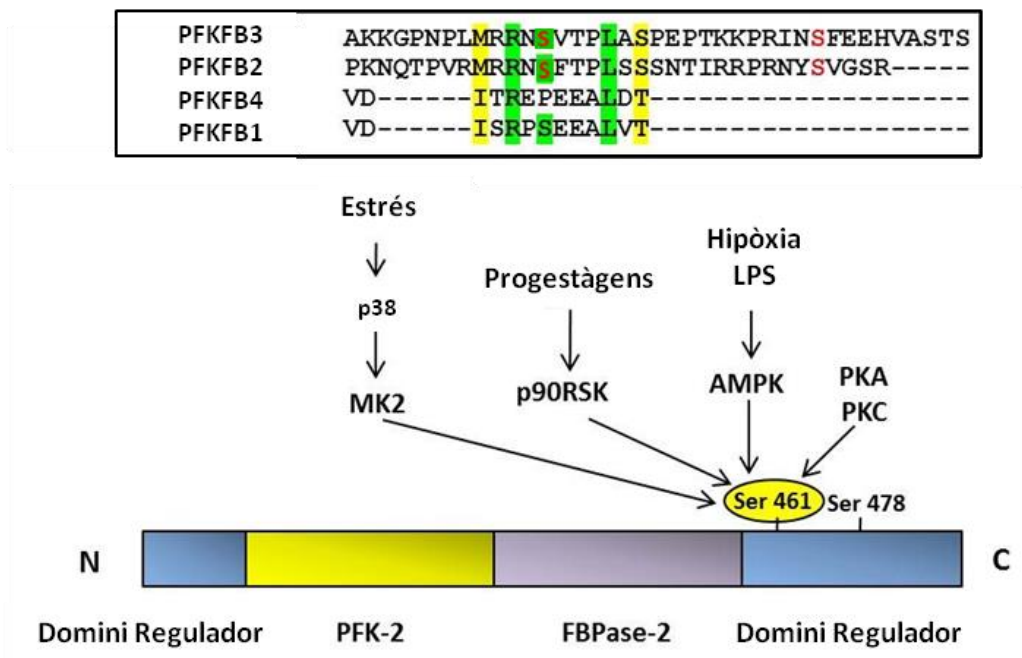
L'anàlisi de l'expressió de la proteïna PFKFB3 en sistemes no tumorals, com per exemple en diferents teixits de rata, s'ha observat que aquesta es troba principalment en els teixits que presenten una major proliferació cel·lular, com el testicle, el timus i la melsa, així com també el cor i el fetge. A més a més, en individus joves, l'expressió de PFKFB3 és més generalitzada en tots els teixits ja que conserven certa capacitat de proliferació per poder assolir la maduresa (Duran et al., 2008b; Goren et al., 2000).

PFKFB3 també s'expressa en adipòcits. S'ha descrit que el tractament prolongat amb insulina en adipòcits 3T3-L1 dóna lloc a una disminució del mRNA de PFKFB3 i que els dipòsits lipídics epididimals de ratolins *db/db* tenen una expressió reduïda de PFKFB3 (Atsumi et al., 2005). De fet, PFKFB3 juga un paper en l'adipositat tal i com es va veure en ratolins *Pfkfb3*<sup>+/-</sup> sotmesos a una dieta rica en greixos, ja que aquests animals van guanyar menys pes corporal respecte els seus germans de manada salvatges. Però malgrat això, PFKFB3 protegeix enfront de la resistència a insulina induïda per la dieta i de la resposta inflamatòria del teixit adipós (Huo et al., 2010).

En quant a la regulació del producte del gen PFKFB3 també s'han descrit diferents mecanismes. L'isoenzim PFKFB3 s'ha trobat que està majoritàriament fosforilat en cèl·lules tumorals (Bando et al., 2005). S'ha descrit que les isoformes ubiqua i induïble de l'isoenzim PFKFB3 contenen el residu Ser461 en el domini regulador de l'extrem C-terminal, el qual és fosforilat per diferents quinases com AMPK, PKC i PKA, activant l'activitat PFK-2 de l'isoenzim PFKFB3 (Bando et al., 2005; Marsin et al., 2002; Okamura and Sakakibara, 1998)

El nostre grup ha demostrat que PFKFB3 es regula en resposta a progestàgens en les cèl·lules T47D, i en resposta a estressos cel·lulars ambientals, ja sigui pel tractament amb anisomicina o NaCl, en les cèl·lules Hela i T98G, donant lloc un augment ràpid de la

concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de la glicòlisi. Aquests efectes són produïts per la fosforilació de l'isoenzim PFKFB3 a la seva Ser461 per la via de Erk (*Extracellular signal-Regulated Kinase*)/RSK (*Ribosomal S6 Kinase*) i per la via de p38/MK2 (*MAPK-activated protein Kinase-2*) MAPK, respectivament, produint un augment de la seva V<sub>max</sub> (Novellademunt et al., 2012, 2013c). La fosforilació de PFKFB3 augmenta la V<sub>max</sub> de l'activitat quinasa i una disminució de la K<sub>m</sub> per la Fru-6-P (Marsin et al., 2002; Novellademunt et al., 2012) (**Figura 11**).



**Figura 11. Cascades de senyalització que fosforilen a l'isoenzim PFKFB3 a la Ser 461.** Els residus assenyalats corresponen a la Ser461 i a la Ser678 de l'isoenzim PFKFB3, els quals són equivalents a la Ser 466 i la Ser 483 de l'isoenzim PFKFB2. Els colors representen els residus de fosforilació (vermell), els residus plenament conservats en totes o en tres de les isoformes com a mínim (verd), els residus similars (groc) i els residus diferents (negre). Figura adaptada de (Novellademunt et al., 2013b).

S'ha descrit que en astròcits la cadena respiratòria es troba inhibida a nivell de la citocrom oxidasa per l'òxid nítric (NO) i s'activa AMPK que fosforila i activa a PFKFB3, estimulant la glicòlisi i augmentant la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (Almeida et al., 2004). També, l'activació de l'AMPK per hipòxia produeix la fosforilació de l'isoenzim PFKFB3 augmentant la V<sub>max</sub> i disminuint la K<sub>m</sub> i, conseqüentment, s'augmenta la concentració de

Fru-2,6-P<sub>2</sub> i el flux glicolític (Rider et al., 2004). L'activació de l'AMPK en microambients hipòxics o isquèmics pot ser crítica per la supervivència cel·lular i, per tant, seria un mecanisme de protecció per a les cèl·lules amb necessitats metabòliques o amb deficiència d'ATP. Recentment, s'ha descrit que la fosforilació de PFKFB3 per AMPK contribueix a l'estimulació de la glicòlisi durant la mitosi, augmentant la supervivència de les cèl·lules en aquestes condicions (Doménech et al., 2015).

L'activació de la via Shh (*Sonic hedgehog*), la qual s'ha vist que és important en la progressió tumoral, estimula la utilització de glucosa i la producció de lactat com a conseqüència de la fosforilació de la Ser461 de PFKFB3 i l'augment de la síntesi de Fru-2,6-P<sub>2</sub> a través de Smo (*Smoothed*) i p38/MK2 en cèl·lules de càncer de mama MCF7 i MDA-MB-231 (Ge et al., 2015).

La regulació de PFKFB3 no només es porta a terme a través de mecanismes de fosforilació i regulació de la transcripció, sinó que l'activitat de PFKFB3 també es regula per l'estabilitat de la proteïna. El nostre grup ha publicat que, durant la diferenciació muscular, en les cèl·lules C2C12 (fibroblasts de ratolí) disminueix l'expressió de la proteïna PFKFB3 i del seu mRNA, així com també hi ha una reducció dels nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Aquesta disminució de PFKFB3 durant la diferenciació miogènica és deguda a la degradació de la proteïna pel sistema ubiquitina-proteasoma. Aquest procés de degradació de proteïnes requereix de dos passos successius: la conjugació de múltiples molècules d'ubiquitina a la proteïna i la degradació d'aquesta pel proteasoma 26S (Riera et al., 2003). PFKFB3, a diferència dels altres isoenzims, conté una caixa KEN que es reconeguda per APC/C-cdh1 (*anaphase-promoting complex/cyclosome*), el qual és un complex E3 ubiquitina lligasa que té un paper important en la fase G1 i la mitosi a través de la degradació de diferents proteïnes del cicle cel·lular. Per tant, la inactivació d'aquest complex és necessària per la transició de G1 a S. En neurones, durant la fase G1, la PFKFB3 és degradada per l'enzim E3 ubiquitina lligasa APC/C-Cdh1 al nucli i, per tant, l'increment de la via glicolítica es dona quan s'inhibeix la degradació, permetent que PFKFB3 transloqui al citoplasma (Almeida et al., 2010). Colombo i col·laboradors han demostrat que, en cèl·lules Hela, els nivells de PFKFB3, i per tant, el flux de la via

---

glicolítica, són elevats durant la fase G1 mitja i tardana, mentre que disminueixen a la fase S (Colombo et al., 2011). PFKFB3 també conté un motiu DSG que és reconegut pel complex ubiquitina lligasa SCF- $\beta$ TrCP durant la fase S1, donant lloc a la degradació de PFKFB3 (Colombo et al., 2011). En conjunt, aquest estudi demostra que PFKFB3 és important per a la progressió del cicle cel·lular, ja que la seva silenciament no només evita l'augment de la glicòlisi sinó que també la transició de la fase G1 a la fase S. Un estudi posterior descriu el possible mecanisme de regulació de la degradació de PFKFB3 induïda per la privació de nutrients. Els autors suggereixen que MAPK14 podria controlar els nivells de PFKFB3 a través de la fosforilació del residu Ser273 que es troba al motiu DSG (Desideri et al., 2014), ja que aquest residu s'ha vist que és necessari per al reconeixement de PFKFB3 per SCF- $\beta$ TrCP (Tudzarova et al., 2011). Aquest grup proposa un model en el qual, en condicions de privació de nutrients, s'activa l'autofàgia i la fosforilació de MAPK14, la qual induïx l'expressió del transportador de glucosa GLUT3 (SLC2A3), a través de l'estabilització de HIF-1 $\alpha$ , augmentant la captació de glucosa. A més a més, MAPK14 induïx la degradació de PFKFB3 que dóna lloc a la disminució de la via glicolítica, derivant la glucosa cap a la via de les pentoses fosfat que proporciona NADPH i per tant redueix els nivells de ROS i l'activació de l'autofàgia (Desideri et al., 2014).

Diferents estudis demostra que PTEN també pot regular l'estabilitat de la proteïna de PFKFB3. Per exemple, l'expressió elevada de PTEN afecta de forma negativa a la glicòlisi, ja que estimula l'activitat de APC/C-Cdh1 que dóna lloc a la disminució de la proteïna PFKFB3 (Garcia-Cao et al., 2012). Un altre estudi demostra que cèl·lules deficientes de PTEN tenen alterada la degradació depenent de APC/C-Cdh1 i presenten elevades concentracions de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, a causa de l'estabilització de la proteïna de PFKFB3 que dóna lloc a un augment del flux glicolític i la proliferació cel·lular (Cordero-Espinoza and Hagen, 2013). PTEN és un dels gens supressors de tumors que freqüentment es troba mutat en càncer (Li et al., 1997), és per això PFKFB3 es pot considerar una important diana terapèutica en cèl·lules canceroses que presenten deficiència de l'activitat de PTEN.

Resultats obtinguts de Yalcin i col·laboradors, juntament amb els d'Almeida i col·laboradors, demostra la localització nuclear de PFKFB3 i, a més, que aquest isoenzim

regula la proliferació a través de quinases depenent de ciclines. Demostren que la síntesi de Fru-2,6-P<sub>2</sub> per PFKFB3 al nucli activa a la Cdk1, la qual fosforila a p27 a la Thr187, donant lloc a la disminució d'aquesta i, per tant, a l'acceleració de la progressió del cicle cel·lular a la fase G1/S i a la protecció en front l'apoptosi. També s'ha descrit que en cèl·lules de leucèmia mieloide aguda, que presenten la via de mTOR activa, té lloc un augment de l'expressió del gen i proteïna de PFKFB3 donant lloc a un increment de la glicòlisi i de la proliferació cel·lular. En canvi, la silenciació de PFKFB3 augmenta el mRNA de p21 i p27 i disminueix el de la ciclina B1 i D1, activant l'apoptosi (Feng and Wu, 2017). Així doncs, s'obre una nova via en l'estudi de la regulació de la proliferació cel·lular per PFKFB3, ja que no només regula el metabolisme de la glucosa, sinó que també pot actuar com a regulador directe del cicle cel·lular (Yalcin et al., 2009, 2014).

El paper que juga PFKFB3 en les cèl·lules tumorals també s'ha descrit en diferents treballs. Per exemple, mitjançant l'ús de siRNAs pel mRNA de PFKFB3 s'observà una disminució de la viabilitat cel·lular, un retard en la progressió del cicle cel·lular, una inhibició de la capacitat de creixement per ancoratge (és a dir, la pèrdua de la capacitat de formar focus en un cultiu semisòlid) i una disminució del creixement tumoral (Calvo et al., 2006; Feng and Wu, 2017; Yalcin et al., 2014) com també una inhibició en la formació de vasos sanguinis (De Bock et al., 2013). Resultats similars s'han obtingut amb l'ús d'un inhibidor específic de PFK-2, el N-bromoacetiletanolamina fosfat i els seus anàlegs (Hirata et al., 2000). L'inhibidor de PFKFB3 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO) s'ha vist que disminueix la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i la glicòlisi en cèl·lules transformades i inhibeix el creixement de certs tumors *in vivo* (Clem et al., 2008, 2013; O'Neal et al., 2016) com també la migració en cèl·lules de càncer de mama (Trenti et al., 2017). En conjunt, aquests resultats donen suport al fet de que el gen PFKFB3 juga un paper molt important en la inducció de la glicòlisi en sistemes proliferants i tumorals.

---

## 4. Metabolisme i vies de transducció de senyals

Les vies de senyalització intracel·lulars controlen diferents processos cel·lulars com la divisió i proliferació cel·lular, metabolisme, senescència, apoptosi i diferenciació (Arthur and Ley, 2013). Existeixen un gran nombre de vies de senyalització intracel·lular i, generalment, consisteixen en una cadena de proteïnes que interactuen una amb l'altra en una seqüència establerta evolutivament.

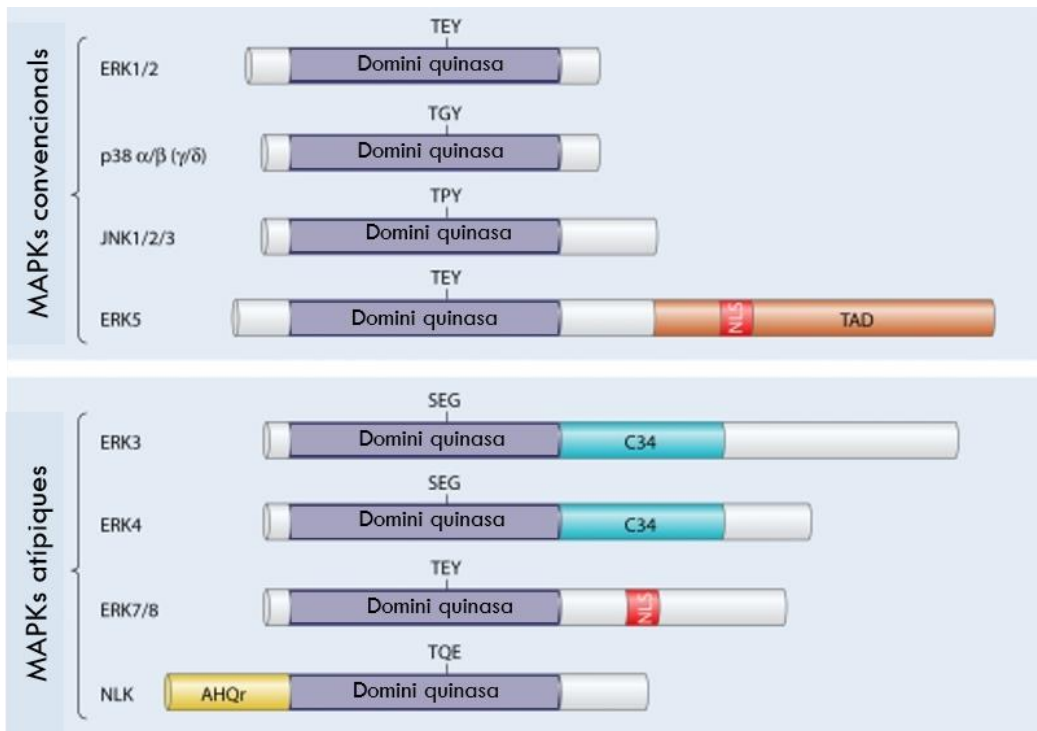
### 4.1 Les vies de MAPKs convencionals

Entre les diferents cascades de senyalització cel·lular, la via més estudiada és la de MAPKs. Les MAPKs són proteïnes Ser/Thr quinases que converteixen estímuls extracel·lulars en una àmplia varietat de respostes cel·lulars. Alteracions en aquestes vies pot originar diferents malalties com el càncer (Kim and Choi, 2010). Les MAPKs s'expressen de forma ubíqua, es troben conservades evolutivament en eucariotes (Kyriakis and Avruch, 2012; Peti and Page, 2013) i es consideren les vies de transducció de senyal més antigues (Widmann et al., 1999). En mamífers s'han descrit 14 MAPKs que s'han caracteritzat en 7 grups. Aquests grups estan dividits en MAPKs convencionals i atípiques. Les MAPKs convencionals són les quinases regulades per senyals extracel·lulars 1/2 (ERK1/2), quinases c-Jun amino N-terminal 1/2/3 (JNK 1/2/3), la quinasa p38 (que inclou les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ) i ERK5. Les MAPKs atípiques, les funcions i regulació de les quals encara no es coneix del tot, són ERK 3/4, ERK 7 i les NLK (*Nemo-like* quinases). Actualment, els grups de MAPKs més estudiats són ERK1/2, JNK i p38. Cadascuna d'aquestes vies respon a diferents factors de creixement, de diferenciació i senyals extracel·lulars d'estrès i citoquines inflammatòries (Arthur and Ley, 2013).

Les vies de MAPKs convencionals estan constituïdes per no menys de tres quinases que es fosforilen i s'activen seqüencialment, determinant tres nivells de cascada. El nivell superior està format per una MAPKKK (MAPK quinasa quinasa) que normalment s'activa en els complexos de receptors de membrana plasmàtica i fosforila i activa a la MAPKK (MAPK quinasa) del nivell intermedi, que, al seu torn, fosforila i activa a la MAPK que constitueix

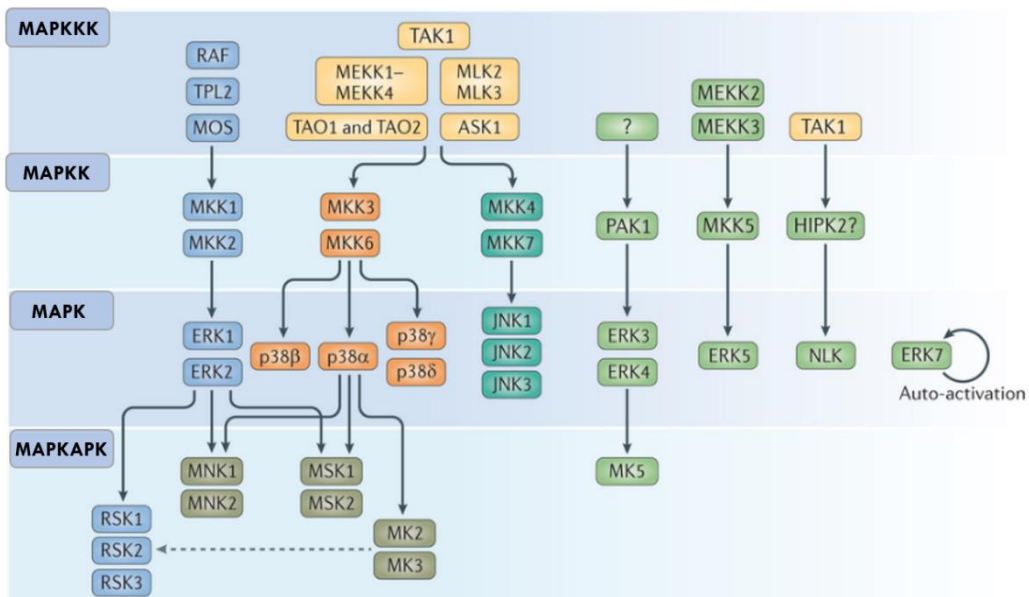


el nivell inferior. L'activació de les MAPKs es dona per fosforilació dual en residus de Thr i Tyr en una seqüència conservada corresponent a Thr-X-Tyr localitzada al *loop* d'activació del domini quinasa, la fosforilació dels quals és essencial per l'activitat enzimàtica d'aquestes proteïnes (Robbins et al., 1993) (**Figura 12**).



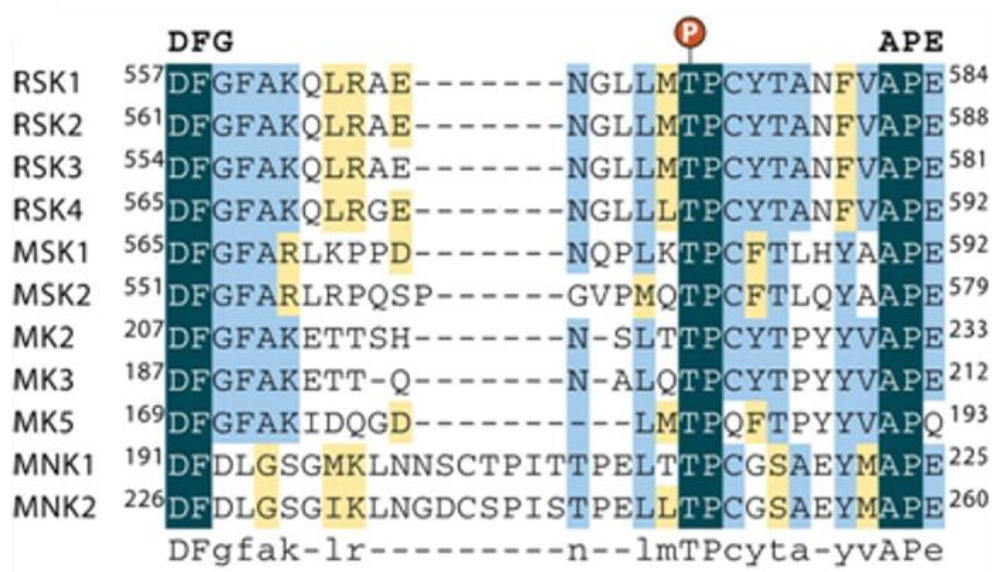
**Figura 12. Representació esquemàtica de l'estructura de les MAPKs convencionals i atípiques.** Les MAPKs contenen un domini Ser/Thr quinasa entre les regions N- i C-terminal. Algunes MAPKs també presenten altres dominis addicionals, com el domini de transactivació (TAD), una seqüència de localització nuclear (NLS), una regió conservada en ERK3/4 (C34) i un domini ric en Ala, His i Glu (AHQr). Les isoformes de p38 es troben entre parèntesi per a indicar que no s'ha descrit que activin a MAPKAPK. Figura adaptada de(Cargnello and Roux, 2011).

Les MAPK, un cop activades, fosforilen a proteïnes efectores finals com factors de transcripció, transportadors de membranes, elements del citoesquelet i a altres proteïnes quinases anomenades MAPKAPK (*MAPK-activated protein kinase*) (**Figura 13**) (Arthur and Ley, 2013; Cargnello and Roux, 2011; Morrison, 2012).



**Figura 13. Representació esquemàtica on es mostren les cascades de senyalització de MAPKs.** Les fletxes amb línia discontinua indiquen que la regulació del substrat per la quinasa corresponent encara que s'ha descrit, falta confirmar-ho. Figura adaptada de (Arthur and Ley, 2013).

La família de les MAPKAPKs està formada per 11 membres, els quals s'activen en resposta a diferents estímuls depenent de la quinasa que els fosforila. Tots aquests tenen una seqüència similar al seu *loop* d'activació on el fosfoacceptor es troba seguit d'una prolina (Pro, P) (**Figura 14**). Aquestes seqüències seran fosforilades per les seves respectives MAPKs. Segons l'homologia de les seves seqüències i particularment les del segment d'activació, les MAPKAPKs es classifiquen en cinc grups: RSKs (*p90 ribosomal S6 kinase*), MSKs (*mitogen- and stress-activated kinase*), MNKs (*MAPK-interacting kinases*), MK2/3 (*MAPK-activated protein kinase 2/3*) i MK5. Aquestes proteïnes regulen de manera directa l'expressió gènica al nucli, o bé altres proteïnes nuclears o citoplasmàtiques implicades en múltiples processos cel·lulars.



**Figura 14.** Seqüències del loop d'activació de les diferents MAPKs. Alineament de les seqüències del voltant del segment d'activació de les MAPKs. Figura extreta de (Cargnello and Roux, 2011).

Les MAPKs interaccionen amb la MAPK corresponent a través del seu domini D (*Docking*) o KIM (*Kinase Interaction Motif*). Aquest domini es troba a l'extrem C-terminal de la proteïna i consta d'una seqüència consens de 13-16 aminoàcids: (R/K)<sub>2-3</sub>-X<sub>2-6</sub>-Θ<sub>A</sub>-X-Θ<sub>B</sub> (on Θ és un residu hidrofòbic) (Peti and Page, 2013).

A part de la importància de l'activació de la via de MAPKs, també és necessària una regulació molt precisa de la duració i intensitat de la resposta generada per aquesta activació. Una de les formes de regular-ho és a través de la desfosforilació i inactivació de les MAPKs per proteïnes fosfatases. Aquestes fosfatases juguen un paper important en la regulació negativa de la senyalització d'aquestes vies de transducció de senyals. Entre les fosfatases que desfosforilen les MAPKs trobem les PPs (*Protein Phosphatases*), que són fosfatases de serina/treonina, les KIM-PTPs (*Kinase Interaction Motif Protein Tyrosin Phosphatases*), fosfatases de tirosina amb domini d'interacció quinasa, les DUSPs (*Dual Specificity protein Phosphatases*), d'especificitat dual (Peti and Page, 2013).

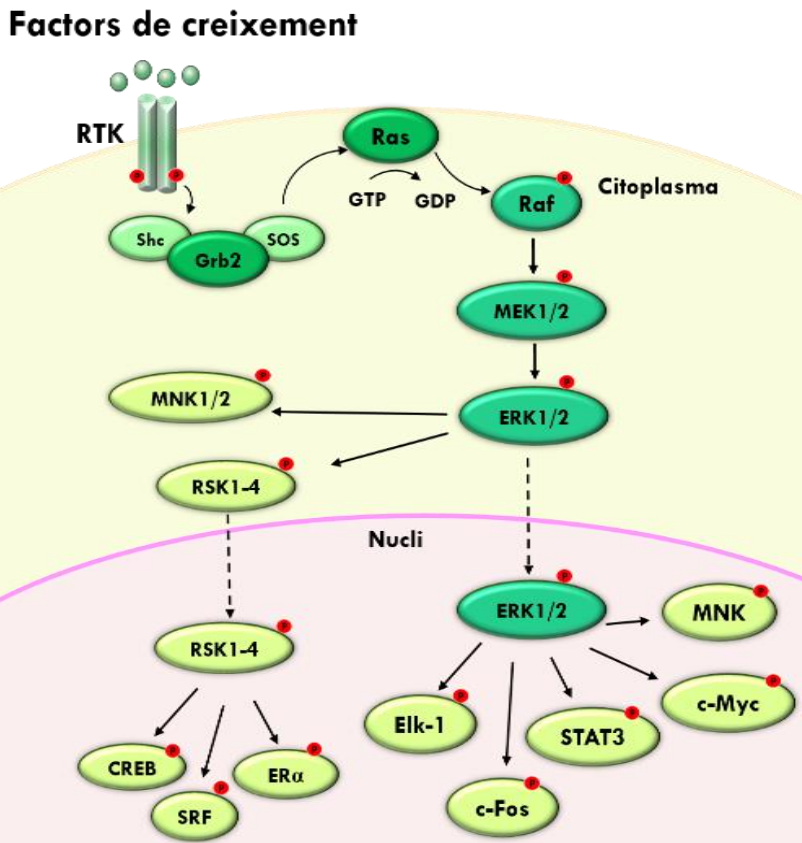
---

#### 4.1.1 La via d'ERK1/2 MAPK

ERK1 fou la primera MAPK de mamífer que es va clonar i caracteritzar. ERK1 i ERK2 s'activen en resposta a factors de creixement, com el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), l'EGF i el factor de creixement nerviós (NGF) i també en resposta a insulina (Boulton et al., 1990). També es poden activar per lligands de la proteïna G heterotrimèrica unida a receptors (GPCRs), citoquines, estrès osmòtic i desorganització de microtúbuls (Raman et al., 2007). La via d'ERK1/2 MAPK regula la proliferació, la diferenciació i la supervivència cel·lular.

La cascada d'activació de ERK1/2 consisteix en les MAPKKKs A-Raf, B-Raf i Raf-1, les MAPKKs MEK1 i MEK2, i les MAPKs ERK1 i ERK2. Encara que les isoformes de Raf són principalment les MAPKKK d'aquesta via, les proteïnes quinases MEKK1, Mos i Tpl2, són MAPKKKs addicionals presents en tipus cel·lulars concrets i en resposta a estímuls específics (Raman et al., 2007). L'activació clàssica de ERK1/2 s'inicia principalment per la unió del lligand al receptor tirosina quinasa (RTK) a la membrana plasmàtica. La unió del lligand indueix la dimerització del receptor i promou l'activació i autofosforilació d'aquest en residus de tirosina (Tyr) del domini intracel·lular. Aquests residus fosforilats serveixen com llocs d'unió específics de proteïnes adaptadores que contenen dominis d'homologia Src 2 (SH2) i d'unió a fosfotirosines (PTB). Una de les proteïnes adaptadores d'aquesta via és Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) que té un domini central SH2 i dos dominis d'homologia Src 3 (SH3). Aquests dominis permeten que Grb2 s'uneixi a les fosfotirosines dels receptors de forma directa o a través d'una altra proteïna adaptadora SH2, Shc (*Src homology 2 domain containing transforming protein*) i a la regió rica en prolins del factor bescanviador de GTP (GEF) SOS (*Son of Sevenless*). El reclutament de Grb2 a la membrana plasmàtica porta a SOS a prop de Ras, que és una GTPase petita, i estimula el bescanvi de GDP per GTP de la proteïna Ras. Aquest bescanvi de nucleòtids activa a Ras i permet la interacció d'aquesta GTPasa amb proteïnes efectores com la serina/treonina quinasa Raf (MAPKKK) (Geyer and Wittinghofer, 1997). El domini efector de Ras s'uneix a Raf a través del domini RBD (*Ras-binding domain*) i el domini CRD (*cysteine-rich domain*). Un cop activada, Raf fosforila i activa les proteïnes MEK 1/2 (MAPKK) que al seu torn activen a ERK1/2 mitjançant la fosforilació del motiu treonina-glutamina-tirosina (TEY) localitzat al seu *loop* d'activació (Karnoub and Weinberg, 2008).

Un cop activat, ERK1/2 fosforila a diversos substrats (Yoon and Seger, 2006) que poden ser citoplasmàtics com RSK, TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*), DAPK (*Death-Associated Protein Kinase*) i MNK i nuclears com NF-AT, Elk-1, MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*), c-Fos, c-Myc i STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). A més, alguns substrats d'ERK estan associats a membranes (CD120a, Syk i calnexina) o al citoesquelet (**Figura 15**).



**Figura 15. Representació esquemàtica de la via de ERK MAPK.** Després de la unió del lligand al receptor RTK, aquest s'autofosforila en els residus de tirosina i permet el reclutament de proteïnes adaptadores com Grb2. Aquesta recluta a SOS que indueix el canvi de Ras, de la forma inactiva unida a GDP a la forma activa unida a GTP. Ras activa a Raf que fosforila i activa a MEK1/2, la qual fosforila i activa a ERK1/2. Un cop activat ERK1/2 pot fosforilar a diferents substrats citosòlics i també pot entrar al nucli per a regular l'expressió gènica per fosforilació de diferents factors de transcripció. A la figura es mostren els components més representatius de la via de ERK MAPK.

---

En cèl·lules quiescents, els components de la via d'ERK1/2 es troben al citoplasma, en canvi, després de l'estimulació, una part important d'ERK1/2 s'acumula al nucli (Chen et al., 1992; Lenormand et al., 1993). La via de senyalització d'ERK1/2 té un paper molt important en el control de la proliferació cel·lular. Una desregulació en la via de Ras-Raf pot donar lloc a diversos desordres i malalties com alguns tipus de càncers (Roux and Blenis, 2004).

En càncer, els components de la via d'ERK1/2 freqüentment es troben mutats, aproximadament el 30% dels tumors humans expressen una forma mutada de Ras constitutivament activa de forma constitutiva (Roberts and Der, 2007) i aproximadament un 8% expressen una forma activa de B-Raf (Cantwell-Dorris et al., 2011). Això fa que es desenvolupin molècules inhibidores dels components de la via d'ERK per a utilitzar-les com agents anticancerígens.

Els inhibidors clàssics de la via d'Erk1/2 són PD98059 (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995) i U0126 (Favata et al., 1998). Aquests són inhibidors de MEK1/2 i no són competitiu respecte l'ATP sinó que interaccionarien amb la quinasa no fosforilada i inactiva més fortament que amb les que estan activades. Aquesta interacció es pensa que evita la fosforilació i/o la transició conformacional que dona lloc a la forma activa de l'enzim (Alessi et al., 1995). Posteriorment, s'han desenvolupat altres inhibidors de MEK1/2 com PD198306, PD0325901 (Fremin and Meloche, 2010).

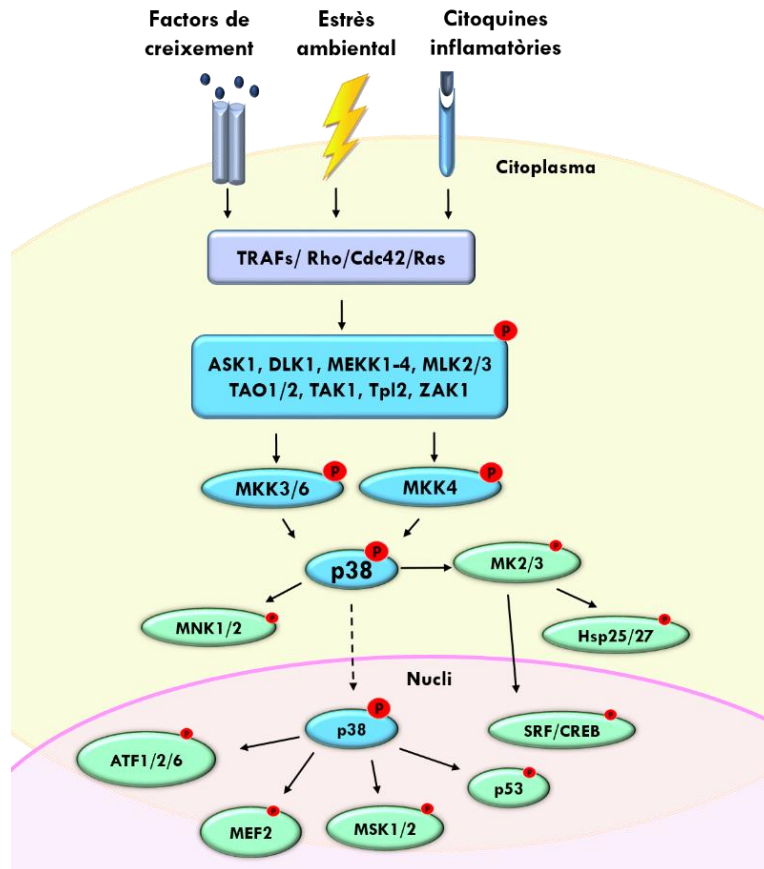
#### **4.1.2 La via de p38 MAPK**

La família de p38 presenta quatre isoformes de 38 kDa, p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  i p38 $\delta$ , les quals presenten un 60% de similitud aproximadament. Mentre que p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  s'expressen de forma ubíqua en les línies cel·lulars i teixits, p38 $\gamma$  i p38 $\delta$  presenten un patró d'expressió més restrictiu i tenen funcions més específiques. Com que p38 $\alpha$  s'expressa de forma més elevada que p38 $\beta$ , la majoria de bibliografia es refereix a aquesta isoforma com p38 MAPK. En cèl·lules de mamífer, les quatre isoformes s'activen per diversos estressos ambientals com l'estrès oxidatiu, la radiació UV, la hipòxia, la isquèmia, i per citoquines inflammatòries com interleuquina-1 (IL-1) i el factor de necrosi

tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) És per aquest motiu que p38 MAPK es va descriure com a proteïna quinasa activada per estrès (SAPK). L'activació de la via de p38 MAPK regula la inflamació, apoptosi, diferenciació i cicle cel·lular (Cuadrado and Nebreda, 2010).

L'activació de les p38 MAPKs es dona per fosforilació dual (a la treonina i la tirosina) en la seqüència del *loop* d'activació Thr-Gly-Tyr (TGY). MKK3 i MKK6 són les dues principals quinases responsables de l'activació de p38, tot i que MKK4, un activador de JNK, també podria fosforilar a p38 $\alpha$  (Cargnello and Roux, 2011). Les MAPKKs s'activen per fosforilació en el *loop* d'activació de dos residus de Ser/Thr. MKK6 pot activar a totes les isoformes de p38 mentre que MKK3 no pot fosforilar a p38 $\beta$  (**Figura 16**). MKK3/6 són activades per un gran nombre de MAPKKK com MEKK1-4 (*MAPK/ERK kinase kinase 1-4*), MLK2/3 (*Mixed-lineage kinase 3*), ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), Tpl2 (*Tumour progression loci 2*), TAK1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase 1*), TAO1/2, DLK1 (*Dual-leucine-zipper-bearing kinase 1*) i ZAK1 (*leucine zipper and sterile- $\alpha$ motif kinase 1*). L'activació d'aquestes MAPKKKs és dona gràcies a el reclutament de GTPases petites de la subfamília de Rho, entre els que trobem Rho, Rac i Cdc42 i proteïnes adaptadores al receptor com TRAFs, (Cuadrado and Nebreda, 2010).

Les isoformes de p38 es troben tant al nucli com al citoplasma de les cèl·lules quiescents (Ben-Levy et al., 1998) i s'acumulen al nucli de les cèl·lules quan aquestes estan sotmeses a determinats estressos (Raingeaud et al., 1995). Després de l'activació de p38, aquesta fosforila a un gran número de substrats, tant citoplasmàtics (MNK1/2, MK2/3, HuR, Bax i Tau) com nuclears (ATF1/2/6, MEF2, Elk1, p53, Ets-1 i MSK1/2), entre d'altres (Cuadrado and Nebreda, 2010).



**Figura 16. Representació esquemàtica de la via de p38 MAPK.** Diferents estímuls activen a p38 MAPK a través d'una cascada de proteïnes quinases, per mitjà de molècules intermediàries que trameten l'estímul a la cascada de quinases. Aquesta cascada consisteix en MAPKKKs que fosforilen a MAPKKs, les quals fosforilen a les diferents isoformes de p38 MAPK. Un cop activada p38 MAPK, aquesta fosforila substrats citoplasmàtics o es transloca al nucli per regular diferents factors de transcripció. A la figura es mostren els components més representatius de la via de p38 MAPK.

La via de p38 MAPK té un paper important en les respostes immunes normals i inflamatòria (revisat a (Cuadrado and Nebreda, 2010)) i també participa en la proliferació cel·lular i supervivència.



La majoria d'estímuls que activen a les p38 MAPKs també estimulen les isoformes de JNK. Per tal d'estudiar les funcions biològiques en les que participa p38 s'ha utilitzat SB203580, una droga anti-inflamatòria, i SB202190. Ambdós compostos inhibeixen les isoformes de p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  competint per la unió de l'ATP (Lee et al., 1994). A més, BIRB0796 és un altre inhibidor de les isoformes de p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  molt potent que inhibeix l'activitat quinasa competint indirectament per la unió de l'ATP (Regan et al., 2002).

### 4.1.3 La via de JNK MAPK

En mamífers s'han descrit tres isoformes de JNK, JNK1-JNK3 (també conegudes com a SAPK $\gamma$ , SAPK $\alpha$  i SAPK $\beta$ , respectivament) les quals estan codificades per tres gens diferents en tres cromosomes diferents. Els gens de JNK donen lloc a com a mínim 10 proteïnes de JNK diferents per *splicing* alternatiu amb un pes molecular de 46-55 KDa (Cargnello and Roux, 2011). Mentre que JNK1 i JNK2 presenten una àmplia distribució tissular, JNK3 es localitza principalment en neurones i, en menor mesura, en cor i testicles (Yarza et al., 2016).

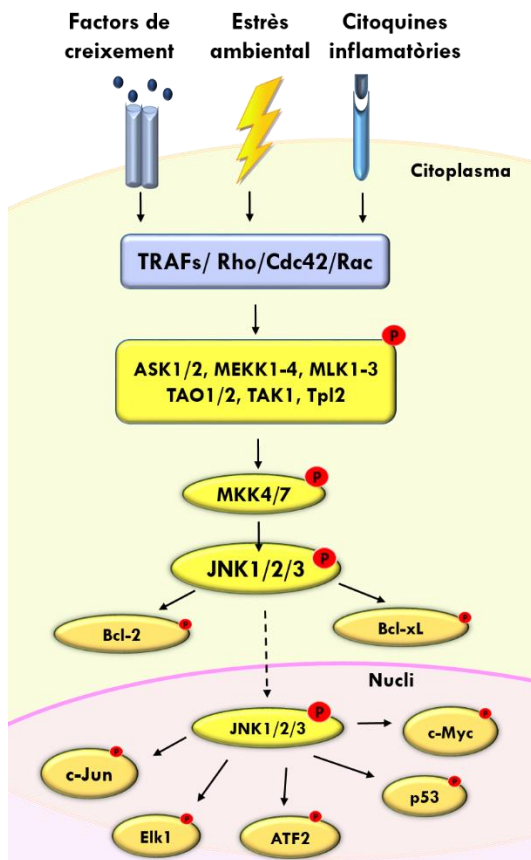
Les isoformes de JNK, similar a les de p38, s'activen en resposta a varis estressos ambientals com xoc tèrmic, estrès oxidatiu, agents que provoquen dany al DNA, radiació UV, privació de factors de creixement, com també en resposta a citoquines pro-inflamatòries com TNF- $\alpha$  i IL-1 i, en menor mesura, per factors de creixement (Bogoyevitch et al., 2010), és per això que juntament amb p38 es coneix com una SAPK. La via de JNK MAPK juga un paper important en apoptosi, inflamació, producció de citoquines i metabolisme (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Huang et al., 2009; Rincón and Davis, 2009).

L'activació de JNK requereix de la fosforilació dual del residu Thr i Tyr del motiu Thr-Pro-Tyr (TPY) del seu domini d'activació. Les MAPKK que les fosforilen són MKK4 (o SEK1) i MKK7 (Lawler et al., 1998). Al seu torn, MKK4 i MKK7 s'activen per diverses MAPKKK com MEKK1-MEKK4, MLK1-MLK3, Tpl2, TAO1/2, TAK1 i ASK1/2 (Kyriakis and Avruch, 2001). L'activació d'aquestes MAPKKKs és dona gràcies a el reclutament de GTPases

petites de la subfamília de Rho, entre les que trobem Rho, Rac i Cdc42 i proteïnes adaptadores al receptor com TRAFs, (Cuadrado and Nebreda, 2010).

MKK4 i MKK7 tenen propietats bioquímiques diferents, per exemple, MKK4 pot fosforilar també a p38 MAPK, en canvi MKK7 fosforila específicament a JNK (**Figura 17**). A més, aquestes dues quinases es regulen selectivament per estímuls extracel·lulars i presenten diferent afinitat per JNK ja que MKK4 i MKK7 preferentment fosforilen a JNK en els residus de Tyr i Thr, respectivament (Wang et al., 2007).

Com en el cas d'ERK1/2 i p38, una part dels substrats activats per JNK relocalitzen del citoplasma al nucli després de l'estimulació (Mizukami et al., 1997). El principal substrat que JNK activa per fosforilació és c-Jun, el qual a la vegada pot interaccionar amb JunB, c-Fos i ATF-2 (*Activating Transcription Factor 2*) constituint el complex AP-1. Per tant JNK juga un paper important en el control del cicle cel·lular ja que promou la formació de complexos AP-1, activant la transcripció dels gens que contenen llocs d'unió per AP-1, alguns dels quals són gens que controlen el cicle cel·lular com ciclina D1 (Sabapathy et al., 2004). JNK també activa a altres factors de transcripció com, p53, Elk-1, STAT3 i c-Myc, entre d'altres (Bogoyevitch et al., 2010; Raman et al., 2007) i proteïnes pro-apoptòtiques com BIM i BCL-2 donant lloc a l'activació de caspases. JNK també fosforila Bcl-2, Bcl-xL i DP5-HRK que són proteïnes anti-apoptòtiques que s'inhibeixen per fosforilació a través de JNK (Yarza et al., 2016). La via de senyalització de JNK ha sigut estudiada com un mecanisme patològic en diferents malalties, especialment en el camp de la oncologia.



**Figura 17. Representació esquemàtica de la via de JNK MAPK.** Diferents estímuls activen a JNK MAPK a través d'una cascada de proteïnes quinases, per mitjà de molècules intermediàries que trameten l'estímul a la cascada de quinases. Aquesta cascada consisteix en MAPKKs que fosforilen a MAPKKs, les quals fosforilen a les diferents isoformes de JNK MAPK. Un cop activada JNK MAPK, aquesta fosforila substrats citoplasmàtics o es transloca al nucli per regular diferents factors de transcripció. A la figura es mostren els components més representatius de la via de JNK MAPK.

Dos dels inhibidors de la via de JNK són SP600125 (o inhibidor de JNK II) (Bennett et al., 2001) i AS601245 (o inhibidor de JNK V) (Carboni et al., 2004) que són inhibidors competitius d'ATP reversibles que s'han utilitzat molt per l'estudi de les funcions en les que participa JNK. Però, s'ha descrit que aquests compostos presenten una baixa selectivitat ja que no només inhibeixen a MKK4 i MKK7, sinó que també inhibeixen a altres proteïnes quinases (Bain et al., 2007). Posteriorment, s'han descrit altres molècules, de les quals la majoria inhibeixen JNK3 (Bogoyevitch et al., 2010).

---

## 4.2 Altres vies de senyalització: AMPK i PI3K/Akt

### 4.2.1 La via d'AMPK

La majoria de processos cel·lulars requereixen energia que s'obté de la hidròlisi de l'ATP a ADP o, menys freqüentment, a AMP i pirofosfat. La proteïna quinasa activada per AMP (AMPK) és una proteïna reguladora de la homeòstasi energètica cel·lular, ja que coordina diferents vies metabòliques per tal de mantenir el balanç entre el subministrament i la demanda de nutrients en les cèl·lules.

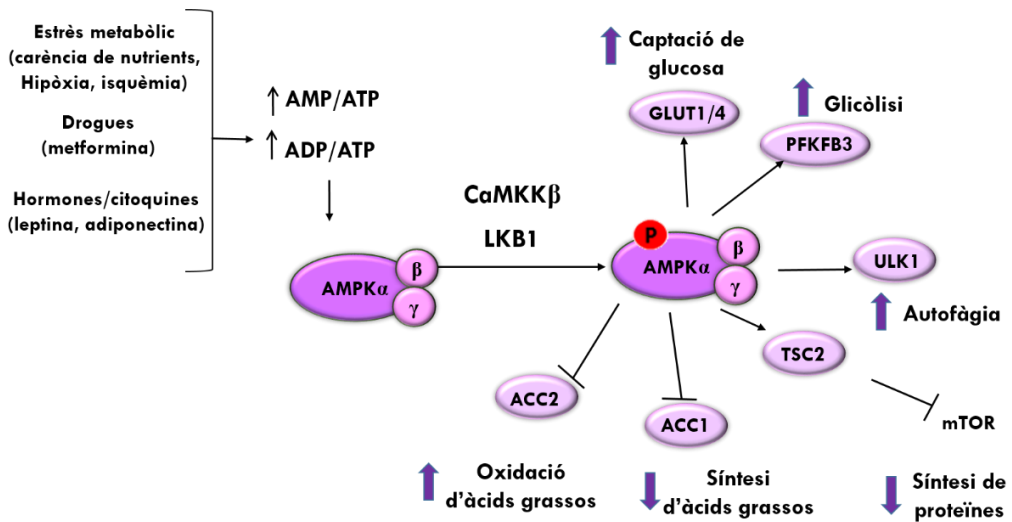
AMPK s'activa en resposta a un augment de la ratio AMP/ATP induint les vies catabòliques, per generar més ATP, i inhibint les vies anabòliques. Per tant, AMPK funciona com un sensor metabòlic que integra senyals nutritives i hormonals per mantenir el balanç energètic cel·lular i exercir les funcions metabòliques apropiades en resposta a les variacions nutricionals i ambientals. És per això que aquesta proteïna es considera una diana terapèutica per al tractament de malalties amb alteracions metabòliques com el càncer.

En mamífers hi ha set gens que codifiquen per les diferents subunitats d'AMPK ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  i  $\gamma 3$ ), el que permet l'expressió de 12 complexos diferents (Hardie et al., 2016). AMPK consisteix en un complex heterotrimèric format per una subunitat catalítica  $\alpha$  i dues subunitats reguladores ( $\beta$  i  $\gamma$ ) en una ratio de 1 $\alpha$ :1 $\beta$ :1 $\gamma$  (Crute et al., 1998). S'ha descrit que l'activació d'AMPK es dona per dos mecanismes. Per fosforilació de la Thr172 en el loop d'activació de la subunitat  $\alpha$  (Hawley et al., 1996). Dues de les quinases identificades de la cascada de fosforilació són CaMKK $\beta$  (*Calcium/calmodulin dependent protein Kinase Kinase*  $\beta$ ), que s'activa en resposta a calci, i LKB1 (*Liver Kinase B1*), que forma un complex amb dues subunitats accessòries, STRAD i MO25 (Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004; Woods et al., 2003, 2005). Recentment s'ha suggerit que el membre de la família de MAPKKK TAK1/MAPK3KT podria fosforilar la Thr172, encara que les condicions fisiològiques en les quals TAK1 regula AMPK no estan del tot clar (Momcilovic et al., 2006; Xie et al., 2006). A més, AMPK pot ser activada al·lostèricament per la unió d'AMP a la subunitat  $\gamma$  o per molècules activadores (Xiao et al., 2013). La unió d'AMP

augmenta l'activitat de l'AMPK i provoca un canvi conformacional de la proteïna que la protegeix de la desfosforilació de la Thr172, afavorint l'acumulació de la forma fosforilada activa d'AMPK (Suter et al., 2006). També s'ha demostrat que nivells elevats d'ATP tenen un efecte contrari en AMPK.

AMPK s'activa per estrès metabòlic, ja sigui perquè interfereix en la generació d'ATP (com la carència de glucosa, hipòxia, isquèmia o tractament amb drogues metabòliques) o bé perquè accelera el consum d'ATP (com la contracció muscular). En ambdós casos les ratios AMP:ATP i ADP:ATP incrementen (Hardie, 2007). AMPK també pot activar-se per nombroses drogues o xenobiòtics com la metformina (Zhou et al., 2001) i les tiazolidinediones (Fryer et al., 2002) que s'utilitzen per tractar la diabetis de tipus 2. A més a més, AMPK també està modulada per hormones i/o citoquines que regulen el balanç energètic de tot el cos, com la leptina i l'adiponectina (Khan et al., 2009), els canabinoïdes (Kola et al., 2006) i les hormones tiroïdes (López et al., 2010).

Per tal de mantenir l'homeòstasi energètica, com ja s'ha comentat, AMPK activa vies catabòliques que generen ATP, alhora que reprimeix vies que consumeixen ATP. Dins de les vies catabòliques induïdes per AMPK hi ha la captació de glucosa, activant a GLUT1 (Barnes et al., 2002) i GLUT4 (Holmes et al., 1999; Kurth-Kraczek et al., 1999), la glicòlisi, via fosforilació i activació dels isoenzims PFKFB2 i PFKFB3 de PFK-2/FBPasa-2 que sintetitzen el metabòlit activador de la glicòlisi Fructosa-2,6-P<sub>2</sub> (Marsin et al., 2002, 2000), la captació d'àcids grassos (Bonen et al., 2007) i l'oxidació d'àcids grassos (Merrill et al., 1997). Entre les vies anabòliques que inhibeix s'hi troben la síntesi d'àcids grassos a través de la fosforilació d'ACC1 (*Acetyl-CoA Carboxylase 1*), la síntesi d'isoprenoides, triglicèrids i fosfolípids, la síntesi de glicogen, per fosforilació de la glicogen sintasa, i la síntesi de RNA ribosomal (Hardie, 2007; Hoppe et al., 2009). AMPK també pot reprimir l'expressió d'enzims per la síntesi d'àcids grassos a nivell de la transcripció mitjançant la fosforilació de factors de transcripció com SREBP-1c, fet que inhibeix el processament proteolític que el fa actiu al nucli (Zhou et al., 2001). AMPK indueix senyals anti-proliferatius, a través de la inhibició de mTOR, i l'autofàgia, a través de l'activació de ULK1 (*Unc-51-like Kinase 1*) (**Figura 18**).



**Figura 18. Representació esquemàtica de la regulació d'AMPK.** AMPK en resposta a diferents estímuls s'activa al·lostèricament per un augment en la ratio AMP/ATP o ADP/ATP i és fosforilada per CaMKKβ o LKB1. A la figura es mostren alguns dels substrats d'AMPK i alguns dels efectes en el metabolisme cel·lular.

#### 4.2.2 La via de PI3K/Akt

La via de PI3K/Akt es troba altament conservada i juga un paper important en la regulació de diferents processos cel·lulars com el metabolisme, el creixement, la proliferació, la supervivència i la síntesi de proteïnes (Manning and Cantley, 2007) és per això que els membres d'aquesta via són dianes terapèutiques pel tractament de diferents patologies com el càncer i la diabetis.

Les proteïnes PI3K es divideixen en tres classes en funció de les seves característiques estructurals i l'especificitat per substrat. D'aquestes, la més comunament estudiada és la classe I, la qual està formada per heterodímers que consisteixen en una subunitat catalítica p110 i una subunitat reguladora p85, la qual està implicada en l'activació, per la unió al receptor, i la localització de l'enzim (Cantley, 2002).

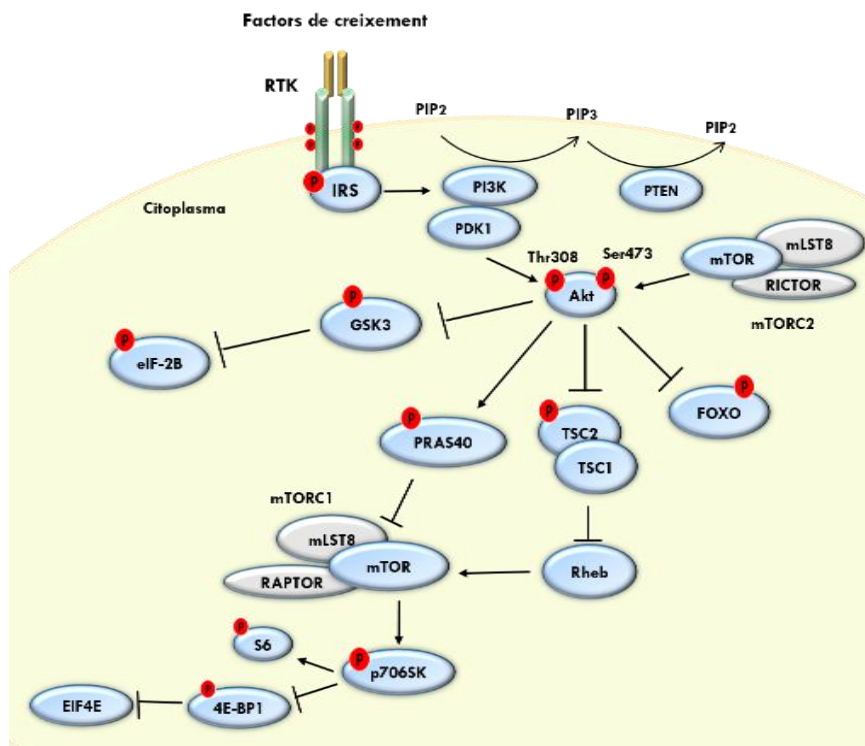
La via de PI3K/Akt pot activar-se a través de diferents receptors com els RTK, de citoquines, d'integrines, de cèl·lules B i T o receptors acoblats a proteïnes G. Un cop el receptor és activat, estimula directament la unió de PI3K a través dels dominis SH2 de la seva subunitat reguladora p85 o de molècules adaptadores com les proteïnes IRS (*Insulin*

*Receptor Substrate*). Ras també pot reclutar i activar a PI3K a través de la unió directa a p110. A la membrana, PI3K fosforila al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP2) al residu 32 convertint-lo així a PIP3. Els nivells de PIP3 a la cèl·lula estan molt regulats per diverses fosfatases lipídiques. Especialment PTEN, que converteix PIP3 de nou a PIP2 aturant la senyalització de PI3K (Engelman et al., 2006). PIP3 recluta altres molècules, especialment a les quinases Akt i PDK1 (*Pyruvate-Dehydrogenase Kinase 1*) a través dels seus dominis d'homologia a plecstrina (PH). A la membrana, Akt és parcialment activat per mitjà de fosforilació de la Thr308 al seu *loop* d'activació per PDK1 (Alessi et al., 1997). La fosforilació de la Ser473 en l'extrem C-terminal d'Akt per mTORC2 fa que aquesta s'activi completament (Sarbasov et al., 2005) (**Figura 19**).

S'han descrit tres isoformes, Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  i Akt3/PKB $\gamma$ , les quals són codificades per tres gens diferents (Datta et al., 1999) i presenten una homologia considerable amb el domini quinasa de les proteïnes quinases A, G i C, essent doncs membres de la família AGC. La seqüència consens de reconeixement per Akt descrita és R-X-R-X-X-S/T-B on X representa qualsevol aminoàcid i B un aminoàcid hidrofòbic voluminos (Alessi et al., 1996). El residu B sembla no ser sempre essencial perquè Akt reconegui la seqüència anterior i la fosforili.

Akt fosforila i inactiva a proteïnes pro-apoptòtiques com FOXO bloquejant la transcripció de gens que promouen apoptosi, aturada de cicle cel·lular i certs processos metabòlics (Tran et al., 2003). Un altre substrat d'Akt és GSK-3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* ), que al igual que FOXO, s'inhibeix quan es fosforila. Per tant la fosforilació d'aquesta quinasa inhibeix l'activitat dels seus substrats, com eIF-2B, el qual quan és fosforilat per GSK-3 $\beta$  s'inhibeix i per tant bloqueja l'inici de la traducció. Akt regula el creixement cel·lular a través dels seus efectes en les vies de mTOR. mTOR és una serina/threonina quinasa que forma part de dos complexos diferents, associat a raptor o a rictor. mTOR/rictor juntament amb altres proteïnes formen el complex anomenat mTORC2, el qual fosforila i activa a Akt. En canvi, mTOR/raptor juntament amb altres proteïnes formen el complex anomenat mTORC1 que s'activa per sota d'Akt i regula la síntesi de proteïnes. El complex mTORC1 es regula per una proteïna d'unió a GTP anomenada Rheb, la qual és regulada per un altre complex anomenat TSC1/2 (*Tuberous Sclerosis 1/2*). Akt al activar-se

fosforila i inhibeix el complex TSC1/2 donant lloc a l'activació de Rheb que activa al complex mTORC1. Aquest últim complex pot fosforilar i activar a p70S6K (*Ribosomal protein S6-kinase*) i fosforilar i inhibir a 4E-BP1 (*Eukariotic Initiation factor-4E Binding Protein*). Quan mTORC1 és actiu, la proteïna p70S6K regula la traducció fosforilant la proteïna S6, entre d'altres. La proteïna 4E-BP1 regula la traducció unint-se amb eIF4E (*eukariotic Initiation Factor-4E*). Quan mTORC1 és actiu, 4E-BP1 es fosforila evitant la unió a eIF4E, la qual s'uneix al 5'cap dels mRNAs donant lloc a un augment de la traducció, en canvi, quan mTORC1 és inactiu 4E-BP1 no fosforilat s'uneix a eIF4E i inhibeix la traducció. Akt també promou la proliferació i el cicle cel·lular per mitjà dels inhibidors de CDK, p21 i p27 i, indirectament, sobre ciclina D1 i p53. Un altre substrat d'Akt és PRAS40 (*Proline-Rich Akt Substrate of 40 KDa*) que s'associa amb mTORC1 inhibint-lo. A través de la fosforilació de PRAS40, Akt activa a mTORC1 (Vander Haar et al., 2007; Sancak et al., 2008) (**Figura 19**).



**Figura 19. Representació esquemàtica de la via de PI3K/Akt.** Exemple d'activació de la via PI3K/Akt pel receptor RTK, el qual, un cop activat per factors de creixement, PI3K es recluta a la membrana a on fosforila a PIP2 convertint-lo en PIP3, que recluta a PDK1 i Akt. PDK1 i mTORC2 fosforilen i activen a Akt que fosforila a un gran nombre de substrats. En la figura es mostren els més representatius.



La fosforilació d'un substrat d'Akt pot bloquejar-se mitjançant l'ús d'inhibidors de les fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) com wormanina o LY294002, ja que les PI3Ks de classe I són activadors d'Akt.

### 4.3 La via de senyalització de TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) pertany a una superfamília de factors de creixement formada per més de 30 membres en humans, juntament amb activines, inhibines, BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*), MIS (*Mullerian Inhibiting Substance*), nodal i GDFs (*Growth and Differentiation Factors*) (Shi and Massagué, 2003).

TGF- $\beta$  és una citoquina multifuncional (pleiotròpica), ja que controla nombrosos processos cel·lulars com és la proliferació, diferenciació, producció de matriu extracel·lular, migració, adhesió, organització del citoesquelet, homeòstasi i mort depenen del tipus cel·lular (Fabregat et al., 2014; Han et al., 2015; Massagué, 2008).

- **Isoformes i estructura de TGF- $\beta$**

S'han descrit sis isoformes diferents de TGF- $\beta$ , de les quals només les isoformes TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3 s'expressen en mamífers (Fabregat et al., 2014). Existeix una homologia del 70% d'aminoàcids entre les isoformes TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2, i del 79% entre les isoformes TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3 (Massagué, 1987). El TGF- $\beta$ 1 i 2 són sintetitzats per diferents tipus cel·lulars com són els limfòcits, macròfags, fibroblasts, astròcits, cèl·lules epitelials així com per cèl·lules tumorals (da Cunha and Vitković, 1992; Steigerwalt et al., 1992). En canvi el TGF- $\beta$ 3 s'ha trobat només expressat en cèl·lules mesenquimals (Barnard et al., 1990). Cadascuna d'aquestes tres isoformes del TGF- $\beta$  són sintetitzades primerament com a proteïnes precursors inactives (Pro-TGF- $\beta$ ) (Massagué, 1987) que, durant el procés de secreció, es trenca l'enllaç peptídic entre l'extrem carboxil-terminal (C-terminal) i l'extrem amino-terminal (N-terminal) d'aquest. El C-terminal rep el nom de pèptid associat a latència (LAP), mentre que el N-terminal s'anomena TGF- $\beta$  madur o actiu. El TGF- $\beta$  processat es secreta com un complex latent format per l'associació no

---

covalent del LAP amb la forma madura, el que s'anomena L-TGF- $\beta$ . Aquest complex no té cap efecte biològic ja que no pot interactuar amb el seu receptor a causa de la presència del LAP que impedeix la unió (Khalil, 1999). Perquè el TGF- $\beta$  sigui actiu és indispensable que es dissociï del LAP. La forma activa del TGF- $\beta$  està constituïda per dos dímers de 25 kDa del TGF- $\beta$  madur.

- **Receptors**

Els membres de la família de TGF- $\beta$  inicien la seva senyalització a través de la unió a receptors heterotetramèrics de membrana amb activitat serina/treonina quinasa (Weiss and Attisano, 2013). Aquests complexos heterotetramèrics dels receptors consten de dos tipus de receptors, els quals tenen una estructura i funció diferent. En humans, s'han descrit set receptors tipus I de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI), anomenats també ALKs (*Activin-Like receptor Kinases*) i cinc receptors tipus II de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RII). Els dos tipus de receptors presenten un domini extracel·lular capaç d'unir el lligand, una regió transmembrana i un domini citoplasmàtic amb activitat serina/treonina quinasa (Akhurst and Hata, 2012). Una de les diferències principals entre els dos tipus de receptors és que el T $\beta$ RII es troba fosforilat de forma constitutiva (Fabregat et al., 2014) i que el T $\beta$ RI es activat pel T $\beta$ RII a través de la fosforilació al seu domini glicina/serina (domini GS), que es troba al N-terminal, en resposta a la unió del lligand als dos receptors (Derynck and Feng, 1997; Massagué and Weis-Garcia, 1996). Mentre que en absència de lligand els T $\beta$ RI/II existeixen com a homodímers a la superfície cel·lular, en presència de lligand es forma un complex heterotetramèric que consisteix en dos T $\beta$ RI i T $\beta$ RII.

S'han descrit també diferents co-receptors de TGF- $\beta$ , com el receptor tipus III (T $\beta$ RIII), també anomenat betaglicà, i l'endoglina que, encara que no presenten el domini citoplasmàtic quinasa de senyalització, tenen la funció principal de regular la unió del lligand al receptor (Akhurst and Hata, 2012; Principe et al., 2014). Tot aquests conjunt de molècules actuen conjuntament per poder exercir un control específic sobre la senyalització de TGF- $\beta$ .

Existeix una afinitat diferencial entre el TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3 i la unió als diferents receptors. Per exemple, el receptor tipus I i II s'uneix al TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 3 amb major afinitat que al TGF- $\beta$ 2.

- **Via de senyalització**

El TGF- $\beta$  funciona com una proteïna reguladora que transmet la seva funció des de la superfície cel·lular al nucli a través de la transducció de senyals moleculars. La senyalització de TGF- $\beta$  es dona principalment a través de la via de Smads (via canònica), però també pot activar vies independent de Smads (vies no canòniques). L'activació d'aquestes vies depèn del context i del tipus cel·lular i la integració d'aquestes és el que determina les respostes cel·lulars del TGF- $\beta$  (Principe et al., 2014) (**Figura 20**).

### **Via canònica**

#### *Les proteïnes Smads*

Les proteïnes Smad (homòlogues de la proteïna de *Drosophila*, *Mothers Against Decapentaplegic* (MAD) i la proteïna de *C.elegans*, SMA) han sigut identificades com les principals transductores de senyals de TGF- $\beta$  (Arrick et al., 1992; Chen et al., 1997; Derynck et al., 1998; Heldin et al., 1997). En humans, la família de Smad inclou vuit membres que es divideixen en tres grups segons la funcionalitat (Chen et al., 1997; Derynck and Zhang, 2003; Shi and Massagué, 2003; Weiss and Attisano, 2013).

- Les R-Smads (*Receptor-regulated Smads*): formades per Smads 1, 2, 3, 5 i 8. Presenten un motiu al C-terminal Ser-X-Ser, el qual es fosforila pel receptor tipus I. Aquestes proteïnes es poden subdividir segons com són activades per aquest receptor. Per una banda tenim la Smad2 i la Smad3 que són activades per TGF- $\beta$ , nodal, activines i miostatines a través del receptor de tipus I ALK5, i per l'altra banda trobem les Smads 1, 5 i 8 que són activades per BMPs i MIS a través del receptor de tipus I ALK1 (Macias et al., 2015).

- La Co-Smad (*Common mediator Smad*): anomenada Smad4 i és medidora única per a totes les R-Smads i necessària per a la majoria dels efectes de les R-Smads.
- Les I-Smads (*Inhibitory Smads*): formades per la Smad6 i Smad7. Aquestes són induïdes transcripcionalment per diversos membres de la superfamília de TGF- $\beta$  i, a diferència de les altres, no presenten el motiu Ser-X-Ser al C-Terminal, per lo que no serveixen com a substrat del receptor tipus I. En canvi sí que interactuen amb aquest receptor competint amb les R-Smads en la seva associació amb el receptor o amb la Co-Smad. Per tant, les I-Smads tenen un paper important en la regulació de la resposta induïda per TGF- $\beta$  ja que interactuen amb el receptor tipus I de forma més estable que les Smad2 i 3, competint llavors per la unió amb el receptor i bloquejant la seva fosforilació (Shi and Massagué, 2003; Weiss and Attisano, 2013).

Les proteïnes Smad2, Smad3 i Smad4 consisteixen en dos dominis globulars units per una regió *linker*. El domini MH1 (*Mad Homology domain 1*), que es troba al N-terminal, té la funció d'unir-se al DNA i el domini MH2, al C-terminal, està implicat en la interacció proteïna-proteïna amb un gran nombre de proteïnes reguladores i efectores, incloent el receptor de TGF- $\beta$  entre d'altres (Macias et al., 2015). La regió *linker* és rica en serines i prolines que són dianes de fosforilació per altres vies de senyalització. Les I-Smads, a diferència de les R-Smads i la Co-Smad, només conserven de les altres proteïnes Smads el domini MH2 (Weiss and Attisano, 2013).

### Senyalització

La forma activa del TGF- $\beta$ , constituïda per un dímer de dues subunitats idèntiques unides generalment per ponts disulfur, s'uneix primer al receptor tipus II de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RII), el qual fosforila el domini ric en glicina/serina del receptor tipus I de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI), activant l'activitat quinasa d'aquest i donant lloc a un complex heterotetramèric constituït per dos T $\beta$ RI i dos T $\beta$ RII (Wrana et al., 1994). Un cop format el complex, el T $\beta$ RI recluta i fosforila les R-Smads, a la seqüència pSer-X-pSer que es troba a l'extrem C-terminal. Aquesta fosforilació permet la formació d'un complex entre les R-Smads juntament amb la Co-Smad a través del domini MH2 originant heterotrímerns compostos per una molècula

de Smad4 i dues de R-Smad. S'ha vist que *in vitro* el complex pot estar format per homotrímers o heterotrímers amb la Smad4. Un cop format el complex, aquest es transloca del citoplasma al nucli, per un mecanisme mediat per importines i/o nucleoportines, a on interacciona amb proteïnes Co-reguladores i altres factors per regular la transcripció dels gens diana com Id1, Id3, fibronectina, PAI-1 (Macias et al., 2015; Massagué, 2000). Un cop realitzada la seva funció, fosfatases nuclears desfosforilen a les R-Smads, donant lloc a la dissociació del complex i la seva exportació al citoplasma, tancant el cicle de senyalització. Mentre que les R-Smads presenten una localització citoplasmàtica en absència de senyal, Smad4 es distribueix igualment entre el citoplasma i el nucli (Feng and Derynck, 2005; Massague et al., 2005; Ross and Hill, 2008).

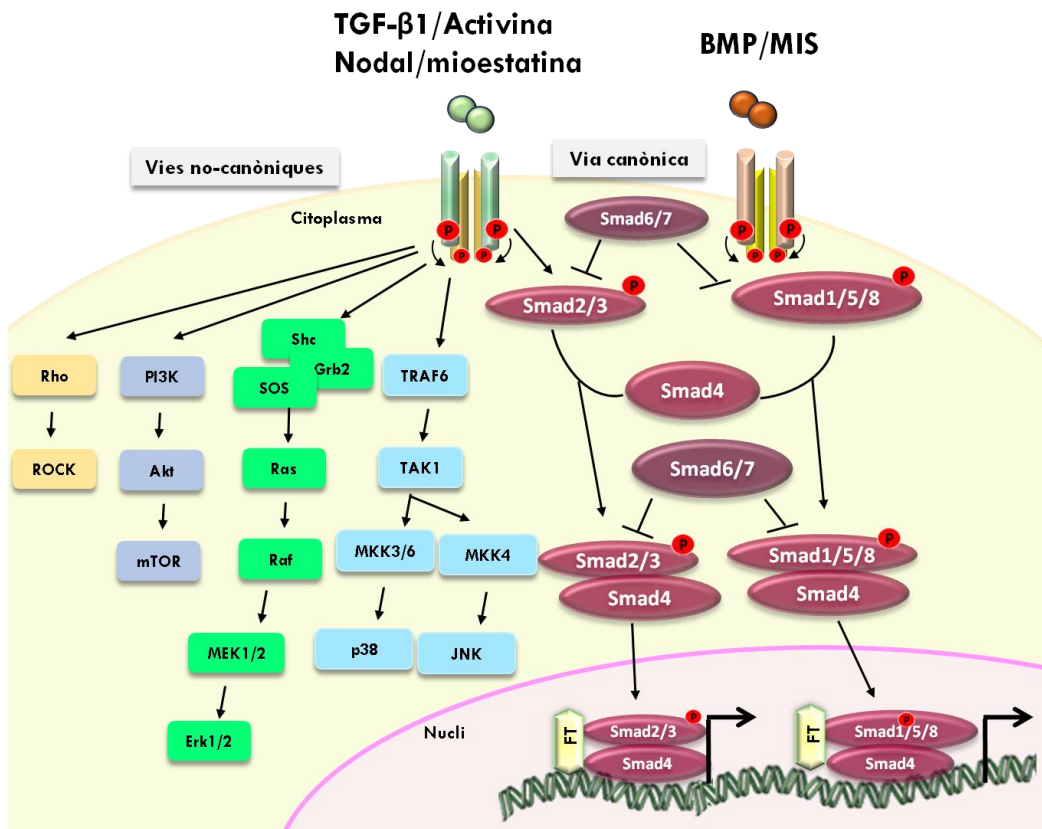
La disponibilitat de les R-Smads està controlada per l'acció de la ubiquitina lligasa Smurf 1 i 2 (*Smad Ubiquitination-Related Factor*). Aquestes proteïnes interaccionen físicament amb les R-Smads induint la seva degradació via proteasoma (Kuratomi et al., 2005). Les I-Smads també poden reclutar fosfatases, que inactiven a les R-Smads, o Smurf1 i 2 per induir la degradació (Feng and Derynck, 2005; Massague et al., 2005; Ross and Hill, 2008).

S'ha descrit un altre efecte inhibitori de les I-Smad sobre la senyalització de TGF- $\beta$ , en aquest cas la inhibició de la formació del complex Smad-DNA per Smad7, eliminant la funcionalitat del complex en la inducció de la transcripció del gen diana (Zhang et al., 2007). També s'ha observat que Smad3 induïx la l'expressió de Smad7 suggerint un mecanisme de retroalimentació negativa, assegurant la transducció de la senyal durant un període de temps determinat (Feng and Derynck, 2005).

### **Vies no canòniques**

En les vies no-canòniques, el complex del receptor de TGF- $\beta$  activat transmet la senyal a través d'altres factors com TRAF4 (*TNF Receptor Associated Factor 4*) o TRAF6, TAK1 (*TGF $\beta$ -Activated Kinase 1*), p38 MAPK, Rho, PI3K/Akt, Erk, JNK o NF- $\kappa$ B (Moustakas and Heldin, 2005; Weiss and Attisano, 2013; Zhang, 2009).

S'ha observat un altre nivell de regulació ja que la via de TGF- $\beta$  pot ser regulada per miRNAs i també les Smads poden regular la transcripció de miRNA (Saj and Lai, 2011). Les proteïnes Smads poden unir-se directament al pri-miRNA per estimular el processament per Dorsha d'aquestes molècules donant lloc al pre-miRNA (Davis et al., 2010).



**Figura 20. Representació esquemàtica de la via de senyalització de la família de TGF- $\beta$ .** La unió del lligand al receptor amb activitat quinasa serina/threonina fosforila a les R.Smads Smad2/3 (TGF- $\beta$ , activina, Nodal, mioestatina) o Smad1/5/8 (BMP, MIS). Un cop fosforilades les R-Smads formen un complex amb Smad4 (Co-Smad) i que es transloca al nucli donant lloc a la regulació transcripcional dels seus gens diana, juntament amb altres factors de transcripció i cofactors. Les Smads 6/7 (I-Smads) antagonitzen l'activació de les R-Smads. La via de TGF- $\beta$  també afecta a vies no-canòniques com Erk, JNK i p38 MAPK, PI3K/Akt, GTPasa Rho entre d'altres.



# OBJECTIUS

---





L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral és l'estudi de la regulació del gen PFKFB3 i de la proteïna principal per la que codifica en models de cèl·lules tumorals i en resposta a diferents estímuls. També, definir i caracteritzar els mecanismes moleculars directament implicats en aquesta regulació per tal de correlacionar-la amb la reprogramació glicolítica característica d'aquestes cèl·lules.

Hem desglossat aquest objectiu general en quatre objectius específics:

1. Estudiar la regulació post-traducciona de PFKFB3 en resposta a insulina en la línia d'adenocarcinoma de colon HT29 i la via de senyalització implicada en aquesta regulació.
2. Estudiar els mecanismes moleculars implicats en la regulació transcripcional de PFKFB3 en resposta a insulina en les cèl·lules HT29.
3. Estudiar la resposta de PFKFB3 i de la glicòlisi al tractament amb TGF- $\beta$ 1 en la línia cel·lular de glioblastoma T98G.
4. Definir els mecanismes moleculars responsables de la regulació transcripcional de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 en les cèl·lules T98G.



# RESULTATS

---



## Capítol 1:

# Regulació de PFKFB3 per insulina en les cèl·lules de càncer de colon

HT29

---



## 1. Introducció

La insulina és la principal hormona que regula el metabolisme dels carbohidrats. El principal factor que regula la seva síntesi i secreció és la concentració de glucosa en sang (Beardsall et al., 2008). És una hormona peptídica formada per 51 aminoàcids. Es sintetitza com a pre-pro-insulina per les cèl·lules  $\beta$  dels illots de Langerhans al pàncrees. Posteriorment, a través d'un processament post-traduccional, dona lloc primer a la pro-insulina i, finalment, a la forma madura i activa de la insulina. Aquesta última està formada per dues cadenes (A i B) unides per ponts disulfur (Weiss et al., 2000). Un cop es troba al torrent sanguini, la insulina exerceix els seus efectes metabòlics a les cèl·lules mitjançant la unió al receptor de la insulina.

La insulina també participa en diferents processos cel·lulars com és el creixement, la proliferació i la supervivència (Drakas et al., 2004; Kahn, 2003), regulant particularment els processos que estan relacionats amb el metabolisme, com és el transport de glucosa, la síntesi de glicogen, la síntesi de proteïna, el metabolisme lipídic i l'expressió gènica (Saltiel and Kahn, 2001).

### 1.1 Via de senyalització de la insulina

Els receptor de la insulina (IR) forma part de la família de receptors de factors de creixement amb activitat tirosina quinasa. Existeixen dues isoformes per *splicing* alternatiu de l'IR, IR-A i IR-B. L'IR-B és el receptor tradicional de la insulina i l'IR-A és la forma fetal, que també es re-expressa en diferents tumors. Els IR consten de proteïnes tetramèriques formades per dues subunitats  $\alpha$  extracel·lulars idèntiques, que és on es troba el domini d'unió a la insulina, i per dues subunitats  $\beta$  transmembrana, que presenten l'activitat tirosina quinasa activada per lligand en el seus dominis intracel·lulars (Goldfine, 1987; Ottensmeyer et al., 2000; Rosen, 1989; Ullrich et al.; White and Kahn, 1994).



Apart de la insulina, els factors IGFs (*Insulin-like Growth Factors*) també es poden unir a l'IR. Els IGFs són pèptids estructuralment relacionats amb la insulina que regulen la proliferació, diferenciació, migració, supervivència cel·lular i apoptosi (Pavelić et al., 2007). Existeixen dos tipus d'IGF, l'IGF-I i l'IGF-II que s'uneixen als seus receptors, IGFIR i IGFIIIR. S'ha descrit que els receptors IGFIR i IR interaccionen de diferents maneres donat que presenten una elevada homologia en els seus dominis quinasa i per tant poden formar receptors híbrids per heterotetramerització (Kasuya et al., 1993).

La via de senyalització s'inicia per la unió de la insulina a les subunitats  $\alpha$  del receptor, que activa l'activitat quinasa de les subunitats  $\beta$  donant lloc a l'autofosforilació d'aquest en els residus de tirosina permetent així el reclutament de diferents substrats com són les proteïnes del receptor de la insulina (IRS1-4) o SHC entre d'altres. Quan aquests substrats són fosforilats pel receptor en els residus de tirosina s'inicia el reclutament de molècules adaptadores amb dominis SH2 (Src-homology-2) (Sun et al., 1993), com PI3K o Grb2 (Clayton et al., 2011; Pollak, 2008; Sachdev and Yee, 2001; Zhang and Yee, 2006). Aquest procés dóna lloc a l'activació de diferents vies entre les quals les més principals són les vies PI3K/Akt i Erk MAPK (**Figura 21**). La via de PI3K/Akt s'ha relacionat principalment amb l'acció metabòlica de la insulina, mentre que la via de Erk MAPK es troba principalment implicada en el creixement cel·lular i la diferenciació (Boucher et al., 2014).

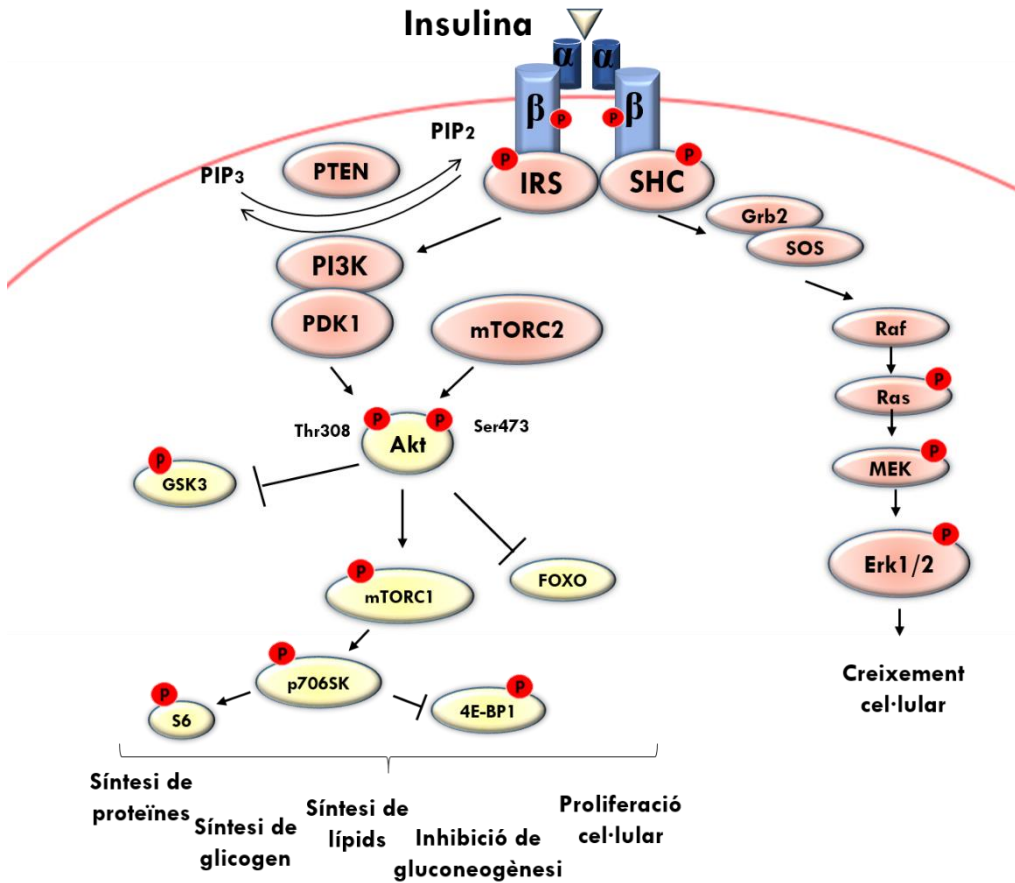
PI3K un cop a la membrana, és activada i transfereix el seu grup fosfat al seu substrat fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfat [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] (PIP<sub>2</sub>), que dóna lloc a fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) (PIP<sub>3</sub>). Aquest s'uneix als dominis PH de la quinasa dependent de PIP<sub>3</sub> (PDK-1) activant-la. PDK-1 fosforila i activa la proteïna quinasa B, coneguda com Akt, a la treonina 308. Perquè Akt sigui completament activada és necessària la fosforilació de la seva serina 473 per mTORC2 (Sarbasov et al., 2005). Un cop activada Akt, aquesta fosforila i inactiva TSC-2. L'activació de TSC-2 induïx la formació d'un estat inactiu de la proteïna Rheb unida a GDP, llavors quan s'inactiva TSC-2 a causa de la fosforilació per Akt, s'indueix l'activació de Rheb que activa el complex mTORC1. Aquest últim complex fosforila p70S6K i la 4E-BP1 donant lloc a la regulació de diferents gens que controlen el metabolisme, la síntesis de proteïnes, el creixement

cel·lular i l'autofàgia (Düvel et al., 2010). Akt també regula dos altres substrats que són GSK-3 i la família de factors de transcripció *forkhead* FOXO.

A través de l'activació de la via de PI3K/Akt, en múscul i adipòcits, la insulina indueix la translocació del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana cel·lular afavorint d'aquesta manera la captació de glucosa per part de la cèl·lula (Slot et al., 1991; Zorzano et al., 1997).

PTEN es considerat com supressor tumoral en molts tipus de càncer ja que és una fosfatasa lipídica que desfosforila PIP3 regulant de forma negativa la via de senyalització de PI3K/Akt. En aquest sentit, en moltes cèl·lules tumorals l'activitat de PTEN es troba alterada potenciant d'aquesta manera la inducció de la via de PI3K/Akt/mTOR/S6K per la insulina en càncer (Simpson et al., 2001).

Independentment de la via de PI3K, la insulina també activa la via de Grb2-SOS-Ras-MAPK. Grb2 presenta dominis SH2 que s'uneixen al receptor. Grb2 s'uneix a Gab-1 i a SOS, que és un factor intercanviador de nucleòtid de guanina i per tant catalitza el canvi de la forma inactiva de Ras unida a GDP (Ras-GDP) a una forma activa de Ras unida a GTP (Ras-GTP). Ras-GTP interactua amb la quinasa Raf, que és una proteïna quinasa, la qual indueix l'activació de MEK1 i MEK2 que fosforila i activa a Erk1/2. L'activació d'aquesta via de senyalització dóna lloc a la fosforilació de serines i treonines de diferents substrats com c-Jun, c-Fos, c-Myc, ATF-2, entre d'altres, que regulen la transcripció de diferents gens relacionats amb la supervivència, creixement, cicle cel·lular com Sp1, E2F, Ap-1, entre d'altres (Bonni et al., 1999; Ceresa and Pessin, 1998; Murphy and Blenis, 2006; Roux and Blenis, 2004).



**Figura 21. Representació esquemàtica de la via de senyalització d'insulina.** Després de la unió de la insulina al receptor amb activitat tirosina quinasa, aquest s'autofosforila i permet el reclutament de PI3K que recluta a PDK1 que, juntament amb el complex mTORC2, fosforilen a Akt. Un cop activat Akt, aquest fosforila a un gran nombre de substrats. En la figura es mostren els més representatius. L'activació del receptor de la insulina també pot activar la via de Erk1/2 que activa la transcripció de gens responsables dels efectes mitogènics de la insulina. Figura adaptada de (Boucher et al., 2014).

## 1.2 Insulina i càncer

Diferents estudis demostren que la insulina té un paper important en el creixement cel·lular i la supervivència del càncer (Fierz et al., 2010; Gallagher and LeRoith, 2011; Szabolcs et al., 2009; Zhang et al., 2010). Com s'acaba de comentar, la insulina és un regulador principal del metabolisme cel·lular però també actua com a factor de

creixement, és per això que una hiperactivació de la via de la insulina pot donar lloc a diferents patologies com el càncer. Als anys 70, es va descriure que concentracions fisiològiques d'insulina estimulaven la proliferació de cèl·lules de càncer de mama, ja que, en models de rata, la deficiència d'aquesta hormona inhibia la seva proliferació (Heuson et al., 1972; Osborne et al., 1976). Estudis posteriors van suggerir un paper directe de la insulina sobre el creixement tumoral, ja que mostraven que la línia cel·lular de càncer de mama MCF7 no formava tumors en models de ratolí amb deficiència d'insulina, però sí que formaven tumors quan els ratolins eren tractats amb aquesta hormona (Nandi et al., 1995).

També s'ha descrit que l'IR es troba altament sobreexpressat en diferents tipus de cèl·lules canceroses (Avnet et al., 2009; Frasca et al., 2003; Frittitta et al., 1993; Mathieu et al., 1997; Zhang et al., 2012) i que de forma majoritària és la isoforma IR-A, la qual té efectes predominantment mitogènics (Frasca et al., 1999). A més, s'ha descrit que la inhibició de l'IR evita la proliferació cel·lular, l'angiogènesi i metàstasi (Zhang et al., 2010). Aquestes característiques proporcionen un avantatge a nivell de creixement a les cèl·lules canceroses en presència d'insulina. Aquests estudis es correlacionen amb estudis epidemiològics on demostren que condicions d'hiperinsulinèmia, tant endògena (síndrome metabòlic, obesitat, diabetis tipus 2) com exògena (diabetis tipus 1), s'associen amb un increment del risc de patir diferents tipus de càncer, com és el de mama, pròstata, colon i ronyó (Calle and Thun, 2004; Frasca et al., 2008; Pollak, 2008; Vigneri et al., 2006).

### 1.3 Insulina i glicòlisi

Com ja s'ha comentat a l'apartat d'introducció, els isoenzims PFKFB són els responsables de la síntesi de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Diferents estudis descriuen l'efecte de la insulina sobre la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i el paper d'aquest metabòlit en l'activació del flux glicolític. Per exemple, s'ha observat que el tractament amb sèrum i insulina en fibroblasts humans produeix un increment de la producció de lactat que es correlaciona amb un augment de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (Bruni et al., 1983; Farnararo et al., 1984). També s'ha vist que, en fibroblasts embrionaris de pollastre, es dona una estimulació de la glicòlisi després de

l'addició d'insulina i d'èsters de forbol que també es correlaciona amb un increment de la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (Bosca et al., 1985). En línies cel·lulars establertes s'han trobat resultats similars. Per exemple, la insulina produeix un augment de la glicòlisi i del consum de glucosa, però sense augmentar el transport d'aquesta en la línia cel·lular d'adenocarcinoma de colon humà HT29 (Franklin et al., 1988), indicant que la insulina estaria induint algun canvi en la via. A més, altres estudis han demostrat que tant la insulina com els èsters de forbol augmenten la taxa glicolítica d'aquestes cèl·lules en paral·lel a un augment de la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat (Babia et al., 1989; Denis-Pouxviel et al., 1990). També s'ha vist que en fibroblasts swiss-3T3, l'estimulació de diferents vies mitogèniques (PKC, cAMP i insulina) incrementa la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (Dalmau et al., 1994).

En conjunt, aquests estudis previs mostren l'existència d'una correlació entre els nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i la taxa glicolítica sota diferents condicions d'estimulació de la proliferació cel·lular en presència d'insulina i denoten la importància que podria tenir aquest metabòlit en el control de la glicòlisi en sistemes proliferants, que poden ser processos tumorals o deguts a proliferació cel·lular induïda per agents mitogènics. Així doncs, la regulació dels nivells intracel·lulars de Fru-2,6-P<sub>2</sub> esdevindria un punt de connexió entre el metabolisme energètic de la cèl·lula i els senyals mitogènics.

En el nostre grup va demostrar que PFKFB3 s'expressa en les cèl·lules HT29 i que a més es regula en resposta a senyals mitogènics, com és el sèrum, els èsters de forbol i la insulina. Per tant, es va pensar que la inducció de la glicòlisi i dels nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> observats anteriorment en aquestes cèl·lules eren deguts a un augment en l'expressió de PFKFB3. Els resultats obtinguts van mostrar que l'estimulació de les cèl·lules HT29 amb insulina donava lloc a un augment de l'expressió del mRNA i de la proteïna de PFKFB3. Aquest augment del mRNA de PFKFB3 era degut a un augment en la transcripció del gen i es requeria l'expressió *de novo* d'alguna proteïna, tot i que no era imprescindible per detectar-ne la inducció (Riera et al., 2002).

Resultats no publicats del nostre laboratori demostraven també la resposta a insulina de PFKFB3 en el model cel·lular de Hela, implicant a la via de PI3K/Akt en aquesta regulació (Novellasdemunt 2012, tesi doctoral). Aquests resultats previs en el model de Hela van

servir com a model per iniciar els estudis, objecte de la present tesi doctoral, en les cèl·lules HT29.

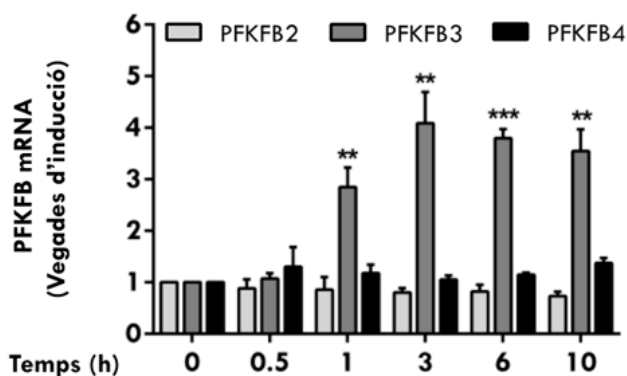
En aquest capítol, farem una aproximació a la regulació de l'isoenzim PFKFB3 en resposta a insulina. Primerament, s'intentarà esbrinar el paper de la proteïna PFKFB3 en resposta a aquest estímul mitogènic a temps curts i, posteriorment, s'analitzarà l'efecte de la insulina sobre la regulació transcripcional de PFKFB3.

## 2. Resultats

### 2.1 Inducció de l'expressió de PFKFB3 per insulina

Per abordar aquest objectiu vam utilitzar la línia cel·lular HT29 ja que, com s'ha comentat a l'apartat d'introducció d'aquest capítol, els resultats obtinguts prèviament demostren que aquestes cèl·lules expressen PFKFB3 i que el metabolisme de carbohidrats d'aquestes respon a insulina, indicant que la insulina regula el metabolisme de les HT29.

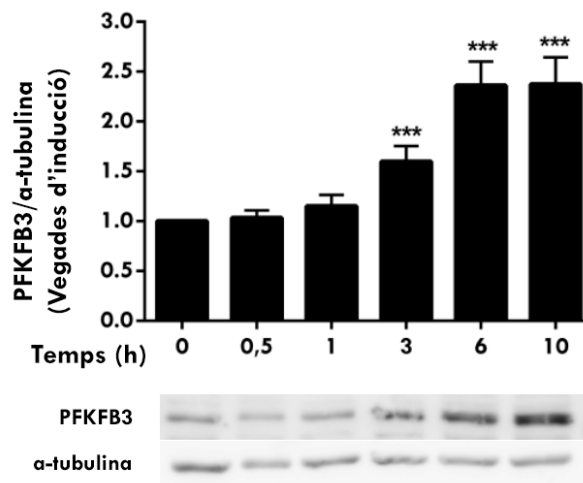
Experiments anteriors del nostre grup van demostrar que les cèl·lules HT29 expressen la isoforma PFKFB3 a nivell basal. Vam voler determinar, per una part, si aquesta línia cel·lular també expressa PFKFB1, PFKFB2 i PFKFB4 i, alhora, si la insulina afectava a l'expressió d'aquestes isoformes. Per dur a terme aquest estudi vam tractar les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, amb insulina durant diferents temps. Mitjançant una RT-qPCR vam analitzar els nivells de mRNA de cada una de les isoformes de PFKFB. La **Figura R-1** mostra que la línia cel·lular HT29 expressa el mRNA de PFKFB2, PFKFB3 i PFKFB4, però en canvi no vam detectar expressió de PFKFB1. En resposta a insulina, PFKFB3 és la única isoforma que es modula, augmentant la seva expressió significativament després d'una hora de tractament i obtenint un màxim d'expressió a les tres hores que es manté de manera sostinguda a les 6 i a les 10 hores.



**Figura R-1.** Expressió relativa dels gens PFKFB al llarg del temps en cèl·lules HT29. El peu de figura continua a la pàgina següent.

**Figura R-1. Expressió relativa dels gens PFKFB al llarg del temps en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb insulina ( $1 \mu\text{M}$ ) durant diferents temps. RT-qPCR utilitzant les sondes humanes específiques per PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 i PFKFB4. La sonda TBP es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control de cada isoforma. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.01$ , \*\*,  $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).

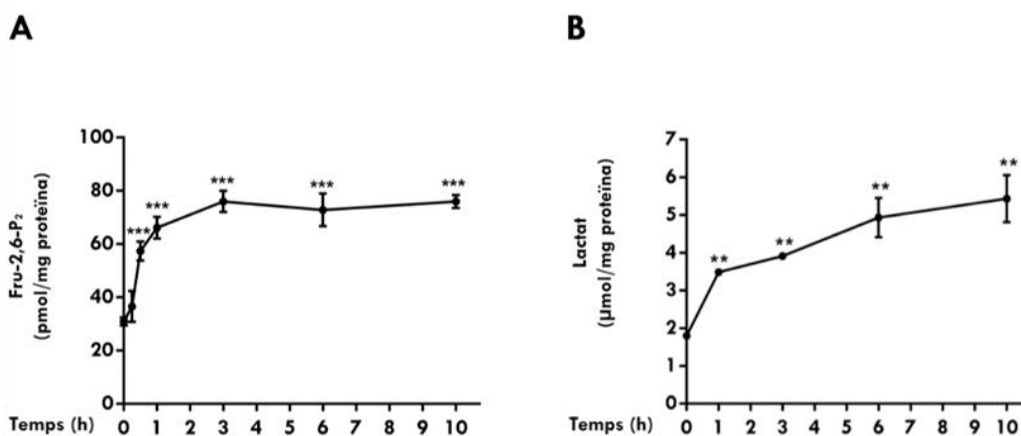
A continuació, vam comprovar com es traduïen aquests resultats a nivell de quantitat de proteïna de PFKFB3. A les tres hores de tractament amb l'hormona s'observa un increment significatiu de la proteïna PFKFB3 (**Figura R-2**). Aquest increment es manté a 6 i 10 hores en consonància a l'augment mantingut de mRNA.



**Figura R-2. Efecte del tractament amb insulina al llarg del temps sobre l'expressió de PFKFB3 en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb insulina ( $1 \mu\text{M}$ ) durant diferents temps. Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3 (panel superior). Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de PFKFB3. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per a normalitzar la càrrega. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).



Per confirmar el paper fisiològic de la inducció de PFKFB3 per insulina, vam analitzar si la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat augmentava de la mateixa manera. A la **Figura R-3** podem observar com hi ha un augment significatiu ja als 30 minuts de la concentració de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> i a una hora del lactat després del tractament amb insulina. Donat que l'augment de proteïna de PFKFB3 total no es detectà fins a les 3 hores de tractament, i alhora és l'única isoforma que es modula a nivell de mRNA en resposta a insulina, s'havia de pensar en algun altre mecanisme de regulació sobre els isoenzims PFKFB com responsable de l'efecte de la insulina sobre la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat dins de la primera hora post-tractament.



**Figura R-3. Efecte del tractament amb insulina al llarg del temps sobre la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb insulina (1 µM) en els temps indicats. **A)** Concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. **B)** Producció de lactat. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents ± SEM de cada condició (p<0.01, \*\*, p<0.001, \*\*\* determinat pel test t-Student).

## 2.2 Regulació post-traduccional de PFKFB3 en resposta a insulina

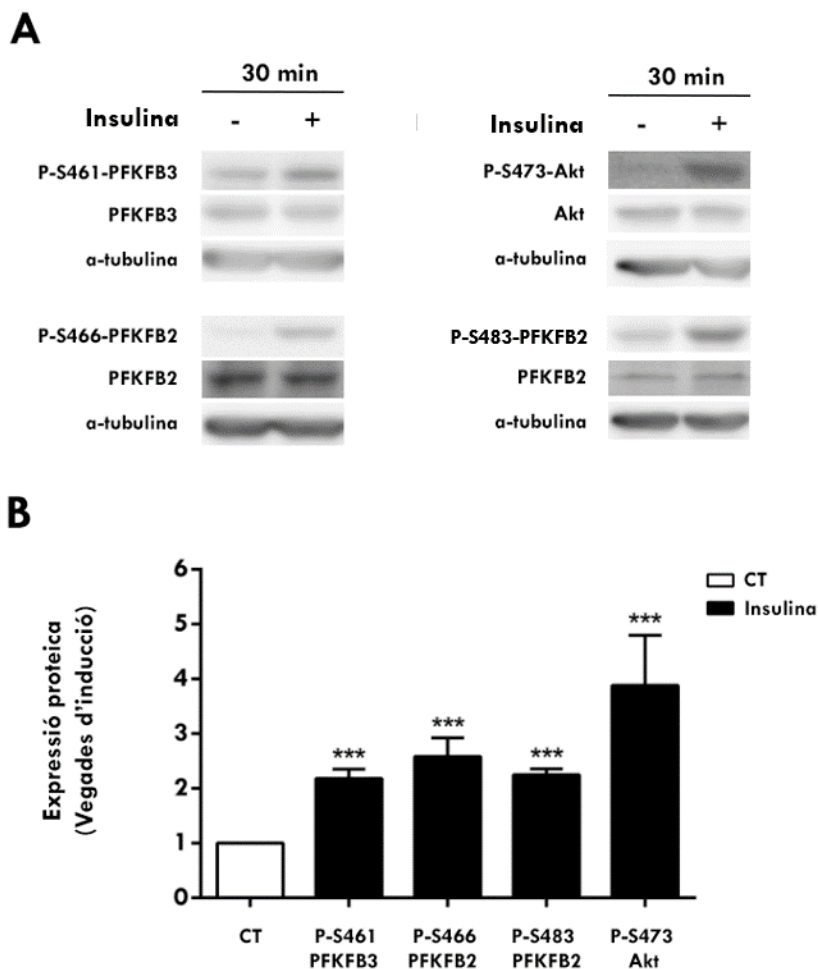
En el nostre grup ja s'ha demostrat que, en resposta a altres estímuls, com progèstàgens i estrès, PFKFB3 es regula a través de dos mecanismes diferents

(Novellasedemunt et al., 2012, 2013c). En primer lloc, PFKFB3 es regula per fosforilació a la seva serina 461 (Ser461) a temps curts, és a dir, de l'ordre de minuts. I, a més a més, a temps més llargs, hi ha una regulació per activació transcripcional del gen PFKFB3 per donar lloc a un augment de seva proteïna total.

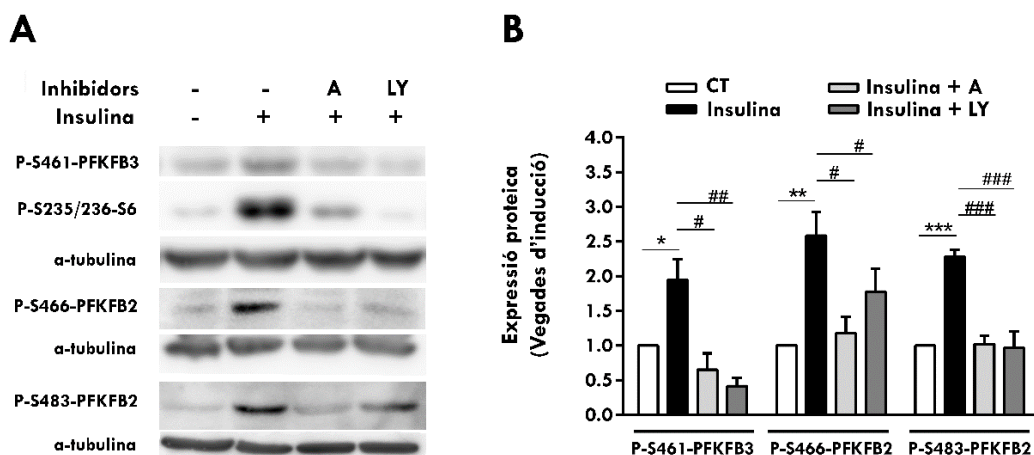
Davant els resultats obtinguts en el nostre model d'insulina en HT29, vam estudiar si també PFKFB3 presentava els dos mateixos mecanismes de regulació descrits anteriorment pels altres estímuls. Així doncs vam procedir a analitzar les possibles modificacions en l'estat de fosforilació de les proteïnes PFKFB en resposta a insulina. Vam analitzar la fosforilació de PFKFB3 a la Ser461 i, a més a més, vam analitzar la fosforilació de PFKFB2, ja que segons el que hi ha descrit a la bibliografia, després de l'estimulació amb insulina en altres models, es produeix la fosforilació de PFKFB2 en la Ser483 i Ser466 (Deprez et al., 1997). Els resultats de la **Figura R-4** mostren un increment tant de la fosforilació de PFKFB3 com de PFKFB2 després de que les cèl·lules, fossin tractades amb insulina durant 30 minuts. En canvi els nivells de proteïna total tant de PFKFB3 com de PFKFB2 es mantenen invariables i al mateix nivell que la proteïna basal.

Per tal d'investigar la via de senyalització implicada en l'efecte de la insulina sobre la fosforilació de PFKFB3, vam començar estudiant la via d'Akt, ja que com s'explica a l'apartat d'introducció, Akt es fosforla en presència d'insulina i tal i com es pot observar a la **Figura R-4** també està activa en el model HT29 en resposta a insulina.

Per tal de veure la implicació d'Akt en la fosforilació de les proteïnes PFKFB, vam pretractar les cèl·lules amb l'inhibidor específic d'Akt Akti-1/2 (A) i l'inhibidor específic de PI3K LY294002 (LY). Com es pot observar a la **Figura R-5**, la inhibició tant d'Akt com de PI3K impedeix la fosforilació de la Ser235/236 de la proteïna S6, que és un substrat de la via d'Akt. Aquest resultat ens serveix de control positiu per indicar que els inhibidors utilitzats bloquegen l'activació de la via. De la mateixa manera, els resultats indiquen que la inhibició de la via evita també la fosforilació de PFKFB3 i PFKFB2. Així doncs, podem afirmar que la via de PI3K/Akt participa en l'activació per fosforilació de PFKFB3 i PFKFB2 a temps curts en resposta al tractament amb insulina.



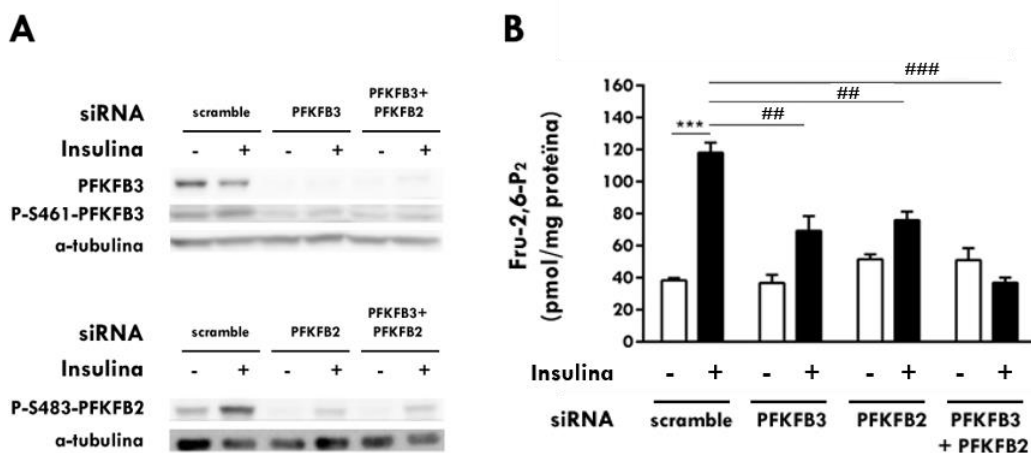
**Figura R-4. Efecte de la insulina sobre la fosforilació de PFKFB3 i PFKFB2 a temps curts en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb insulina (1  $\mu$ M) durant 30 minuts. **A)** Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de les proteïnes indicades. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).



**Figura R-5. Efecte de la inhibició de la via d'Akt sobre la fosforilació de PFKFB3 i PFKFB2 a temps curts en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades durant 30 minuts amb Akti-1/2 (A) (10  $\mu$ M) o LY294002 (LY) (10  $\mu$ M) i posteriorment tractades amb insulina (1  $\mu$ M) durant 30 minuts. **A)** Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de les proteïnes indicades. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.05$ , \*;  $p < 0.01$ , \*\*;  $p < 0.001$ , \*\*\*; per les condicions tractades amb insulina respecte a la condició control;  $p < 0.05$ , #;  $p < 0.01$ , ##;  $p < 0.001$ , ###; per les condicions tractades amb insulina i inhibidor respecte a les tractades només amb insulina, determinat pel test t-Student).

A la llum d'aquests resultats, podíem pensar que l'augment de la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat que havíem observat a temps curts (**Figura R-3**) podria ser degut a l'activitat conjunta dels dos insoenzims, PFKFB3 i PFKFB2, ja que tots dos modifiquen el seu grau de fosforilació en resposta a insulina, podent ser indicatiu d'una major activitat. Per confirmar aquesta hipòtesi, i per tal d'analitzar el grau de contribució de PFKFB3 i/o PFKFB2 a la producció de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, vam procedir a eliminar-ne un o altre transfectant de manera transitòria les cèl·lules HT29 amb els seus siRNAs específics de PFKFB3 i PFKFB2, respectivament. Després de 72 hores de silenciament, moment en que s'assoleix la màxima eficiència del siRNA (Calvo et al., 2006), les cèl·lules van ser tractades amb insulina durant 30 minuts. Els resultats obtinguts mostren que, quan silenciem la PFKFB3, la quantitat de

proteïna total d'aquesta disminueix respecte a la condició control (scramble) així com també la PFKFB3 fosforilada. En quant a la silenciació de PFKFB2, donat que l'anticòs total no va funcionar, vam analitzar els nivells de PFKFB2 fosforilada per confirmar la silenciació de PFKFB2 (**Figura R-6A**). A la **Figura R-6B** es pot observar l'efecte d'aquestes silenciacions sobre la Fru-2,6-P<sub>2</sub>. La silenciació de PFKFB3 provoca que la concentració d'aquest metabòlit, quan les cèl·lules són tractades amb insulina, no augmenti fins als mateixos nivells que en la condició amb els siRNA control amb insulina, i obtenim un efecte similar amb el siRNA de PFKFB2. Només quan PFKFB3 i PFKFB2 es troben silenciades al mateix temps, la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> després del tractament amb insulina es manté a nivells basals. Aquests resultats podrien ser indicatius que tant l'isoenzim PFKFB3 com PFKFB2 podrien estar participant en l'increment de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en resposta a insulina durant els primers minuts. Tot i que després a temps més llargs, el gen PFKFB2 no estigui modulats per l'efecte de la insulina com s'havia demostrat a la **Figura R-1**.



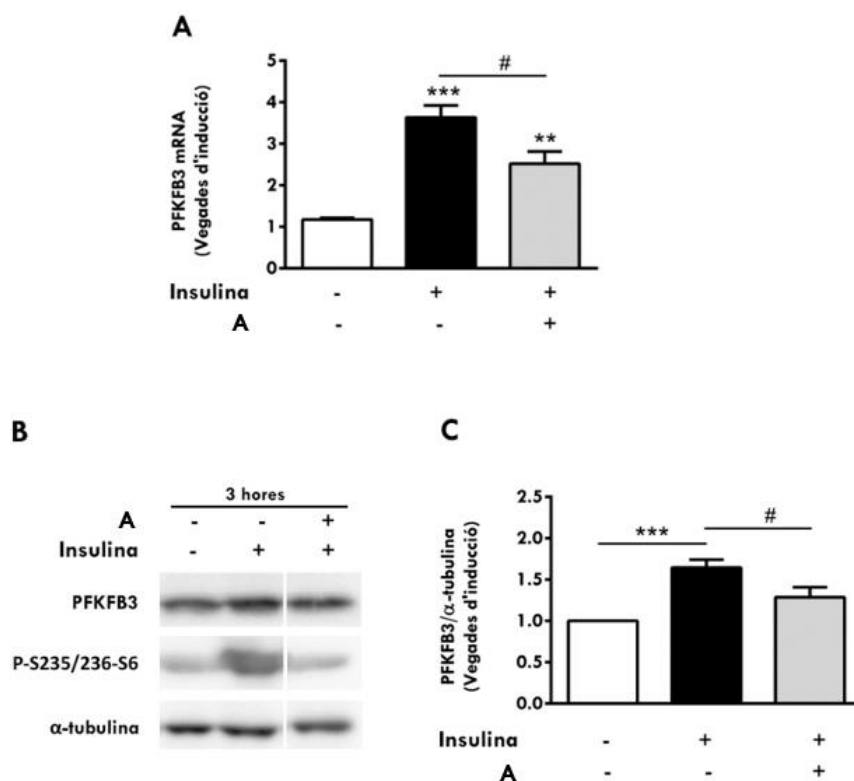
**Figura R-6.** Participació de l'isoenzim PFKFB3 i PFKFB2 en l'augment de Fru-2,6-P<sub>2</sub> a temps curts en resposta a insulina en cèl·lules HT29. El peu de figura continua a la pàgina següent.

**Figura R-6. Participació de l'isoenzim PFKFB3 i PFKFB2 en l'augment de Fru-2,6-P<sub>2</sub> a temps curts en resposta a insulina en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules, transfectades amb siRNA de PFKFB3 i/o PFKFB2 a una concentració de 75 nM durant 72 hores, van ser tractades amb insulina (1 μM) durant 30 minuts, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores. Com a control es va utilitzar un siRNA inespecífic (scramble). **A)** Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs α-tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents ± SEM de cada condició (p<0.001, \*\*\*; per les condicions tractades amb insulina respecte a la condició control; p<0.01, ##; p<0.001, ###; per les condicions tractades amb insulina en les cèl·lules transfectades amb siRNA de PFKFB3 i/o PFKFB2 respecte a les tractades només amb insulina en les cèl·lules transfectades amb scramble, determinat pel test t-Student).

## 2.3 Regulació transcripcional de PFKFB3 per insulina

Apart d'aquest mecanisme de regulació de PFKFB3 per insulina a temps curts, vam continuar amb l'estudi del mecanisme d'activació gènica de PFKFB3 en resposta a insulina amb l'objectiu de, per una banda, estudiar la via que pot participar en la regulació transcripcional del gen PFKFB3 i, per altra banda, determinar el factor de transcripció directament responsable de l'activació de la transcripció del gen de PFKFB3.

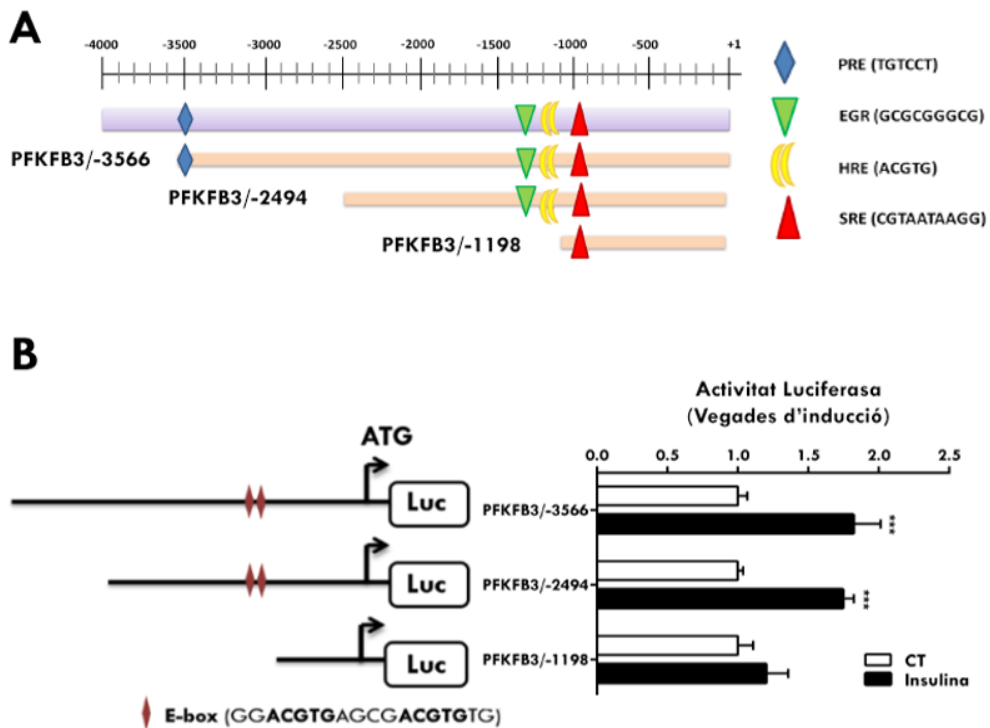
Per dur a terme aquest primer objectiu vam estudiar si la via de PI3K/Akt, la qual hem vist en els resultats anteriors que s'activa en resposta a insulina en el nostre model cel·lular, podia estar implicada en la regulació transcripcional del gen PFKFB3 en resposta a aquesta hormona. Per això, vam pretractar les cèl·lules amb l'inhibidor específic d'Akt Akti-1/2 (Akti) i després vam estimular les cèl·lules amb insulina durant tres hores. Com es pot observar a la **Figura R-7**, la inhibició d'Akt redueix de forma significativa l'increment del mRNA (**Figura R-7A**) i també de la proteïna PFKFB3 (**Figura R-7B i C**). Com a control del bloqueig de la via d'Akt s'ha utilitzat un dels seus substrats, la proteïna S6 que es mostra no fosforilada en presència d'Akti-1/2 (**Figura R-7B**). Aquests resultats serien indicatius de la participació de la via de PI3K/Akt en l'activació de la transcripció del gen de PFKFB3 en resposta a insulina en el model d'HT29. No obstant, no es pot descartar que hi hagi alguna altra via implicada en la regulació transcripcional ja que la inhibició de la via d'Akt no reverteix completament la inducció de PFKFB3.



**Figura R-7. Efecte de la inhibició de la via d'Akt sobre la regulació transcripcional de PFKFB3 a temps llargs en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades durant 30 minuts amb Akti-1/2 (A) (10  $\mu$ M) i tractades amb insulina (1  $\mu$ M) durant 3 hores. **A)** RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per PFKFB3. La sonda TBP es va utilitzar com a control endogen. **B)** Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **C)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de les proteïnes indicades. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.01$ , \*\*,  $p < 0.001$ , \*\*\*; per les condicions tractades amb insulina respecte a la condició control;  $p < 0.05$ , #; per les condicions tractades amb insulina i Akti respecte a les tractades només amb insulina, determinat pel test t-Student).

En aquest punt, vam iniciar l'abordatge per tal de trobar un factor de transcripció, que en resposta a aquesta activació de la via d'Akt, fos responsable directe de la regulació transcripcional de PFKFB3 per insulina.

Per dur a terme aquest objectiu, primerament vam procedir a discernir la regió mínima promotora necessària per aquesta resposta transfectant de manera transitòria les cèl·lules HT29 amb diferents construccions obtingudes a partir de fragments amb deleccions creixents del promotor humà de PFKFB3 clonats en un vector d'expressió luciferasa pGL2basic del que disposem al laboratori (Obach et al., 2004). El vector d'expressió  $\beta$ -galactosidasa el vam utilitzar per normalitzar les eficiències de transfecció. L'activitat luciferasa dels fragments de promotor transfectats la mesuràvem 16 hores després del tractament amb insulina, amb un dejuni de sèrum previ de 24 hores de les cèl·lules. Com es pot observar a la **Figura R-8**, les construccions PFKFB3/-3566 i PFKFB3/-2494 van respondre al tractament d'insulina ja que en aquests casos podem observar un increment significatiu en l'activitat luciferasa respecte a la condició control. En canvi, la construcció PFKFB3/-1198 no va mostrar diferències en l'activitat luciferasa en resposta al tractament amb insulina amb la condició control.



**Figura R-8.** Efecte de la insulina sobre el promotor de PFKFB3 humà en cèl·lules HT29. El peu de figura continua a la pàgina següent.

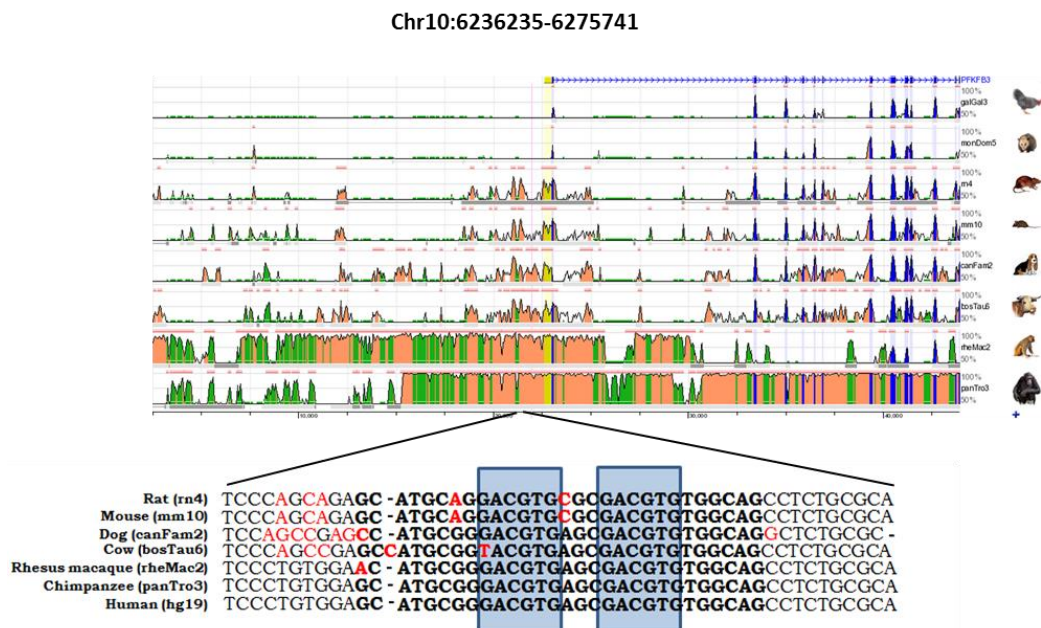


**Figura R-8. Efecte de la insulina sobre promotor de PFKFB3 humà en cèl·lules HT29.** A) Representació del promotor humà de PFKFB3 amb les diferents construccions del promotor que es van utilitzar. B) Determinació de l'activitat luciferasa de cèl·lules, transfectades de manera transitòria amb diferents construccions del promotor humà de PFKFB3, tractades amb insulina (1  $\mu$ M). L'activitat luciferasa va ser mesurada després de 16 hores del tractament. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control de cada construcció. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).

Aquests resultats ens indiquen que la seqüència que es troba entre el fragment de -2494 i -1198 nucleòtids relatiu a l'inici de la transcripció a la regió 5' del promotor humà de PFKFB3 hauria de contenir l'element d'unió per algun factor de transcripció en resposta al tractament amb insulina.

Just per aquesta regió, en el nostre grup s'havien descrit dues seqüències amb un 95% de similitud a caixes *E-box* (CACGTG), localitzades entre els nucleòtids -1279 o -1288 del promotor humà de PFKFB3, com a llocs d'unió del factor HIF-1 $\alpha$  (factor de transcripció induïble per hipòxia 1) (ACGTG) en resposta a hipòxia (Obach et al., 2004) anomenades HRE (elements de resposta a hipòxia).

A continuació, un anàlisi d'aquesta regió del promotor de PFKFB3 mitjançant el programa ECR (*Evolutionary Conservation Region*) Browser, el qual és un buscador de regions evolutivament conservades, ens va permetre comprovar que aquesta seqüència de 29nt es troba altament conservada entre rata, ratolí, gos, vaca, mono, ximpanzé i humà (**Figura R-9**).



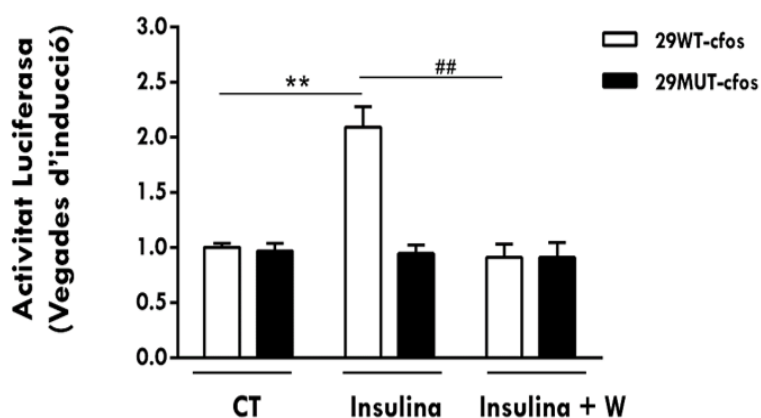
**Figura R-9. Anàlisi de la conservació evolutiva del promotor de PFKFB3 mitjançant el programa ECR Browser.** A la imatge es mostra la seqüència de 29nt (en negreta), que es troba entre els nucleòtids -1269 - 1297 relatiu a l'inici de transcripció del promotor humà de PFKFB3, alineada amb les seqüències de PFKFB3 de rata, ratolí, gos, vaca, mono ximpanzé. Les caixes *E-box* estan marcades dins dels quadres blaus.

Tenint en compte això, vam delimitar la zona d'estudi a aquestes dues caixes *E-box* per si alguna d'aquestes seqüències podria estar també directament implicada en la resposta del promotor de PFKFB3 a insulina. Per això, vam fer ús de les dues construccions que s'havien utilitzat en l'estudi de la resposta a hipòxia del nostre laboratori, les quals contenien 29 nucleòtids al voltant de la regió entre -1269 i -1297 respecte a l'inici de la transcripció a la regió 5' del promotor humà de PFKFB3 i estaven clonades en un vector d'expressió luciferasa amb una unitat mínima promotora del gen *c-fos*. Una de les construccions era la 29WT-*cfos* (5'-GCATGCGGGACGTGACGCACGTGTGGCAG-3') i l'altra la 29Mut-*cfos*, a la qual se li havien incorporat dues mutacions a la seqüència d'unió a HIF (5'-GCTGCGGGAATTGACGCAATTGTGGCAG-3'). Aquestes dues construccions es van transfectar transitòriament a les cèl·lules HT29 i es van estimular amb insulina. En els

casos indicats, les cèl·lules es van pretractar amb l'inhibidor de l'activitat de PI3K, wormanina. Els resultats mostren que la construcció 29WT-cfos presenta un augment significatiu de l'activitat luciferasa quan les cèl·lules eren estimulades amb insulina respecte a la condició control. A més, aquesta inducció s'inhibia amb l'ús de wormanina. En canvi, en la construcció 29Mut-cfos no s'observen diferències en l'activitat luciferasa entre les diferents condicions (**Figura R-10**).

29WT-cfos: 5'-GCATGCGGG**ACGTGAGCGACGTG**TGGCAG-3'

29MUT-cfos: 5'-GCATGCGGGA**AATTGAGCGAATTG**TGGCAG-3'

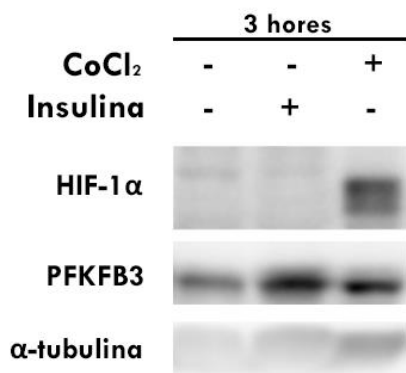


**Figura R-10. Efecte de la insulina sobre una construcció de 29 nucleòtids del promotor humà de PFKFB3 en cèl·lules HT29.** Determinació de l'activitat luciferasa de cèl·lules transfectades de manera transitòria amb la construcció 29WT-cfos o 29MUT-cfos del promotor humà de PFKFB3, pretractades amb wormanina (W) (10  $\mu$ M) durant 30 minuts, en els casos indicats, i tractades amb insulina (1  $\mu$ M). L'activitat luciferasa va ser mesurada després de 16-18 hores del tractament. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control de cada construcció. Les dades es presenten com a mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.01$ , \*\*, per les condicions tractades amb insulina respecte a la condició control;  $p < 0.01$ , ##; per les condicions tractades amb insulina i wormanina respecte a les tractades només amb insulina, determinat pel test t-Student).

Per tant, aquests resultats ens indiquen que a les dues *E-box*, presents entre els nucleòtids -1269 i -1297 del promotor humà de PFKFB3, s'ha d'unir algun factor de transcripció i que aquest participa en la regulació transcripcional del gen PFKFB3 en resposta a insulina.

Llavors, a continuació vam analitzar *in silico* quin factor de transcripció podria unir-se a aquestes seqüències utilitzant seqüències consens de DNA de les bases de dades TRANSFAC o JASPAR. D'entre els factors trobats que comparteixen llocs d'unió amb aquestes *E-boxes*, ens vam centrar en els factor de transcripció HIF-1 $\alpha$  ([A/G]CGTG) i SREBP-1c (CACGTG).

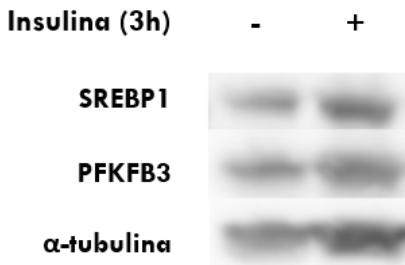
En primer lloc, vam analitzar si HIF-1 $\alpha$  estava implicat en la inducció del gen PFKFB3 per la insulina, ja que, com s'ha comentat anteriorment, aquest factor ja s'ha descrit com a modulador de la transcripció de PFKFB3 en situacions d'hipòxia. Per això, vam analitzar si el tractament de les cèl·lules amb insulina es correlacionava amb la presència de HIF-1 $\alpha$ . Els resultats per Western Blot de la **Figura R-11** mostren que la insulina produeix un augment de la proteïna PFKFB3 a les 3 hores de tractament, en canvi no detectem HIF-1 $\alpha$ . Com a control positiu de l'augment d'aquesta proteïna, vam tractar les cèl·lules amb CoCl<sub>2</sub>, el qual és un agent químic que mimetitzava l'efecte de la hipòxia fisiològica, ja que prèviament s'havia descrit que en resposta a aquest tractament s'observa acumulació de la subunitat HIF-1 $\alpha$  (Obach et al., 2004).



**Figura R-11. Efecte de la insulina sobre el factor de transcripció HIF-1 $\alpha$ .** Les cèl·lules HT29, prèviament dejunades de sèrum durant 24 h, van ser tractades amb insulina (1  $\mu$ M) o CoCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ M) durant 3 h. Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega.

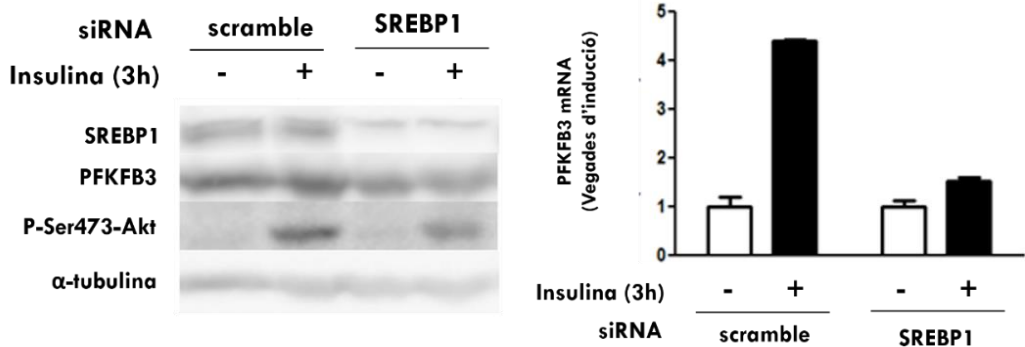
A continuació, donat que SREBP-1c és un factor transcripció involucrat en l'activació de gens a través la via de senyalització de la insulina (Azzout-Marniche et al., 2000; Dif et al., 2006; Ferré et al., 2001), vam voler avaluar l'efecte directe de SREBP1 sobre l'expressió de PFKFB3.

En la mateixa línia vam poder detectar la presència de proteïna SREBP1 incrementada per western blot en resposta a insulina (**Figura R-12**), i tot seguit ens vam centrar en inhibir SREBP-1c amb un siRNA específic.



**Figura R-12. Efecte de la insulina sobre el factor de transcripció SREBP1.** Les cèl·lules HT29, prèviament dejunades de sèrum durant 24 h, van ser tractades amb insulina (1  $\mu$ M) durant 3 h. Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega.

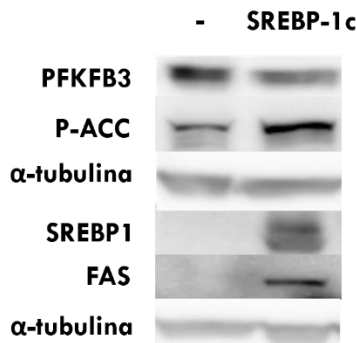
La transfecció amb un siRNA de SREBP1 va disminuir els nivells de proteïna i de mRNA de PFKFB3 en resposta a insulina respecte a la transfecció amb un siRNA control (scramble), suggerint que SREBP1 podria estar implicat en la regulació de PFKFB3 per aquesta hormona en cèl·lules HT29 (**Figura R-13**).



**Figura R-13 Efecte de la silenciació de SREBP1 en al inducció de PFKFB3 per insulina en cèl·lules HT29.** El peu de figura continua a la pàgina següent.

**Figura R-13. Efecte de la silenciació de SREBP1 en al inducció de PFKFB3 per insulina en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules van ser transfectades amb un siRNA de SREBP1 a 25 nM durant 72 hores i posteriorment estimulades amb insulina (1  $\mu$ M) durant 3 h. **A)** Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per PFKFB3. La sonda TBP es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control (n=2).

El següent pas va ser estudiar l'efecte de la sobreexpressió exògena del factor de transcripció SREBP-1c en la inducció de PFKFB3. Es volia observar si aquesta sobreexpressió podia produir uns efectes estimuladors sobre l'expressió proteica de PFKFB3 semblants a aquells observats sota el tractament amb insulina. En els resultats preliminars de la **Figura R-14** podem observar que els nivells de PFKFB3 no augmenten quan sobreexpressem aquest factor. Com a control positiu de que la sobreexpressió de SREBP-1c doni lloc a una proteïna funcional, vam analitzar la proteïna FAS (*Fatty Acid Synthase*) i ACC (*Acetyl-Coa carboxylase*) fosforilada que s'han descrit com a gens diana de SREBP-1c (Horton, 2002), i podem observar que els nivells d'ambdues proteïnes es veu augmentada en presència d'aquest factor.



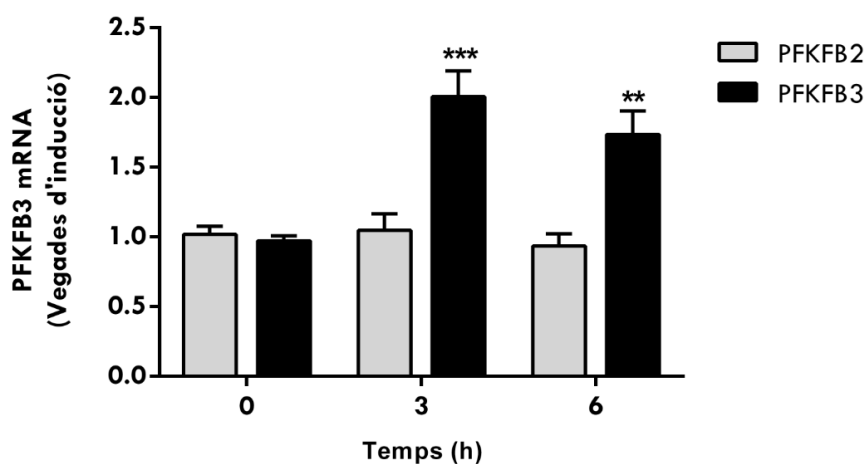
**Figura R-14. Efecte de la sobreexpressió de SREBP-1c en la inducció de PFKFB3 per insulina en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules van ser transfectades durant 24 hores amb 2  $\mu$ g del vector d'expressió de SREBP-1c. Com a control es va utilitzar un vector d'expressió de GFP. Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega (n=2).

Donat que l'efecte de SREBP-1c sobre PFKFB3 hauria de ser transcripcional, ens mancarien resultats de RT-qPCR de PFKFB3 en condicions de sobreexpressió de SREBP-1c.

Tot i que aquests últims resultats no permeten confirmar la regulació directa de PFKFB3 per SREBP-1c, encara no podem descartar totalment la implicació d'aquest factor en

aquesta regulació. A més, s'ha descrit que els SREBPs poden cooperar amb altres factors de transcripció i co-activadors necessaris per a l'activació transcripcional d'altres gens com són NF- $\kappa$ B, CREB, Sp1, CBP/p300, entre d'altres (Edwards et al., 2000; Lin et al., 2005; Toth et al., 2004).

Finalment, com entre els factors que activen la via de la insulina hi ha el factor IGF-I, vam intentar analitzar per RT-qPCR la resposta de PFKFB3 a aquest factor per tal de veure si reproduïa els resultats obtinguts amb insulina. A la **Figura R-15** podem observar com l'estimulació amb IGF-1 dóna lloc a un increment significatiu dels nivells de mRNA de PFKFB3 a partir de les 3 hores i es manté també a les 6 hores. Alhora, vam analitzar si en resposta a aquest factor es modulava la PFKFB2. Els resultats obtinguts mostren que a nivell transcripcional PFKFB2 no s'indueix en resposta a IGF-I en les cèl·lules HT29.



**Figura R-15. Efecte de l'IGF-I sobre l'expressió dels gens PFKFB3 i PFKFB2 en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 h, van ser tractades amb IGF-I (100 ng/ml) en els temps indicats. RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per PFKFB3 i PFKFB2. La sonda TBP es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.01$ , \*\*,  $p < 0.001$ , \*\*\*, determinat pel test t-Student).

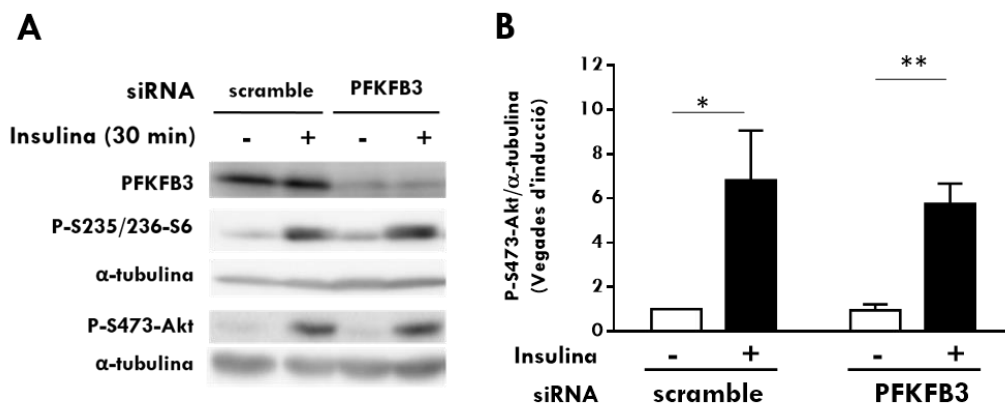
## 2.4 Efecte de la inhibició de PFKFB3 sobre la via d'Akt

Recentment, s'ha publicat un article en el qual relacionen PFKFB3 i el metabolisme de la glucosa amb la via de la insulina/IGF-I (Trefely et al., 2015). En aquest estudi identifiquen diferents quinases, entre les quals es troba PFKFB3, que regulen de forma positiva o negativa la via de PI3K/Akt. Observen que la inhibició de la via glicolítica a diferents nivells, incloent la inhibició de PFKFB3 de forma farmacològica o mitjançant siRNA, afecta de forma paral·lela a la senyalització d'Akt en adipòcits 3T3-L1 en resposta a insulina. En aquest model d'adipòcits, els quals presenten una elevada expressió de PFKFB3, es suggereix que l'augment del flux glicolític en resposta a insulina potenciarà l'activació de la via de la insulina, concretament a nivell d'Akt, afavorint la captació de glucosa per GLUT4.

En el nostre model d'HT29, hem demostrat que la via de la insulina està implicada en la regulació de l'activitat de PFKFB3, ja que observem un augment de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat en resposta a insulina. És per això que ens vam plantejar si també existia una regulació en l'altra sentit, com en el que descriuen a l'article, és a dir, que, en un inici la senyal de la insulina activaria a PFKFB3 i a la vegada aquesta activació seria la responsable d'una retroalimentació positiva de la via de la insulina.

Per tant, vam estudiar l'efecte de la inhibició de PFKFB3 sobre l'activació d'Akt. Primer vam analitzar els experiments de silenciament de PFKFB3. Com es pot observar a la **Figura R-16**, el siRNA de PFKFB3 efectivament redueix els nivells de la seva proteïna, en canvi, aquesta silenciament no afecta a la fosforilació d'Akt ni a la de S6 en resposta a insulina.



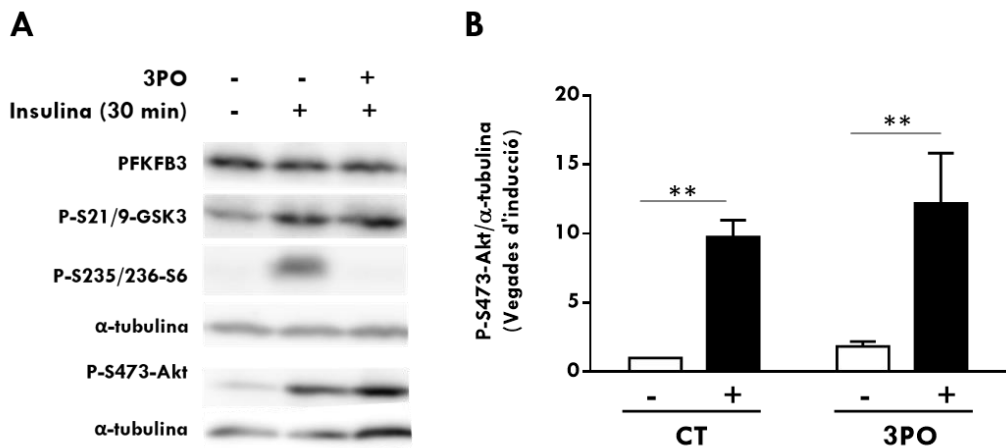


**Figura R-16. Efecte de la silenciació de PFKFB3 sobre l'activació de la via d'Akt en resposta a insulina en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules van ser transfectades amb siRNA de PFKFB3 a una concentració de 75 nM durant 72 h. Com a control es va utilitzar un siRNA inespecífic (scramble). Un cop dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb insulina (1 μM) durant 30 minuts. **A)** Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs α-tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica d'Akt fosforilat a la Ser473. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents ± SEM de cada condició (p<0.05, \*; p<0.01, determinat pel test t-Student).

En el mateix article de Trefely i col·laboradors també mostren que la incubació de les cèl·lules 3T3-L1 amb l'inhibidor farmacològic de PFKFB3 3PO bloqueja l'activitat d'Akt, ja que observen una disminució de la fosforilació dels seus substrats GSK3 i S6 en resposta a insulina. En el nostre cas, una inhibició similar en presència de 3PO en cèl·lules HT29 no inhibeix la fosforilació d'Akt ni tampoc la del seu substrat GSK3 després del tractament amb insulina (**Figura R-17**), indicant que no existeix aquesta regulació en forma de retroalimentació positiva de la glicòlisi sobre la via de la insulina en les cèl·lules HT29.

En canvi, la presència de 3PO sí que inhibeix la fosforilació de la proteïna S6 per insulina. Això últim es podria explicar pel fet de que s'ha descrit que en presència de 3PO, com que inhibeix l'activitat de PFKFB3, es redueix la captació de glucosa a causa de la disminució de la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> que inhibeix la PFK-1, augmentant llavors la

concentració de Fru-6-P, la qual es troba en equilibri amb la Glu-6-P i aquesta inhibeix a l'HK, que és necessària per la captació de glucosa (Gregoriou et al., 1981). Per tant, la inhibició de l'activitat de PFKFB3 dóna lloc a un estrès metabòlic, semblant al que es dóna en un estat de privació de glucosa, que, consegüentment, activa l'autofàgia com a via de supervivència per activació de l'AMPK, ja que els nivells d'ATP disminueixen, inhibint a mTORC1 i per tant la fosforilació de S6 (Klarer et al., 2014). Llavors per saber si en el nostre model i en aquestes condicions el 3PO causa els mateixos efectes hauríem d'analitzar amb més detall l'efecte del 3PO en la glicòlisi com també en l'activació de l'autofàgia.



**Figura R-17. Efecte de la inhibició de PFKFB3 amb 3PO sobre l'activació de la via d'Akt en resposta a insulina en cèl·lules HT29.** Les cèl·lules, un cop dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pre-tractades amb 3PO (10  $\mu$ M) durant 30 minuts i, posteriorment, tractades amb insulina (1  $\mu$ M) durant 30 minuts. **A)** Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica d'Akt fosforilat a la Ser473. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.05$ , \*;  $p < 0.01$ , determinat pel test t-Student).

Apart, però, en els resultats obtinguts dels experiments de silenciació de la **Figura R-6** vam demostrar que l'augment de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> en resposta a insulina a temps curts era degut tant a l'activitat de PFKFB3 com de PFKFB2. Per tant, si el 3PO inhibeix específicament a PFKFB3, encara tindriem activa la glicòlisi per part de la PFKFB2 quan les cèl·lules son tractades amb insulina, i llavors no tindria lloc la disminució de la captació de glucosa que activaria l'autofàgia. En aquest últim any s'ha publicat un article on qüestionen l'especificitat del 3PO per la PFKFB3 (Houddane et al., 2017), que també podria estar al darrera d'una explicació per als nostres resultats.

### 3. Discussió

Resultats anteriors del grup realitzats per Lluís Riera havien demostrat la inducció de l'expressió de PFKFB3 en diferents línies cel·lulars en resposta a insulina. En aquest capítol, hem volgut profunditzar en l'estudi dels mecanismes moleculars que regulen la seva expressió en les cèl·lules d'adenocarcinoma de còlon humà HT29 en resposta a insulina.

Prèviament, Denis-Pouxviel i col·laboradors havien demostrat que l'augment del flux glicolític i de l'activitat quinasa de la PFKFB3 en cèl·lules HT29 tractades amb insulina depenia de la transcripció i síntesi proteica de PFKFB3 (Denis-Pouxviel et al., 1990). Posteriorment, al nostre laboratori es va demostrar que l'augment dels nivells de mRNA i proteïna de PFKFB3 per insulina en aquestes cèl·lules era degut a la transcripció directa del gen i a la síntesi *de novo* de proteïna, tot i que no es podia descartar la necessitat de la síntesi d'alguna altra proteïna intermediària en la inducció del gen missatger, ja que la inhibició de la síntesi proteica produïa una disminució de la inducció del mRNA de PFKFB3 per insulina (Riera et al., 2002).

Els resultats obtinguts en aquest primer capítol mostren que la insulina augmenta l'expressió del mRNA de PFKFB3 en la línia cel·lular HT29, obtenint un pic a les 3 hores de tractament, i sense modular l'expressió de les altres isoformes de PFKFB. A més, els nivells de proteïna de PFKFB3 augmenten de forma paral·lela als nivells de mRNA. Aquest increment de proteïna, a partir de les 3 hores, és el responsable de l'augment de la concentració intracel·lular de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat a temps llargs. En canvi, a temps curts, és a dir, al voltant dels 30 minuts, l'augment d'aquests metabòlits ve donat per una modificació post-traducciona de la proteïna PFKFB3, per fosforilació a la Serina 461, i de la PFKFB2, per fosforilació a la Serina 466 i a la Serina 483.

En aquesta regulació post-traducciona de PFKFB3 i PFKFB2 per insulina està implicada la via de PI3K/Akt, ja que la inhibició d'aquesta via evita la fosforilació dels dos isoenzims en resposta a aquesta hormona.

S'ha descrit que Akt fosforila la PFKFB2 *in vitro*, a la Ser466 i Ser483, activant així l'enzim mitjançant l'increment de la seva  $V_{max}$  i l'afinitat per un dels seus substrats, la fructosa-6-fosfat. A més, la via de PI3K participa en l'activació de PFKFB2 ja que l'ús de l'inhibidor de la PI3K wormanina inhibeix l'augment de l'activitat quinasa (Deprez et al., 1997). Malgrat que en aquest darrer article proposaven a Akt (PKB) com a efectora de la resposta a insulina, l'any 1999 Bertrand i col·laboradors van demostrar que, tot i que PI3K participa en la fosforilació en resposta a insulina de PFKFB2, Akt no era necessària (Bertrand et al., 1999), i en canvi es suggeria un paper per PDK-1. Posteriorment, s'ha demostrat que la responsable de la fosforilació i activació de la PFKFB2 ha de ser una proteïna quinasa de la via de senyalització per insulina per sota de PDK-1, diferent de PKB, SGK i PKC $\zeta$  (Deprez et al., 2000).

Resultats previs del nostre laboratori mostren la fosforilació de l'isoenzim PFKFB3 per la quinasa Akt *in vitro*, donant lloc a un augment de l'activitat PFK-2 (Novellademunt 2012, tesi doctoral). Encara que no hem demostrat que Akt és la quinasa responsable de la fosforilació de PFKFB3 en resposta a insulina, segons els nostres resultats possiblement ha de ser alguna quinasa de la via de PI3K/Akt.

Apart d'aquesta regulació de la proteïna de PFKFB3 a temps curts, hem demostrat que el gen de PFKFB3 es regula a nivell transcripcional, ja que la transfecció transitòria de diferents fragments del promotor humà de PFKFB3, clonats en un vector d'expressió luciferasa, va donar lloc a un augment de l'activitat luciferasa en resposta a insulina. A més, aquests experiments també ens van permetre delimitar la regió del promotor responsable de la inducció de PFKFB3. En aquesta regió, prèviament en el nostre laboratori, ja s'havien descrit la presència de dues seqüències amb un 95% de similitud a caixes *E-box*, localitzades entre els nucleòtids -1269 i -1297 relatiu a l'inici de transcripció, a les quals s'uneix el factor de transcripció HIF-1 $\alpha$  en resposta a hipòxia induint la transcripció de PFKFB3 (Obach et al., 2004). En els resultats que acabem de presentar en aquest capítol, s'ha demostrat de manera clara la participació d'aquestes *E-boxes* en la resposta a insulina i la implicació indirecta de la via de senyalització d'Akt.

Aquests mateixos resultats es van contrastar en paral·lel amb resultats similars no publicats del nostre grup obtinguts amb la línia cel·lular Hela (Novellademunt 2012, tesi doctoral). Posant de manifest que els resultats de regulació de PFKFB3 seria un comportament de resposta habitual de línies tumorals diferents, com càncer de còlon i càncer de cèrvix.

Els factors de transcripció SREBPs, a part de reconèixer i unir-se a seqüències SRE (*Sterol Regulatory Elements*) (5'-TCACNCCAC-3') o seqüències relacionades, també poden unir-se a les *E-boxes*, preferentment a la seqüència 5'-CACGTG-3' (Osborne, 2000; Vallett et al., 1996). Aquests són membres de la família de factors bHLH implicats en l'estimulació transcripcional per insulina de gens lipogènics i de la glucoquinasa de fetge. A més, la via de PI3K s'ha relacionat amb la inducció de SREBPs per insulina (Sul et al., 2000). En aquest sentit, s'ha descrit que en hepatòcits de rata tractats amb insulina, a través de l'activació de la via de PI3K, incrementen els nivells del precursor de SREBP-1c al reticle endoplasmàtic fent que incrementin ràpidament els nivells de SREBP-1c madur al nucli (Azzout-Marniche et al., 2000).

Tot i que no hem pogut corroborar la implicació directa del factor SREBP-1c amb aquestes seqüències *E-box*, ja que ens faltaria fer més rèpliques per obtenir resultats estadísticament significatius dels experiments de silenciament, com també, per tal de verificar la unió directa de SREBP-1c a les dues caixes *E-box* del promotor de PFKFB3, caldria fer experiments de precipitació d'oligonucleòtids i experiments d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) per confirmar que aquesta seqüència forma un complex amb el factor de transcripció SREBP-1c *in vitro* i *in vivo*, respectivament. Restaria, doncs, també concretar el possible paper i/o la vinculació d'altres factors que s'han vist augmentats en línies tumorals en resposta a insulina, com el factor myc-1, en la resposta transcripcional de PFKFB3.

Respecte als resultats publicats recentment per Trefely i col·laboradors en el model d'adipòcits 3T3-L1 (Trefely et al., 2015), destacar que per comparació amb els mateixos experiments realitzats en el nostre model tumoral d'HT29, aquells serien un model de regulació molt concret d'un tipus cel·lular i que no semblaria un comportament extrapolable en les línies tumorals. Tot i que en tots els models provats fins al moment sembla clara la relació de la via de senyalització d'Akt amb PFKFB3.



## Capítol 2:

# Regulació de PFKFB<sub>3</sub> per TGF- $\beta$ 1 en les cèl·lules de glioblastoma multiforme T98G

---





## 1. Introducció

TGF- $\beta$  pertany a una superfamília de factors de creixement formada per més de 30 membres en humans, juntament amb activines, inhibines, BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*), MIS (*Mullerian Inhibiting Substance*), nodal i GDFs (*Growth and Differentiation Factors*) (Shi and Massagué, 2003).

TGF- $\beta$  és una citoquina multifuncional (pleiotròpica), ja que controla nombrosos processos cel·lulars com és la proliferació, diferenciació, producció de matriu extracel·lular, migració, adhesió, organització del citoesquelet, homeòstasi i mort depenen del tipus cel·lular (Fabregat et al., 2014; Han et al., 2015; Massagué, 2008).

### 1.1 Via de senyalització de TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  funciona com una proteïna reguladora que transmet la seva funció des de la superfície cel·lular al nucli a través de la transducció de senyals moleculars. La via de senyalització de TGF- $\beta$ , explicada amb més detall en l'apartat d'introducció de la tesi, es dona principalment a través de la via de Smads (via canònica), però també pot activar vies independent de Smads (vies no canòniques) (Aigner and Bogdahn, 2008; Dennler et al., 2002; Massagué, 2000). L'activació d'aquestes vies depèn del context i del tipus cel·lular i la integració d'aquestes és el que determina les respostes cel·lulars del TGF- $\beta$  (Principe et al., 2014) (**Figura 22**).

#### **Via canònica/Smad**

La forma activa del TGF- $\beta$ , constituïda per un dímer de dues subunitats idèntiques unides generalment per ponts disulfur, primer s'uneix al T $\beta$ RII, el qual fosforila el domini ric en glicina/serina del T $\beta$ RI, activant l'activitat quinasa d'aquest i donant lloc a un complex heterotetramèric constituït per dos T $\beta$ RI i dos T $\beta$ RII (Wrana et al., 1994). Un cop

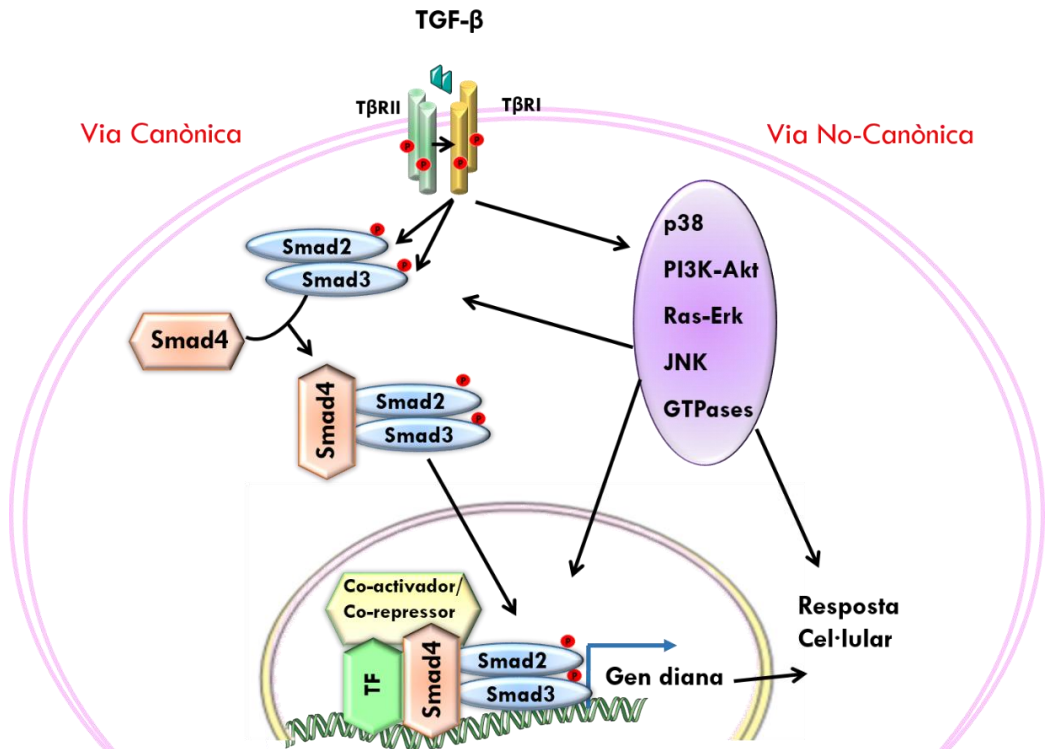
format el complex, el T $\beta$ RI recluta i fosforila les R-Smads (Smad2 i Smad3), a la seqüència pSer-X-pSer que es troba a l'extrem C-terminal. Aquesta fosforilació permet la formació d'un complex entre les R-Smads juntament amb la Co-Smad (Smad4) que es transloca del citoplasma al nucli a on interacciona amb proteïnes Co-reguladores i altres factors per regular la transcripció dels gens diana com Id1, Id3, fibronectina, PAI-I, entre d'altres (Massagué, 2000).

Un cop al nucli, tant les Co-Smads com les R-Smads poden unir-se directament al DNA, amb l'excepció d'una variant de *splicing* alternatiu de Smad2. El domini MH1 reconeix regions riques en GC i la seqüència anomenada SBE (*Smad Binding Element*) formada per seqüències repetides de GTCT o de la complementària reversa AGAC. Però, com que aquesta unió de les Smads amb el DNA és de baixa afinitat, dèbil i poc selectiva, les Smads generalment depenen de les interaccions amb altres proteïnes específiques (factors de transcripció), les quals presenten una alta afinitat pel DNA, aportant especificitat per actuar sobre els gens diana. Un cop les Smads, juntament amb les altres proteïnes, s'han unit al DNA, aquestes recluten proteïnes Co-reguladores per promoure o inhibir la transcripció depenent del context, com són els co-activadors o co-repressors (Weiss and Attisano, 2013).

Les diverses combinacions de R-Smad/Co-Smad/Co-factor permet la regulació d'un gran nombre de gens diana i, en part, explica que les respostes siguin específiques del tipus cel·lular ja que cadascun d'aquests presenta una expressió diferencial dels reguladors (Meulmeester and ten Dijke, 2011).

### **Vies no canòniques/independents de Smad**

Entre les vies no canòniques activades per TGF- $\beta$  trobem les MAPK (p38, Erk i JNK), PI3K/Akt, GTPases tipus Rho, entre d'altres (Moustakas and Heldin, 2005; Weiss and Attisano, 2013; Zhang, 2009). S'ha descrit que els T $\beta$ RI i T $\beta$ RII, a part d'actuar com a serina/treonina quinases, presenten una especificitat dual, sent capaces de fosforilar residus de tirosina (Weiss and Attisano, 2013; Zhang, 2009).



**Figura 22. Representació esquemàtica de la via de senyalització de TGF- $\beta$ .** Figura adaptada de (Ikushima and Miyazono, 2010), (TF: Factor de transcripció).

### Interacció entre la via canònica i les vies no canòniques

Diferents estudis descriuen la interacció entre els diferents membres de les vies de senyalització de MAPK i les proteïnes Smad. S'ha descrit que moltes de les vies no canòniques funcionen juntament amb les Smads estimulants les respostes de TGF- $\beta$ . Per exemple, l'activació induïda per TGF- $\beta$  de la via de Erk pot produir la fosforilació de Smad2 i per tant regular la seva activació (Funaba et al., 2002). A més, l'activació de MAPKs per TGF- $\beta$  pot afectar a nivell de transcripció a través de l'activació de factors de transcripció que interactuen amb el complex Smad al nucli (Moustakas and Heldin, 2005).

La translocació de les R-Smads i la unió al DNA també pot ser regulada per la fosforilació per part de les MAPK de residus de serina que es troben a la regió *linker* de les R-Smads (Shi and Massagué, 2003; Wicks et al., 2000; Wrighton et al., 2009). Aquesta fosforilació pot inhibir la funció de les Smads evitant l'acumulació al nucli d'aquestes o promovent la degradació de les Smads (Kretzschmar et al., 1999; Wicks et al., 2000).

Tot i aquest efecte negatiu de les MAPK sobre la via de TGF- $\beta$ , per la fosforilació a la regió *linker* de les proteïnes Smad, varis estudis de les dues últimes dècades han descrit els diferents efectes de TGF- $\beta$  sobre la via de MAPK i també sobre la via de PI3K. Aquests efectes poden donar-se de forma immediata i transitòria o més tardana en el temps, depenent del tipus cel·lular i de les condicions del cultiu (Takekawa et al., 2002), proposant que l'activació de MAPKs i PI3K complementa i convergeix amb l'activació de les Smads. Per tant, aquesta convergència pot produir cooperativitat d'aquestes vies però també pot passar que una de les vies contraresti l'altra segons el context. Així, l'equilibri entre l'activació directa de Smad i les vies de senyalització MAPK sovint defineix les respostes cel·lulars de TGF- $\beta$ .

### 1.2 TGF- $\beta$ i càncer

Donat que el TGF- $\beta$  regula molts processos cel·lulars com la proliferació, diferenciació i migració, és un factor de gran importància en el control de la tumorigènesi. En cèl·lules epitelials i durant les primeres etapes del tumor TGF- $\beta$  és un factor supressor tumoral important, ja que inhibeix la proliferació i indueix apoptosi. En canvi, en molts altres tipus 4

### 1.2.1 TGF- $\beta$ com a supressor tumoral

TGF- $\beta$  bloqueja vies de supervivència, activa vies de mort cel·lular i indueix diferenciació (Massagué, 2008).

- **Inhibició de la proliferació:** TGF- $\beta$  controla el cicle cel·lular augmentant l'expressió d'inhibidors de ciclines com p15 o p21, les quals inhibeixen les activitats dels complexos ciclina-Cdk donant lloc a una parada del cicle cel·lular. A més a més, també inhibeix l'expressió del oncogèn c-myc, el qual promou la progressió del cicle cel·lular (Siegel and Massagué, 2003).
- **Apoptosi:** TGF- $\beta$  indueix la mort cel·lular mitjançant el bloqueig de senyals de supervivència o l'activació de vies que donen lloc a l'activació de caspases com la DAPK i BIM (Ohgushi et al., 2005; Yang et al., 2002).
- **Diferenciació:** TGF- $\beta$  actua sobre les proteïnes Id1-3 (inhibidores de diferenciació), bloquejant la seva transcripció i contribuint així a la diferenciació cel·lular.

TGF- $\beta$  és un important supressor tumoral ja que molts tumors, especialment gàstrics, pancreàtics i de colon, presenten una freqüència elevada de mutacions que inactiven els receptors i/o les Smads (Bornstein et al., 2009; Elliott and Blobe, 2005; Levy and Hill, 2006).

### 1.2.2 TGF- $\beta$ com a promotor tumoral

TGF- $\beta$  activa vies que donen lloc a l'estimulació de processos d'EMT, mobilitat cel·lular, estimulació de la proliferació cel·lular, angiogènesi, supressió del sistema immune i canvis en l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular. Per exemple:

- TGF- $\beta$  promou la proliferació cel·lular a través de la inducció de PDGF en cèl·lules de glioma i osteosarcoma (Battagay et al., 1990; Bruna et al., 2007; Matsuyama et al., 2003).
- TGF- $\beta$  inhibeix l'apoptosi induint l'expressió del factor de transcripció DEC1 en cèl·lules de carcinoma de mama de ratolí (Ehata et al., 2007).

Hi ha tumors que presenten alts nivells de TGF- $\beta$  i una baixa freqüència de mutacions en la seva via de senyalització, indicant que TGF- $\beta$  presenta un paper important en la progressió tumoral (Fabregat et al., 2014; Ikushima and Miyazono, 2010; Massagué, 2008).

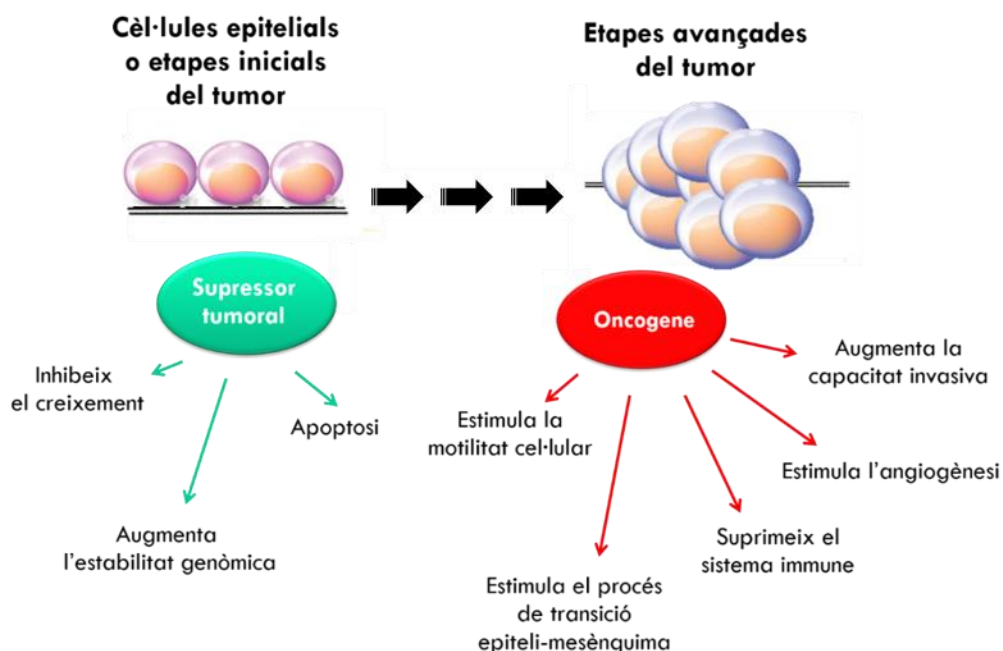


Figura 23. Principals funcions de TGF- $\beta$  en la tumorigènesi.

### 1.3 TGF- $\beta$ i glioblastoma

Els gliomes representen el 80% dels tumors primaris cerebrals malignes (Han et al., 2015) i estan classificats en quatre graus segons l'organització mundial de la salut de 2007: grau I, grau II, grau III i grau IV, (glioblastoma, GB). El glioblastoma és un dels tumors cerebrals més agressius i es caracteritza per presentar una elevada capacitat invasiva i d'angiogènesi, una proliferació aberrant, resistència a la quimioteràpia i radioteràpia i recaiguda després de la cirurgia (Han et al., 2015)

S'ha identificat la via de TGF- $\beta$  com a mediadora en la iniciació i progressió del glioma degut als seus efectes en la proliferació cel·lular, invasió del tumor, angiogènesi, immunosupressió i autorenovació de les cèl·lules mare de glioma (GSCs) (Han et al., 2015; Peñuelas et al., 2009)

Diferents estudis demostren que el TGF- $\beta$ , com també els seus receptors, es troben sobreexpressats en gliomes de grau alt però no en gliomes de menor grau, indicant que l'estimulació de la via de senyalització del TGF- $\beta$  es podria associar amb la progressió dels gliomes (Horst et al., 1992; Samuels et al., 1989; Yamada et al., 1995). Això pot ser atribuït als efectes paracrins del TGF- $\beta$  sobre les cèl·lules epitelials i immunes donant lloc a un augment de l'angiogènesi (Weller and Fontana, 1995). A més, TGF- $\beta$  promou la motilitat de les cèl·lules de glioma (Merzak et al., 1994; Paulus et al., 1995; Platten et al., 2001), i indueix l'expressió de proteïnes de la matriu extracel·lular com col·làgens (Paulus et al., 1995) i el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) (Koochekpour et al., 1996).

## 1.4 TGF- $\beta$ i metabolisme glicolític

Com s'ha comentat a la introducció, les cèl·lules canceroses presenten un augment de la captació de glucosa i de la glicòlisi, si les comparem amb cèl·lules normals (Deberardinis et al., 2008; Gatenby and Gillies, 2004). Un altra fet característic de les cèl·lules canceroses és que presenten una expressió i activació augmentada de TGF- $\beta$ , normalment de TGF- $\beta$ 1 (Wu and Derynck, 2009).

S'ha descrit que TGF- $\beta$  activa la glicòlisi en cèl·lules primàries de ronyó (Nowak and Schnellmann, 1996), fibroblasts (Guido et al., 2012), a més d'estimular la expressió del transportador de glucosa (GLUT1) i la captació de glucosa en diferents tipus cel·lulars (Inoki et al., 1999; Kitagawa et al., 1991) i en cèl·lules de càncer de pàncrees i mama (Li et al., 2010; Liu et al., 2016).



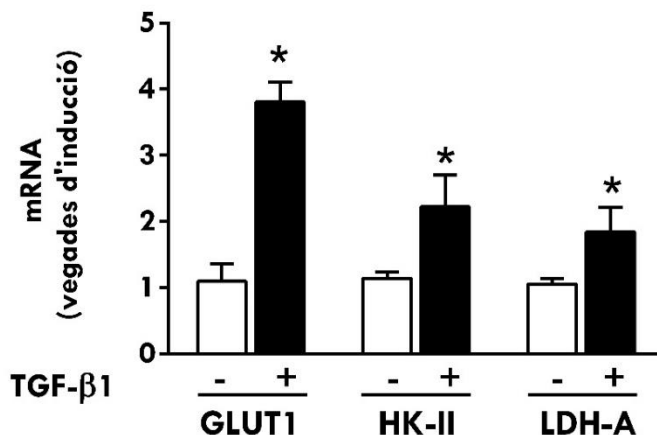
Com un fet característic de les cèl·lules canceroses és que presenten una expressió i activació augmentada de TGF- $\beta$ 1 (Derynck et al., 2001), i molt sovint presenten alts nivells de PFKFB3, vam voler relacionar l'activació de la via de TGF- $\beta$  amb l'augment de la glicòlisi en cèl·lules de glioblastoma, amb l'objectiu final d'avançar en el coneixement dels mecanismes cel·lulars i moleculars implicats.

## 2. Resultats

### 2.1 Inducció de l'expressió de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1

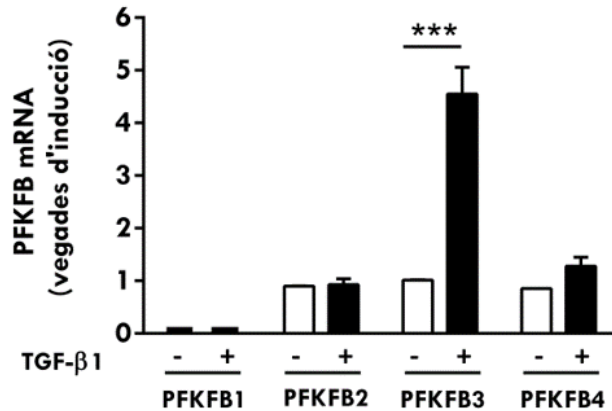
Primerament, vam analitzar l'efecte de TGF- $\beta$ 1 sobre l'expressió de diferents gens que codifiquen per a enzims clau de la via glicolítica en aquest model cel·lular, com són GLUT1, HK-II i LDH-A, responsables del transport de glucosa, de la fosforilació de glucosa i de la producció de lactat, respectivament, ja que com s'ha comentat a la introducció d'aquest capítol, s'ha observat que TGF- $\beta$ 1 indueix l'expressió d'aquests gens en diferents models cel·lulars. Les cèl·lules T98G, prèviament dejunades durant 24 hores, van ser tractades durant 8 hores amb aquest factor. L'expressió del mRNA es va analitzar mitjançant una RT-qPCR utilitzant les sondes humanes específiques per GLUT1, HK-II i LDH-A.

Els resultats mostren que TGF- $\beta$ 1 va augmentar els nivells de mRNA dels tres enzims glicolítics testats, GLUT1, HK-II i LDH-A (**Figura R-18**), suggerint que TGF- $\beta$ 1 també augmenta la glicòlisi en les cèl·lules T98G.



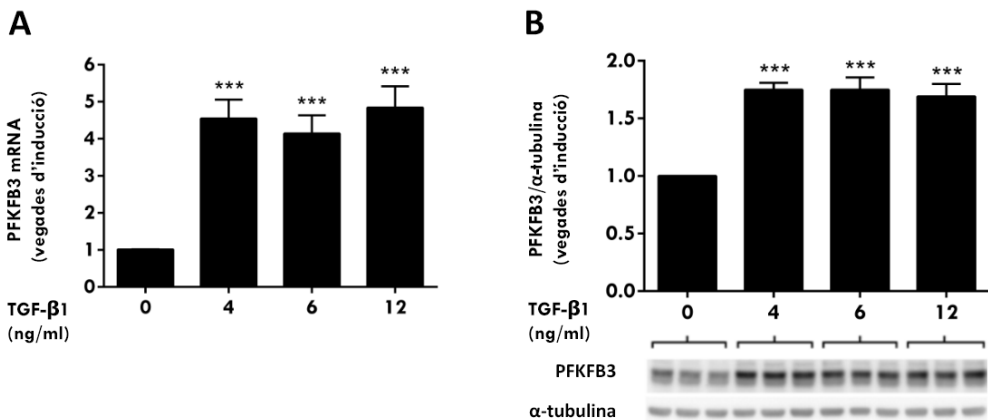
**Figura R-18.** Efecte del tractament amb TGF- $\beta$ 1 al llarg del temps sobre l'expressió de GLUT1, HK-II i LDH-A en cèl·lules T98G. Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant 8 hores. RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per GLUT1, HK-II i LDH-A. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.05$ , \* determinat pel test t-Student).

A continuació, vam estudiar l'efecte de TGF- $\beta$ 1 sobre l'expressió de les diferents isoformes dels gens PFKFBs quan les cèl·lules eren estimulades amb aquest factor durant 8 hores. L'anàlisi per RT-qPCR mostra que les cèl·lules T98G expressen tant PFKFB2, PFKFB3 com PFKFB4, però en canvi no presenten expressió de PFKFB1. En resposta a TGF- $\beta$ 1, PFKFB3 és l'única isoforma que es modula, incrementant la seva expressió, al voltant de quatre vegades, a les 8 hores de tractament (**Figura R-19**).



**Figura R-19. Expressió relativa de les diferents isoformes dels gens PFKFBs en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb TGF- $\beta$  (4 ng/ml) durant 8 hores. RT-qPCR utilitzant les sondes humanes específiques per PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 i PFKFB4. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control de cada isoforma. Les dades es presenten com a mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).

Seguidament, vam realitzar un assaig dosi-resposta analitzant l'expressió del mRNA i de la proteïna de PFKFB3. Els resultats, tant per RT-qPCR com per western blot, no van mostrar cap diferència en la inducció de PFKFB3 en les diferents dosis testades (**Figura R-20**). A partir d'aquí tots els experiments de TGF- $\beta$ 1 els vam realitzar a una concentració de 4 ng/ml.



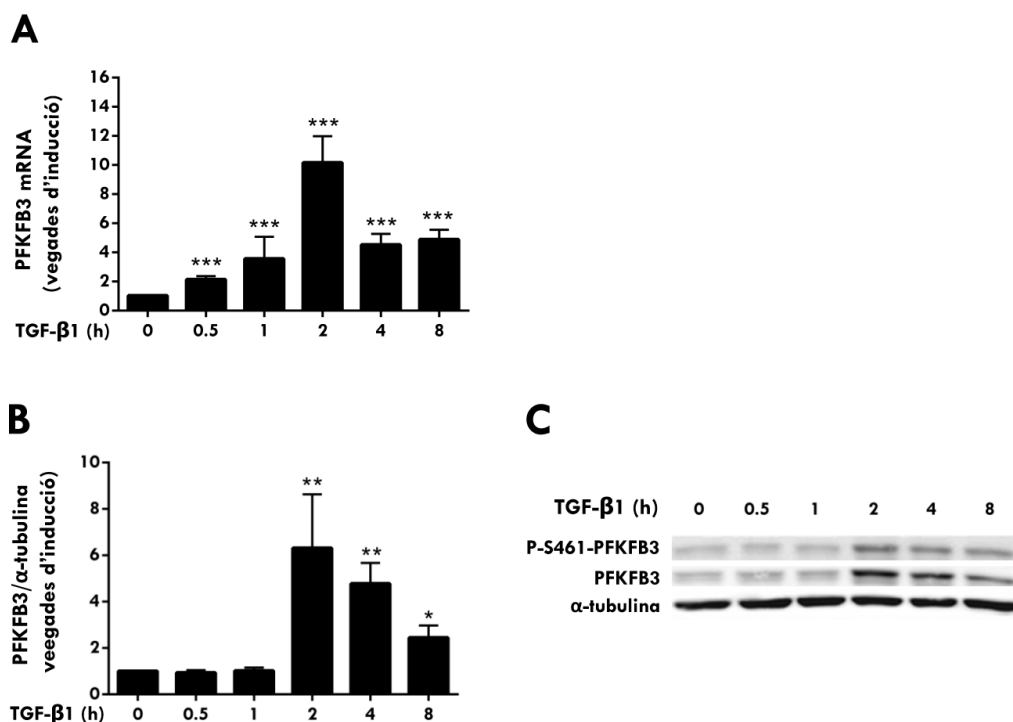
**Figura R-20. Dosi-resposta de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** El peu de figura continua a la pàgina següent.

**Figura R-20. Dosi-resposta de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 en les cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb diferents dosis de TGF- $\beta$ 1 durant 8 hores. **A)** RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per PFKFB3. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3 (panell superior) i western blot representatiu (panell inferior) utilitzant l'anticòs de PFKFB3. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).

Per determinar la dependència en el temps de la inducció de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ , les cèl·lules T98G es van tractar amb TGF- $\beta$  durant diferents temps. Tal i com es mostra a la **Figura R-21A**, als 30 minuts ja s'observà un increment significatiu de l'expressió del mRNA de PFKFB3, assolint un màxim a les 2 hores, moment a partir del qual comença a disminuir, encara que l'augment és manté significatiu fins a les 8 hores. De forma paral·lela, a nivell de proteïna de PFKFB3, obtenim un increment significatiu a partir de les 2 hores de tractament, que també es manté significatiu fins a les 8 hores (**Figura R-21B i C**).

També vam analitzar els nivells de PFKFB3 fosforilada a la Ser461, ja que s'ha descrit prèviament que en resposta a diferents estímuls, com són els progestàgens i l'estrès cel·lular, la inducció de PFKFB3 es regula per dos mecanismes.

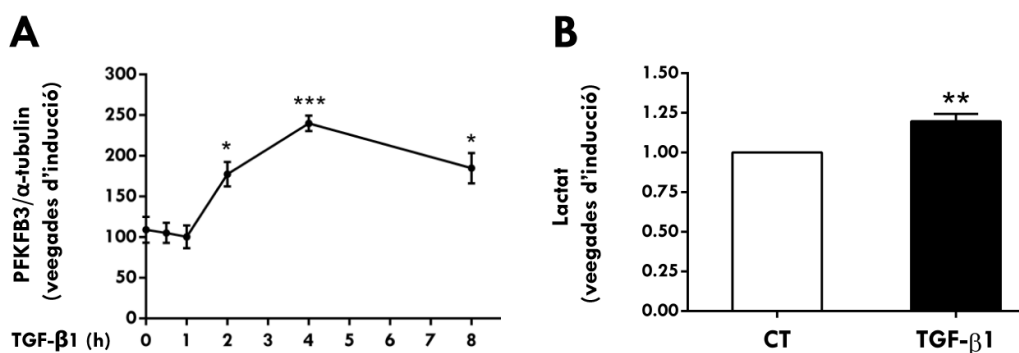
Per una banda, a temps curts, de l'ordre de minuts, té lloc una resposta molt ràpida a través d'una modificació post-traducciona, fosforilant l'enzim PFKFB3. Per l'altra banda, té lloc un segon efecte, a temps més llargs, a través de la regulació transcripcional del gen de PFKFB3 incrementant la proteïna de PFKFB3 (Novellademunt et al., 2012, 2013c).



**Figura R-21. Efecte del tractament amb TGF- $\beta$ 1 al llarg del temps sobre l'expressió de PFKFB3 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant diferents temps. A) RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per PFKFB3. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. B) Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3. C) Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de PFKFB3 i P-PFKFB3. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.05$ , \*;  $p < 0.01$ , \*\*;  $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).

En aquest cas, en resposta a TGF- $\beta$ 1, els nivells de PFKFB3 fosforilada augmenten de forma paral·lela amb els de PFKFB3 a temps llargs, indicant que no té lloc una regulació a nivell post-traduccional d'aquest isoenzim (**Figura R-21C**).

Per confirmar el paper fisiològic de la inducció de PFKFB3, vam analitzar la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, el metabòlit directe de PFKFB3, i la producció de lactat, producte de la glicòlisi. Com es pot observar a la **Figura R-22**, la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> va augmentar significativament a partir de les 2 hores de tractament amb TGF- $\beta$ 1, fet que es correlaciona amb l'increment de la proteïna de PFKFB3. Consistentment amb l'increment de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, observem un augment significatiu dels nivells de lactat extracel·lular a les 4 hores de tractament amb TGF- $\beta$ 1.



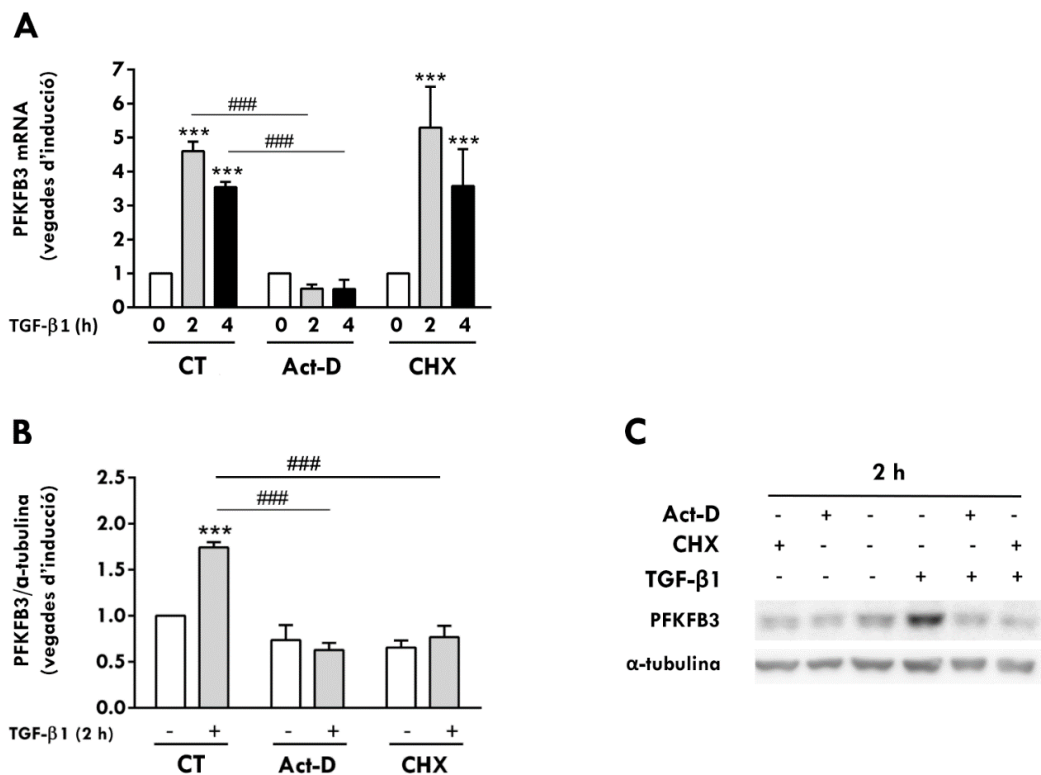
**Figura R-22. Efecte del tractament amb TGF- $\beta$ 1 al llarg del temps sobre la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i els nivells de lactat extracel·lular en cèl·lules T98G.** les cèl·lules T98G, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) en els temps indicats. **A)** Concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. **B)** Nivells de lactat extracel·lular. Els resultats estan normalitzats per proteïna i s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.05$ , \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).

## 2.2 Regulació transcripcional de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1

Per tal d'aprofundir en el mecanisme pel qual el TGF- $\beta$ 1 regula el mRNA de PFKFB3, vam tractar les cèl·lules amb un inhibidor de la transcripció, actinomicina D, i amb

un inhibidor de la síntesi proteica, cicloheximida, 30 minuts abans del tractament amb TGF- $\beta$ 1. Els resultats obtinguts per RT-qPCR de la **Figura R-23A** mostren que la presència d'actinomicina D impedeix l'augment de l'expressió del mRNA de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1. En canvi, la presència de cicloheximida no bloqueja la inducció del mRNA de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1, indicant que aquesta inducció no requereix la síntesi *de novo* de proteïna, sinó que és un efecte directe sobre el mRNA de PFKFB3.

Analitzant l'expressió proteica en aquestes condicions podem observar com la proteïna de PFKFB3, degut al tractament amb TGF- $\beta$ 1 durant dues hores, no augmenta quan les cèl·lules van ser pretractades amb actinomicina D, confirmant d'aquesta manera que l'increment de PFKFB3 a nivell de proteïna depèn del augment en el seu mRNA. A més a més, l'ús de la cicloheximida inhibeix la inducció de la proteïna de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 indicant que és necessària la traducció (**Figura R-23B i C**).



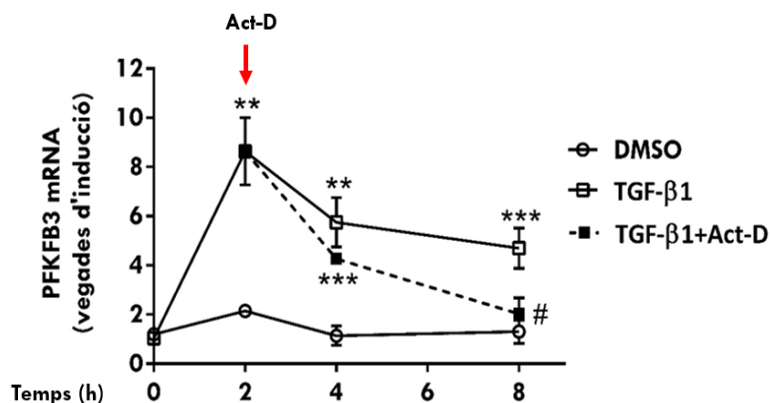
**Figura R-23. Mecanisme de regulació de l'expressió gènica de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** El peu de figura continua a la pàgina següent.



**Figura R-23. Mecanisme de regulació de l'expressió gènica de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades amb actinomicina D (Act-D) (5  $\mu$ g/ml) o cicloheximida (CHX) (20  $\mu$ g/ml) durant 30 minuts i posteriorment tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) en els temps indicats. **A)** Anàlisi per RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica de PFKFB3. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3. **C)** Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de PFKFB3. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.001$ , \*\*\*, per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 respecte a la condició control;  $p < 0.001$ , ###, per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 i Act-D o CHX respecte a les tractades només amb TGF- $\beta$ 1, determinat pel test t-Student).

Per aprofundir més en aquest estudi, alternativament vam tractar les cèl·lules amb TGF- $\beta$ 1 durant 2 hores, ja que és el temps en el que obtenim el màxim d'expressió de mRNA de PFKFB3, i després, en els casos indicats, vam tractar les cèl·lules amb actinomicina D. Com s'observa a la **Figura R-24**, quan s'afegeix actinomicina D a les cèl·lules tractades prèviament durant 2 hores amb TGF- $\beta$ 1 els nivells d'expressió del mRNA de PFKFB3 disminueixen més ràpidament comparats amb els de les cèl·lules tractades només amb TGF- $\beta$ 1.

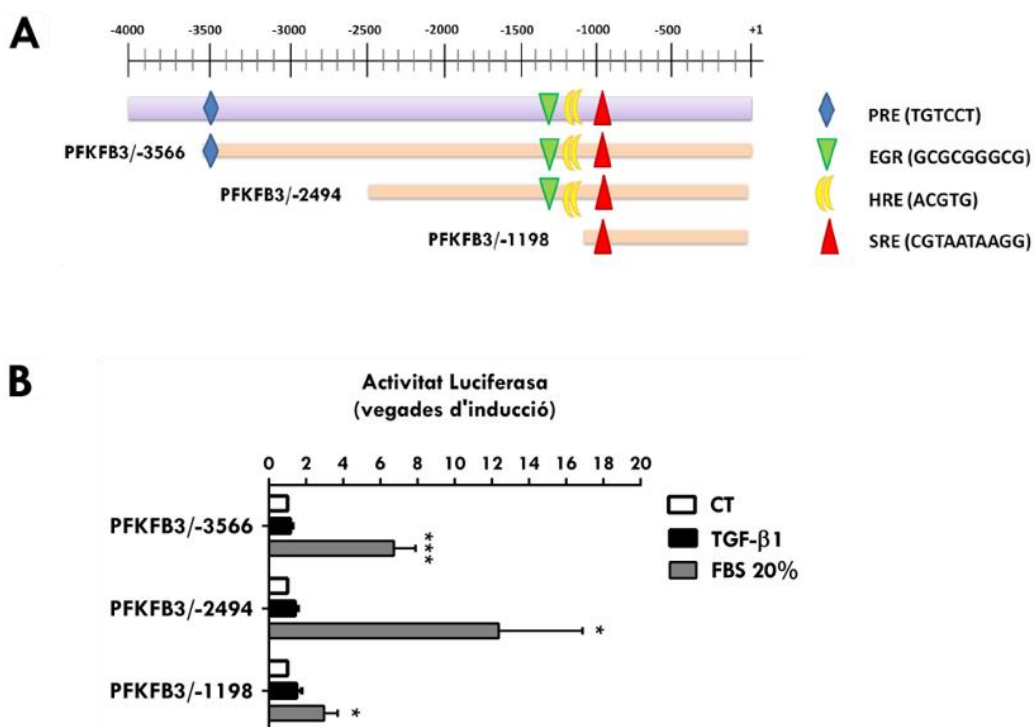
Tenint en compte els resultats obtinguts fins ara a nivell de mRNA, on l'expressió del gen PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 és de dues vegades d'inducció ja als 30 minuts, obtenint un pic a les 2 hores d'unes 10 vegades d'inducció, juntament amb les anteriors, on la inhibició de la transcripció bloqueja aquest augment, confirmen que TGF- $\beta$ 1 regula l'expressió del gen PFKFB3 a nivell transcripcional en aquestes cèl·lules.



**Figura R-24. Efecte del TGF- $\beta$ 1 a nivell transcripcional de PFKFB3 en cèl·lules T98G.** Anàlisi per RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica de PFKFB3. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant 2, 4 i 8 hores. El tractament amb actinomicina D (Act-D) (5  $\mu$ g/ml) es va realitzar en els casos indicats. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.01$ , \*\*;  $p < 0.001$ , \*\*\*, per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 respecte a la condició control;  $p < 0.05$ , #, per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 i Act-D respecte a les tractades només amb TGF- $\beta$ 1, determinat pel test t-Student).

Per tant, com els resultats obtinguts en els experiments tant amb cicloheximida com amb actinomicina D indiquen que el gen PFKFB3 pot ser una diana directa de TGF- $\beta$ 1 i que és independent de la síntesi de *novu* de proteïna, el següent pas va ser l'estudi del promotor d'aquest gen per tal de determinar la regió del promotor de PFKFB3 responsable de l'activació transcripcional en resposta a TGF- $\beta$ 1. Al laboratori desponíem de diferents fragments del promotor humà de PFKFB3 (**Figura R-25A**) clonats en un vector d'expressió luciferasa pGL2 basic (Obach et al., 2004). Per duu a terme aquest estudi, vam determinar l'activitat luciferasa de les cèl·lules transfectades de manera transitòria amb aquestes construccions després de 16 hores de tractament amb TGF- $\beta$ 1. A més a més, vam tractar les cèl·lules amb 20% de FBS (*Foetal Bovine Serum*) com a control positiu de resposta del promotor de PFKFB3 prèviament descrit (Obach et al., 2004). Per normalitzar les eficiències de transfecció vam co-transfectar el vector d'expressió  $\beta$ -galactosidasa. A la **Figura R-25B** podem observar com el tractament amb TGF- $\beta$ 1 no té

cap efecte sobre l'activitat luciferasa quan transfectem aquestes construccions del promotor de PFKFB3 en les cèl·lules. En canvi, com ja s'havia descrit, les tres construccions responen al tractament amb FBS, augmentant significativament l'activitat luciferasa, ja que l'element de resposta a sèrum (SRE) es troba present a les tres construccions. Aquests resultats indiquen que en aquesta regió del promotor de PFKFB3 de 3.5 kb no es troba l'element de resposta responsable de l'augment de la transcripció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 i per tant hem d'anar més abans del 5' del promotor per trobar-lo.



**Figura R-25. Efecte de TGF- $\beta$ 1 en el promotor humà de PFKFB3 en cèl·lules T98G.** **A)** Representació del promotor humà de PFKFB3 amb les diferents construccions del promotor que es van utilitzar. **B)** Determinació de l'activitat luciferasa de les cèl·lules T98G transfectades de manera transitòria amb diferents construccions del promotor de PFKFB3 i tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) o FBS (20%). L'activitat luciferasa va ser mesurada després de 16-18 hores del tractament. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control de cada construcció. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.05$ , \*;  $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).

Per tant, vam analitzar la presència de seqüències de llocs d'unió a les proteïnes Smad (SBE) en la part del promotor de PFKFB3 humà que no teníem clonat, ja que, com s'ha comentat en la introducció, són les principals proteïnes efectores de la via de TGF-β1 a nivell transcripcional. Un anàlisi de les regions conservades evolutivament del promotor de PFKFB3 mitjançant el programa ECR (*Evolutionary Conservation Region*) Browser va desvelar la presència d'un lloc d'unió per Smad altament conservat en rata, ratolí, gos, vaca, mono, chimpanzé i humà entre la posició -3766 i -3758 des de l'inici de transcripció del gen humà de PFKFB3 (**Figura R-26**).

Rat (rn4)	AATTAT <b>TTGAGGTCT</b> TGCTTCTCTCTCAT
Mouse (mm10)	-TTAT <b>TTGGAGCCT</b> TGCTTCACTCTCTCAT
Dog (canFam2)	TTTTAT <b>TTGGTGTCT</b> TGCCTCGCTCTCTCAG
Cow (bosTau6)	TCTTAT <b>TTGGTGTCT</b> TCTTCACTCTCTCCG
Rhesus macaque (rheMac2)	TTTTGT <b>TTGGTGTCT</b> CACTTCCCTCCCTCAT
Chimpanzee (panTro3)	TTTTGT <b>TTGGTGTCT</b> CACTTCTCTCCCTCAT
Human (hg19)	TTTTGT <b>TTGGTGTCT</b> CACTTCTCTCCCTCAT

**Figura R-26. Anàlisi de regions conservades evolutivament del promotor de PFKFB3 utilitzant l'ECR Browser.** A la imatge es mostra una regió del promotor de PFKFB3 on es localitza la seqüència d'unió al factor de transcripció Smad descrita per aquest programa. Aquesta seqüència es troba entre -3766 i -3758 des de l'inici de transcripció de PFKFB3 (marcada amb negreta) alineada amb les seqüències de PFKFB3 de rata, ratolí, gos, vaca, mono i chimpanzé.

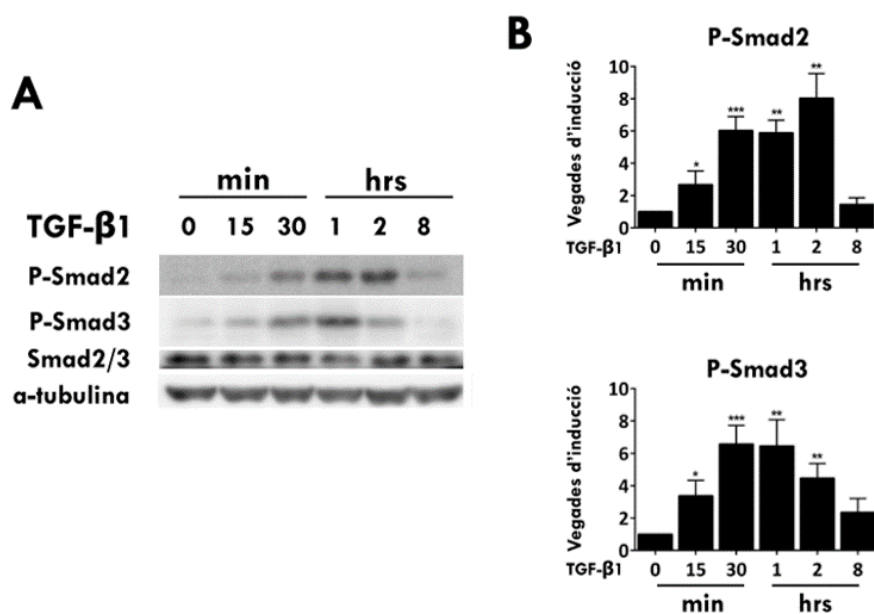
Es per això que ens vam plantejar realitzar la clonació de la regió del promotor que conté aquesta possible seqüència d'unió a Smad en un plasmidi d'expressió luciferasa pGL2basic. Un cop obtingut el plasmidi, tornariem a realitzar assajos d'activitat luciferasa per determinar si aquest fragment del promotor de PFKFB3 respon a TGF-β1. A continuació, podríem acotar la regió per aconseguir determinar la seqüència o seqüències responsables de la inducció de PFKFB3 per a, finalment, poder realitzar assajos de precipitació d'oligonucleòtids biotinilats i d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) per obtenir evidències *in vitro* i *in vivo* de la unió del factor al promotor. Tot i que hem començat amb els primers experiments de clonatge, encara no hem obtingut les construccions desitjades per poder duur a terme aquests experiments.

## 2.3 Vies de senyalització implicades en l'efecte de TGF- $\beta$ 1 en la regulació de PFKFB3

A continuació, vam analitzar quina era la via o les vies de senyalització implicades en la regulació de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 en les cèl·lules T98G.

### 2.3.1 Estudi de la via canònica de TGF- $\beta$ 1

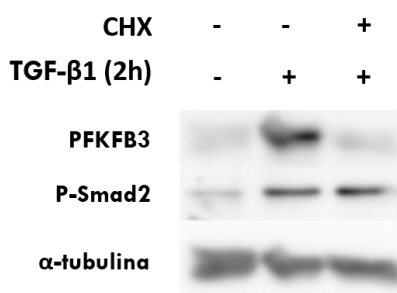
Amb l'objectiu d'investigar els mecanismes intracel·lulars implicats en la inducció de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 vam començar amb l'anàlisi de la via canònica de TGF- $\beta$ 1. L'activació de d'aquesta via es pot detectar experimentalment analitzant la fosforilació de Smad2 i Smad3 després de l'estimulació amb TGF- $\beta$ 1.



**Figura R-27. Efecte del TGF- $\beta$ 1 en l'activació de la via de Smad en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant diferents temps. **A)** Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de P-Smad2 i P-Smad3. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de P-Smad2 i P-Smad3. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.05$ , \*;  $p < 0.01$ , \*\*;  $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).

En els experiments de *time-course* de la **Figura R-27**, podem observar com tant Smad2 com Smad3 es fosforilen en resposta al tractament amb aquest factor a partir dels 15 minuts, mantenint-se fins a les dues hores.

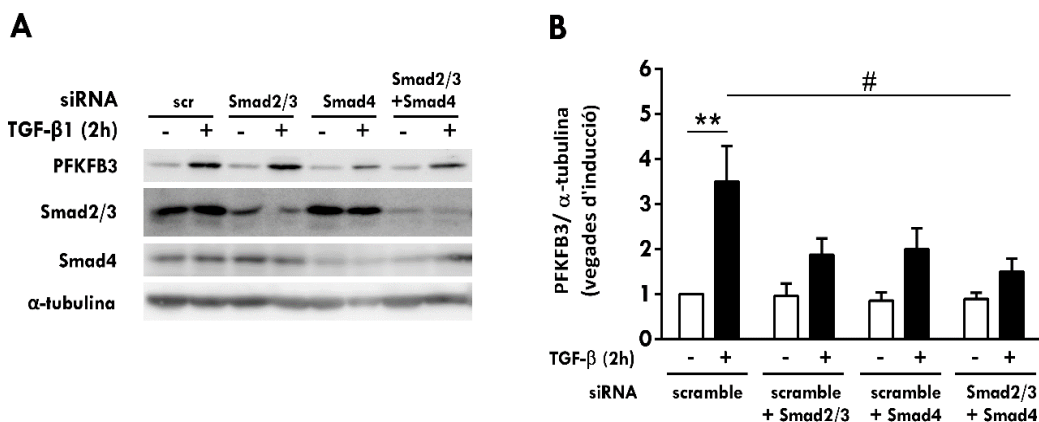
Com que la fosforilació de les proteïnes Smad té lloc de forma ràpida, indica que no es necessita la síntesi proteica *de novo* per l'activació d'aquestes proteïnes. Això ho vam confirmar analitzant la fosforilació de Smad2 quan les cèl·lules eren pretractades amb cicloheximida i estimulades amb TGF- $\beta$ 1 durant dues hores (**Figura R-28**). A més, l'activació de les Smads té lloc a al mateix temps que s'obté la inducció de l'expressió del mRNA de PFKFB3, indicant que aquesta via pot estar implicada en la regulació directa de la transcripció de PFKFB3.



**Figura R-28. Mecanisme de regulació de l'activació de Smad2 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades amb cicloheximida (CHX) (20  $\mu$ g/ml) durant 30 minuts i posteriorment tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant 2 hores. Western blot utilitzant l'anticòs de PFKFB3 i P-Smad2. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega.

Per analitzar si la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 era degut a l'activació de les Smads vam transfectar les cèl·lules amb un siRNA contra seqüències de Smad2 i Smad3 (Smad2/3) i amb un siRNA específic per Smad4. Després de 72 hores de silenciament, vam tractar les cèl·lules amb TGF- $\beta$ 1 durant 2 hores. Primerament, vam comprovar l'efectivitat de la silenciament d'aquestes proteïnes analitzant els seus nivells de proteïna. Els resultats per western blot mostren que, la transfecció del siRNA de Smad2/3 i Smad4 disminueix els nivells de proteïna de Smad2/3 i Smad4, respectivament, i que aquestes proteïnes no es veuen afectades amb la transfecció del scramble. Aquesta silenciament de Smad2/3 o Smad4 fa que la inducció de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 disminueixi respecte a la condició control, és a dir, respecte a les cèl·lules transfectades amb l'scramble, i disminueix

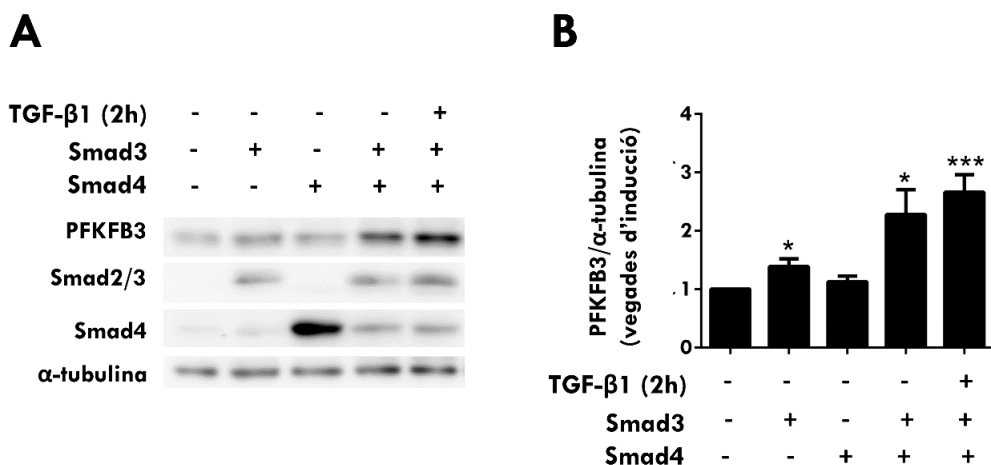
encara més de forma significativa quan Smad2/3 i Smad4 es troben silenciades a la vegada (**Figura R-29**). Aquestes dades suggereixen la participació de la via de Smad en l'increment de l'expressió de PFKFB3 en resposta a TGF-β1. Cal dir que la disminució dels nivells de proteïna de PFKFB3 no va ser completa, és a dir, fins als seus nivells basals, degut possiblement a que la silenciació de les Smads no és del 100% o a la participació d'altres vies independents de Smads en aquesta inducció.



**Figura R-29. Efecte de la silenciació de les Smads en la inducció de PFKFB3 per TGF-β1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules van ser transfectades amb siRNA de Smad2/3 i/o Smad4 a una concentració de 75 nM. Com a control es va utilitzar un siRNA inespecífic (scramble, scr). Un cop dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb TGF-β1 (4 ng/ml) 2 hores. **A**) Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de PFKFB3, Smad2/3 i Smad4. L'anticòs α-tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B**) Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control de l'scramble. Les dades es presenten com a mitjanes de com a mínim tres experiments independents ± SEM de cada condició (p<0.01, \*\* per les condicions tractades amb TGF-β1 respecte a la condició control; p<0.05, #, per les condicions tractades amb TGF-β1 en les cèl·lules transfectades amb siRNA de Smad2/3 i Smad4 respecte a les tractades amb TGF-β1 en les cèl·lules transfectades amb scramble, determinat pel test t-Student).

A continuació, vam voler confirmar el paper de les Smads mitjançant una altra aproximació. En aquest cas, disponíem d'un plasmidi d'expressió de Smad3 i un altre de Smad4, Myc-Smad3 i Flag-Smad4 clonats en un vector pSC-2, proporcionats pel Dr. Francesc Ventura. Vam sobreexpressar aquests plasmidis i vam analitzar els nivells de proteïna de PFKFB3 per western blot. Com s'observa a la **Figura R-30**, quan

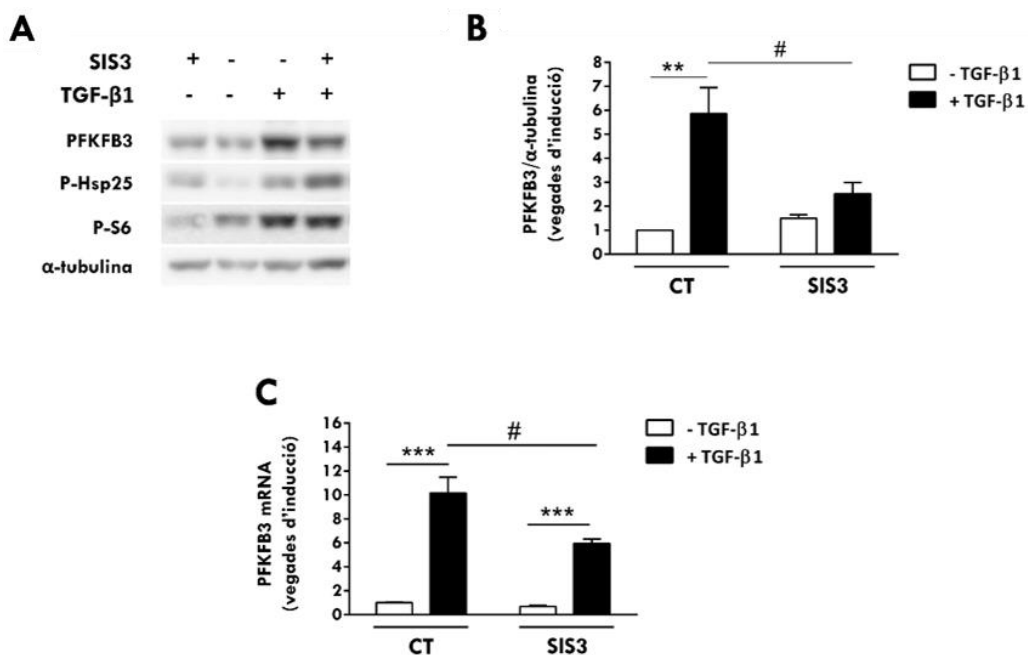
sobreexpressem Smad3, s'obté un petit increment, però significatiu, dels nivells de proteïna de PFKFB3. En canvi, amb la sobreexpressió de Smad4 no detectem canvis en l'expressió de PFKFB3. Això últim és degut a que Smad4, que es troba present al citoplasma, per tanslocar-se al nucli ha d'estar formant un complex amb les R-Smads actives, que en aquesta condició no ho estan. Per tant, quan sobreexpressem tant la Smad3 com la Smad4 alhora, obtenim un increment més alt de PFKFB3, i encara augmenta més si en aquestes condicions tractem les cèl·lules amb TGF- $\beta$ 1. Aquests resultats confirmen que les proteïnes Smads, específicament Smad3 i Smad4, estan implicades en l'augment de l'expressió proteica de PFKFB3, però que, per obtenir una completa inducció d'aquest gen, es necessitaria l'activació d'alguna altra via independentment d'aquestes proteïnes.



**Figura R-30. Efecte de la sobreexpressió de Smad3 i Smad4 en la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules van ser transfectades durant 24 hores amb 2  $\mu$ g del vector d'expressió de Smad3 i/o de Smad4. Com a control es va utilitzar un vector d'expressió de GFP. Un cop dejunades de sèrum durant 24 hores, i en el casos indicats van ser tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) 2 hores. **A)** Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de PFKFB3, Smad2/3 i Smad4. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control de l'scramble. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.05$ , \*  $p < 0.001$ , \*\*\* , determinat pel test t-Student).



Per tal de confirmar el paper de Smad3 en la inducció de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1, vam fer ús de SIS3 que és un inhibidor específic de la fosforilació de Smad3, i per tant de la seva activació. L'anàlisi per western blot de la **Figura R-31A** mostra que quan bloquegem l'activació de Smad3 s'obté una reducció significativa de la inducció de l'expressió proteica de PFKFB3 després del tractament amb TGF- $\beta$ 1. A més a més, vam comprovar si la inducció del mRNA de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 també era dependent de l'activació de Smad3. Tal i com s'observa a la **Figura R-31**, SIS3 redueix de forma significativa la inducció del mRNA de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1. Aquests resultats corroboren la participació de Smad3 en la regulació transcripcional de PFKFB3.

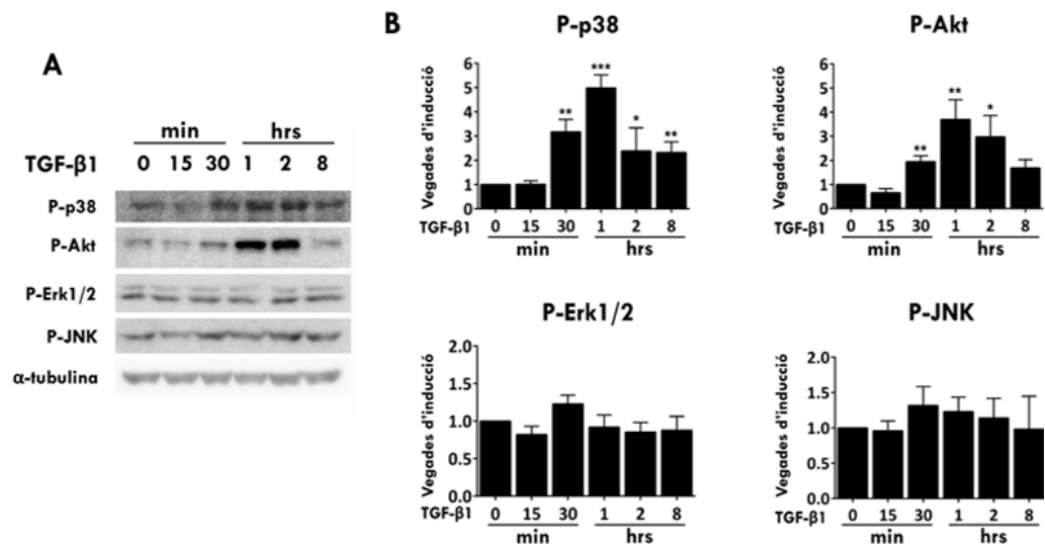


**Figura R-31. Efecte de la inhibició de Smad3 en la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades durant 30 min amb SIS3 (20  $\mu$ M) i llavors tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant 2 hores. **A)** Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de PFKFB3, P-Hsp25, P-S6. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3. **C)** RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per PFKFB3. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.01$ , \*\*;  $p < 0.001$ , \*\*\*; per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 respecte a la condició control;  $p < 0.05$ , #; per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 i SIS3 respecte a les tractades només amb TGF- $\beta$ 1, determinat pel test t-Student).

Els resultats obtinguts fins al moment confirmen la participació de Smad3 i de Smad4 en la regulació de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1, per tant ens faltaria assegurar si Smad2 també està implicada, ja que en els experiments de silenciament, el fet d'utilitzar un siRNA contra Smad2 i Smad3 alhora, no ens permet discernir la implicació de cadascuna d'aquestes proteïnes per separat.

### 2.3.2 Estudi de les vies no canòniques de TGF- $\beta$ 1

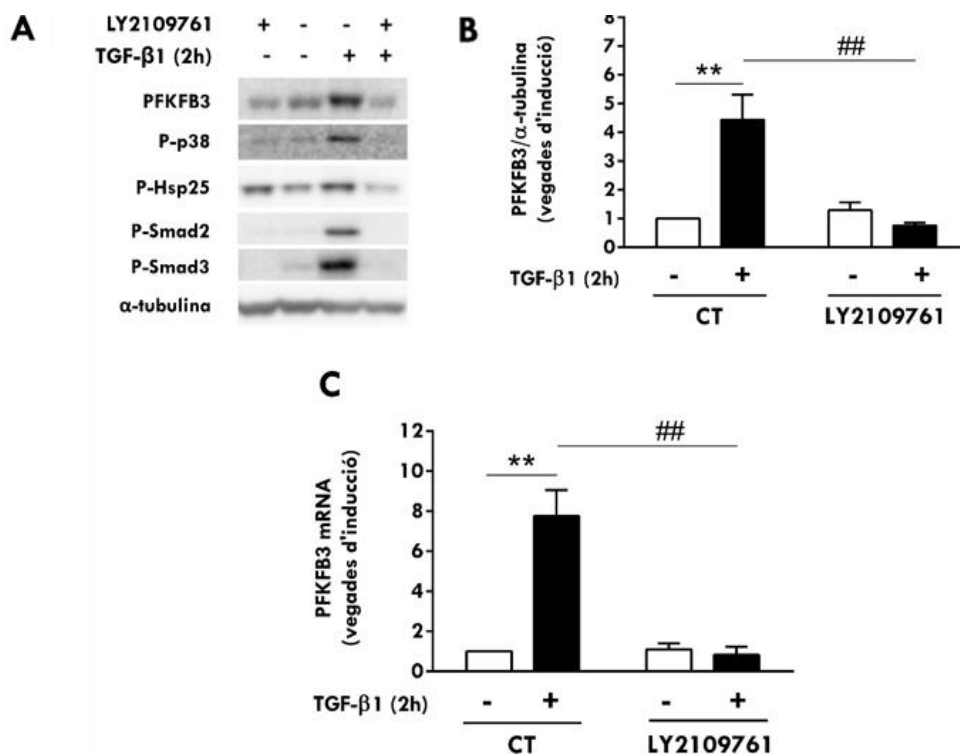
Primerament, vam analitzar la possible activació per TGF- $\beta$ 1 de les vies de MAPKs de p38, JNK i Erk com també de PI3K. Per això, vam fer un experiment de *time-course* utilitzant anticossos que reconeixien la forma fosforilada, i per tant activa de p38 (P-Thr180/Tyr182-p38), JNK (P-Thr183/Tyr185-JNK), Erk1/2 (P-Thr202/Tyr204-Erk1/2) i Akt (P-Ser473-Akt). Els resultats indiquen que el tractament amb TGF- $\beta$ 1 activa les vies de p38 i Akt, ja que podem observar que la fosforilació d'aquestes proteïnes augmenta a partir dels 30 minuts, mantenint-se al llarg del temps.



**Figura R-32. Efecte de TGF- $\beta$ 1 en l'activació de les vies no canòniques en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant diferents temps. A) Western blot representatiu utilitzant els anticossos indicats. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. B) Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de P-p38, P-Akt, P-Erk1/2 i P-JNK. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.05$ , \*;  $p < 0.01$ , \*\*;  $p < 0.001$ , \*\*\* determinat pel test t-Student).

En canvi, les nivells de Erk1/2 i JNK fosforilats no es modulen en resposta a TGF- $\beta$ 1 (**Figura R-32**). Aquests resultats, juntament amb els obtinguts prèviament, demostren que TGF- $\beta$ 1 indueix tant la via canònica com les vies de p38 MAPK i PI3K en les cèl·lules T98G.

Amb l'objectiu de confirmar que l'activació de la via de p38 MAPK i PI3K per TGF- $\beta$ 1 requereix l'activació del seu receptor, vam tractar les cèl·lules amb l'inhibidor del T $\beta$ RI/II LY2109761 durant 30 minuts i posteriorment vam tractar les cèl·lules amb TGF- $\beta$ 1 durant 2 hores. La **Figura R-33** mostra com la inhibició del receptor de TGF- $\beta$ 1 bloqueja l'activació de la via de p38 i Akt, ja que no s'obté fosforilació de les proteïnes Hsp25 (P-Ser86-Hsp25) i S6 (P-Ser235/236-S6), substrats d'aquestes vies respectivament. L'efectivitat d'aquest inhibidor la vam comprovar analitzant la fosforilació de Smad2 i Smad3.



**Figura R-33.** Efecte de la inhibició del T $\beta$ RI/II en l'activació de les vies no canòniques de TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G. Peü de pàgina continua a la pàgina següent.

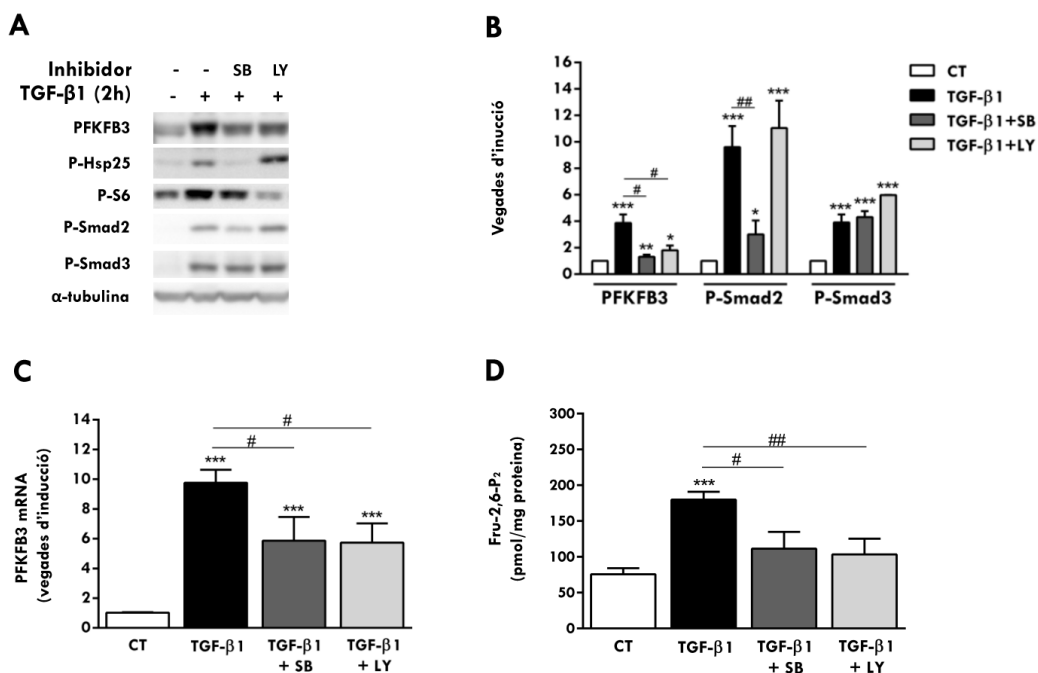
**Figura R-33. Efecte de la inhibició del T $\beta$ RI/II en l'activació de les vies no canòniques de TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades durant 30 min amb LY2109761 (2  $\mu$ M) i llavors tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant 2 hores. **A)** Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de PFKFB3, P-Hsp25, P-S6, P-Smad2 i P-Smad3. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3. **C)** RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per PFKFB3. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.01$ , \*\*; per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 respecte a la condició control;  $p < 0.05$ , #; per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 i LY2109761 respecte a les tractades només amb TGF- $\beta$ 1, determinat pel test t-Student).

Conseqüentment, la inactivació de la senyalització de TGF- $\beta$ 1 evita la inducció de la proteïna i del mRNA de PFKFB3. Aquests resultats ens indiquen que l'activació de la via de p38 MAPK i Akt, i per tant la inducció de PFKFB3, requereixen de l'activitat del T $\beta$ RI/II.

Per determinar si alguna d'aquestes vies, a part de les Smads, també estava implicada en la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1, vam utilitzar un inhibidor de la via de p38, SB203580, que inhibeix l'activació de MAPKAPK-2 per p38, i, per tant, la fosforilació de Hsp25, i un inhibidor de la via d'Akt, LY294002, que inhibeix selectivament l'activitat de la PI3K i per tant la fosforilació d'Akt i dels seus substrats, com la proteïna S6. Com podem veure a la **Figura R-34A**, l'ús d'ambdós inhibidors va bloquejar l'activació de la via de p38 i PI3K en resposta a TGF- $\beta$ 1 ja que no va augmentar la fosforilació de Hsp25 i S6 respectivament, i que tant la inhibició de la via de p38 com de la via de PI3K redueixen de forma significativa la inducció de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 (**Figura R-34A i B**).

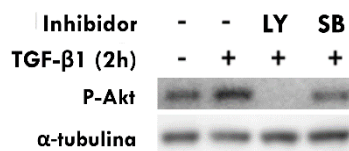
Vam analitzar també l'efecte d'aquests inhibidors tant a nivell de missatger de PFKFB3 com de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Els resultats concorden amb els obtinguts per western blot, ja que la inhibició de la via de p38 i PI3K redueix tant els nivells del mRNA de PFKFB3 com la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en resposta a TGF- $\beta$ 1 (**Figura R-34C i D**).

A més, en aquests experiments també vam voler analitzar si l'activació de la via de Smad depenia d'alguna manera de l'activació de les vies no canòniques. Els resultats de la **Figura R-34A i B** mostren que la inhibició de la via de p38 redueix la fosforilació específica de Smad2, però no de Smad3, en resposta a TGF-β1.



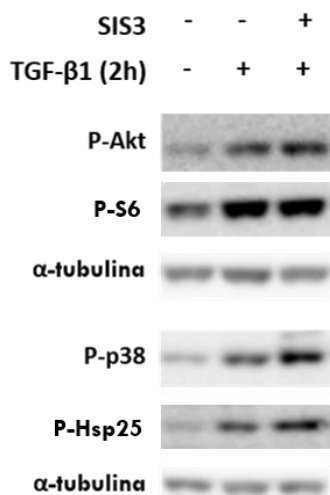
**Figura R-34. Efecte de la inhibició de la via de p38 i PI3K en la inducció de PFKFB3 per TGF-β1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades durant 30 min amb SB203580 (SB) (10 μM) o LY294002 (LY) (10 μM) i llavors tractades amb TGF-β1 (4 ng/ml) durant 2 hores. **A)** Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de PFKFB3, P-Hsp25, P-S6, P-Smad2 i P-Smad3. L'anticòs α-tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3, P-Smad2 i P-Smad3. **C)** RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per PFKFB3. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. **D)** Concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents ± SEM de cada condició (p<0.05, \*, p<0.01, \*\*, p<0.001, \*\*\* per les condicions tractades amb TGF-β1 respecte a la condició control; p<0.05, #, p<0.01, per les condicions tractades amb TGF-β1 i inhibidor respecte a les tractades només amb TGF-β1, determinat pel test t-Student).

També vam observar que la inhibició de la via de p38 també va provocar una disminució en la fosforilació de la proteïna S6 en resposta a TGF- $\beta$ 1 (**Figura R-34A**), és per això que vam analitzar l'efecte de l'inhibidor SB203580 en la fosforilació d'Akt, ja que s'ha descrit que la via de p38 MAPK activa la via de PI3K/Akt (Horowitz et al., 2004; Morissette et al., 2006; Suwanabol et al., 2012). Els resultats obtinguts mostren que la inhibició de la via de p38 disminueix la fosforilació d'Akt en resposta a TGF- $\beta$ 1 (**Figura R-35**), donant lloc a la disminució de la fosforilació de la proteïna S6 observada (**Figura R-34A**). Per tant, els resultats obtinguts suggereixen que la via de p38 pot actuar com intermediària entre TGF- $\beta$ 1 i l'activació de la via de PI3K/Akt.



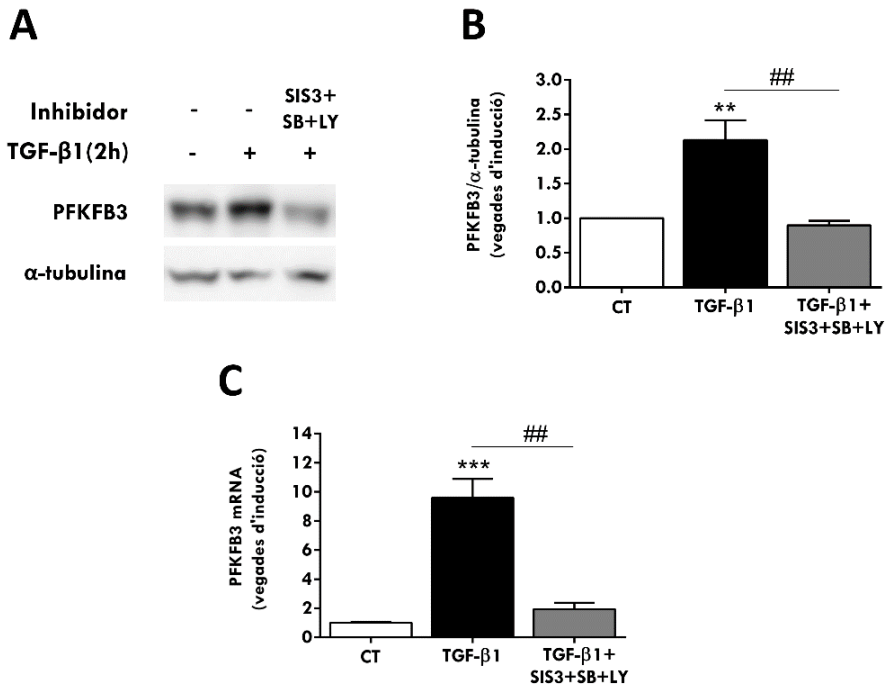
**Figura R-35. Efecte de la inhibició de la via de p38 en l'activació d'Akt per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades durant 30 min amb SB203580 (SB) (10  $\mu$ M) o LY294002 (LY) (10  $\mu$ M) i llavors tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant 2 hores. Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de P-Akt. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per a normalitzar la càrrega.

A continuació vam estudiar si l'activació de la via de p38 MAPK i, per tant, la via d'Akt, estava mediada per Smad3, ja que hi ha un estudi on descriuen que Smad3 està implicada en l'activació d'Akt a través de p38 en resposta a TGF- $\beta$ 1 (Suwanabol et al., 2012). En els resultats de western blot podem observar que la inhibició de Smad3 no disminueix la fosforilació d'Akt i p38, indicant que en el nostre model l'activació de la via de p38 MAPK és independent de Smad3 (**Figura R-36**).



**Figura R-36. Efecte de la inhibició de Smad3 en l'activació d'Akt i p38 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades durant 30 min amb SIS3 (20  $\mu$ M) i llavors tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant 2 hores. Western blot utilitzant l'anticòs de P-Akt, P-S6, P-p38 i P-Hsp25. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega.

Per tal d'avaluar si l'activació de Smad3, p38 MAPK i PI3K a la vegada és indispensable per obtenir la màxima inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1, vam pre-tractar les cèl·lules T98G amb els inhibidors d'aquestes proteïnes SIS3, SB203580 i LY294002, respectivament, de forma simultània. A la **Figura R-37** s'observa que l'increment dels nivells de proteïna i mRNA de PFKFB3 degut al tractament amb TGF- $\beta$ 1 va ser eliminat completament quan les cèl·lules es van pre-tractar amb els tres inhibidors alhora. Per tant, aquests resultats indiquen que Smad3, p38 MAPK i Akt activades per TGF- $\beta$ 1 són les responsables de la inducció de PFKFB3 a nivell transcripcional en les cèl·lules T98G.

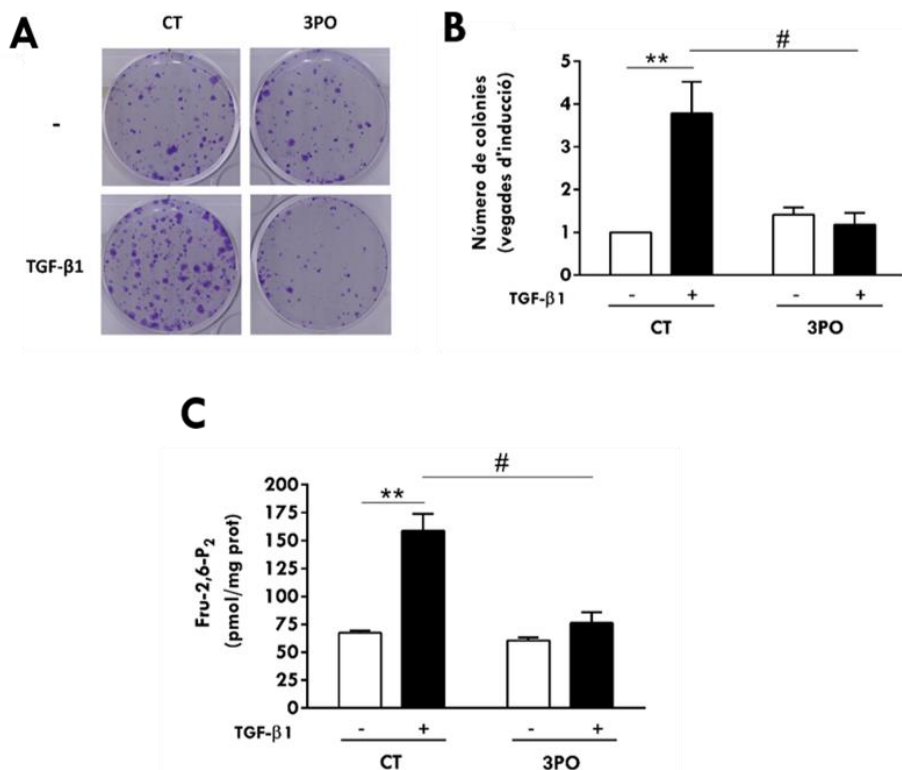


**Figura R-37. Efecte de la inhibició de Smad3, p38 i PI3K en la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 en cèl·lules T98G.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades durant 30 min amb SIS3 (20  $\mu$ M), SB203580 (10  $\mu$ M) i LY294002 (10  $\mu$ M) i llavors tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant 2 hores. **A)** Western blot representatiu utilitzant l'anticòs de PFKFB3. L'anticòs  $\alpha$ -tubulina es va utilitzar per normalitzar la càrrega. **B)** Quantificació densitomètrica de l'expressió proteica de PFKFB3. **C)** RT-qPCR utilitzant la sonda humana específica per PFKFB3. La sonda GAPDH es va utilitzar com a control endogen. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.001$ , \*\*\*; per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 respecte a la condició control;  $p < 0.01$ , ##; per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 i els inhibidors respecte a les tractades només amb TGF- $\beta$ 1, determinat pel test t-Student).



## 2.4 Paper de PFKFB3 en la capacitat de formar colònies de les cèl·lules T98G en resposta a TGF- $\beta$ 1

Vam voler estudiar si la inducció de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 participava en la capacitat de formar colònies de les cèl·lules T98G mitjançant un assaig clonogènic. Per això, vam tractar les cèl·lules amb TGF- $\beta$ 1 durant 2 hores, les vam plaquejar i les vam deixar créixer durant 14 dies. La presència de TGF- $\beta$ 1 va augmentar la capacitat de les cèl·lules de formar colònies. En canvi, quan les cèl·lules van ser pre-tractades durant 30 minuts amb 3PO, que és un inhibidor de l'activitat de PFKFB3, no vam observar un augment en el número de colònies en resposta a TGF- $\beta$ 1 (**Figura R-38A-B**). L'efectivitat del 3PO la vam comprovar analitzant els nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, ja que la inhibició de l'activitat de PFKFB3 evita l'augment de Fru-2,6-P<sub>2</sub> per TGF- $\beta$ 1 (**Figura R-38C**). Per tant, aquests resultats suggereixen que l'augment de l'expressió de PFKFB3, i per tant de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, afecta al potencial oncogènic de les cèl·lules T98G de formar colònies en resposta a aquest factor.



**Figura R-38. Participació de PFKFB3 en la formació de colònies de cèl·lules T98G en resposta a TGF- $\beta$ 1.**  
El peu de pàgina continua a la pàgina següent.

**Figura R-38. Participació de PFKFB3 en la formació de colònies de cèl·lules T98G en resposta a TGF- $\beta$ 1.** Les cèl·lules, prèviament dejunades de sèrum durant 24 hores, van ser pretractades durant 30 min amb 3PO (10  $\mu$ M) i tractades amb TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) durant 2 hores. Les cèl·lules es van plaquejar (500 cèl·lules/pou) i es van deixar créixer durant 14 dies. **A)** Imatges representatives de les colònies tenyides amb cristall violeta. **B)** Quantificació del número de colònies. Els resultats s'expressen com a unitats relatives respecte a la condició control. **C)** Concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Les dades es presenten com les mitjanes de com a mínim tres experiments independents  $\pm$  SEM de cada condició ( $p < 0.01$ , \*\*; per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 respecte a la condició control;  $p < 0.05$ , #; per les condicions tractades amb TGF- $\beta$ 1 i 3PO respecte a les tractades només amb TGF- $\beta$ 1, determinat pel test t-Student).

### 3. Discussió

Una de les vies de senyalització important en els gliomes malignes és la via de TGF- $\beta$  (Platten et al., 2001), ja que aquests expressen de forma elevada tant TGF- $\beta$ 1 com els seus receptors, suggerint l'existència d'una acció autocrina o paracrina d'aquest factor (Constam et al., 1992; Kjellman et al., 2000). Com s'ha comentat a la introducció, TGF- $\beta$  es secreta en forma latent i és activat a través del trencament de la regió C-terminal coneguda com pèptid associat a latència (Khalil, 1999). Alguns càncers, com els gliomes, eviten aquesta regulació secretant directament la forma activa de TGF- $\beta$  (Olofsson et al., 1992).

És ben conegut que el desenvolupament dels tumors requereix la capacitat de proliferar de forma descontrolada i també la reprogramació metabòlica, la qual permet una progressió ràpida d'aquest (Deberardinis et al., 2008; Gatenby and Gillies, 2004; Vander Heiden et al., 2009). S'ha descrit que TGF- $\beta$ 1 participa en la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses i de les cèl·lules associades a l'estroma del tumor augmentant la glicòlisi a través de la inducció de gens glicolítics (Arrick et al., 1992; Guido et al., 2012; Jiang et al., 2015; Li et al., 2010; Liu et al., 2016; Nigdelioglu et al., 2016; Nowak and Schnellmann, 1996; Young et al., 2014; Zhang et al., 2014).

En aquests capítol hem estudiat l'efecte del TGF- $\beta$ 1 en la línia de glioblastoma multiforme (T98G), ja que aquest factor s'ha trobat associat amb la progressió d'aquest tipus de tumor i, a més, les cèl·lules dels gliomes presenten resistència a les condicions anaeròbiques degut al seu potencial d'incrementar la glicòlisi i, per tant, la producció d'àcid làctic (Floridi et al., 1989).

Els nostres resultats mostren que TGF- $\beta$ 1 indueix l'expressió dels gens glicolítics GLUT1, HK-II i LDH-A, incloent la isoforma PFKFB3, en les cèl·lules T98G. En canvi, TGF- $\beta$ 1 no regula l'expressió de les isoformes PFKFB2 i PFKFB4 i no detectem expressió de PFKFB1. Els resultats dels experiments de *time-course* mostren que aquesta inducció del mRNA de PFKFB3 es dona ja als 30 minuts de tractament amb TGF- $\beta$ 1, obtenint un pic a les dues

hores, indicant que PFKFB3 és un gen de resposta a aquest factor. Coherentment amb aquest increment en el mRNA de PFKFB3, els nivells de proteïna de PFKFB3 augmenten a les dues hores i es correlaciona amb un increment en la concentració de Fru-2,-6-P<sub>2</sub>, també a partir de les dues hores d'estimulació amb TGF- $\beta$ 1, i de la producció de lactat a les quatre hores de tractament. Aquests resultats suggereixen que TGF- $\beta$ 1 indueix un augment de la glicòlisi en les cèl·lules T98G i són consistents amb els estudis mencionats anteriorment on descriuen que TGF- $\beta$  està implicat en la reprogramació metabòlica augmentant la glicòlisi en diferents línies cel·lulars (Arrick et al., 1992; Bernard et al., 2015; Guido et al., 2012; Jiang et al., 2015; Nigdelioglu et al., 2016; Nowak and Schnellmann, 1996; Zhang et al., 2014).

L'anàlisi de l'expressió proteica de PFKFB3 i PFKFB3 fosforilada mostren com la regulació de PFKFB3 en aquests cas no es dona a través dels dos mecanismes diferents de regulació que prèviament s'han descrit per la PFKFB3 en resposta a altres estímuls (Novellademunt et al., 2012, 2013c) i en resposta a la insulina, com hem vist en el capítol anterior. Aquesta regulació de PFKFB3 tenia lloc a través d'un primer mecanisme, en el qual hi havia una resposta molt ràpida que donava lloc a la fosforilació de PFKFB3 a la Ser461, i un segon mecanisme més tardà en el que s'activava la transcripció del mRNA amb l'objectiu final d'augmentar la quantitat de proteïna de PFKFB3 total disponible en la cèl·lula. En canvi, en la regulació de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 no observem un increment en la fosforilació de PFKFB3 a temps curts i independentment dels nivells de PFKFB3 total, sinó que la fosforilació de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 augmenta a partir de les dues hores de tractament i de forma paral·lela als nivells de PFKFB3 total.

L'augment dels nivells del mRNA de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 indueix la transcripció del gen, ja que, per una banda, el pre-tractament amb actinomicina D, un inhibidor de la transcripció, impedeix l'augment del mRNA de PFKFB3 en resposta TGF- $\beta$ 1 i, per altra banda, l'addició d'aquest inhibidor al medi de les cèl·lules fa que l'augment dels nivells de mRNA de PFKFB3, obtingut després de dues hores de tractament amb TGF- $\beta$ 1, baixi més ràpidament si ho comparem amb els nivells de mRNA de PFKFB3 de la condició de TGF- $\beta$ 1 sol. La presència de cicloheximida al medi, un inhibidor de la síntesi proteica, no

bloqueja l'increment del mRNA de PFKFB3 induït per TGF- $\beta$ 1, indicant que no es requereix la síntesi *de novo* de proteïnes perquè tingui lloc aquesta inducció transcripcional. A la llum d'aquests resultats, tot sembla indicar que el gen de PFKFB3 pot ser una diana transcripcional directa de TGF- $\beta$ 1.

Respecte a la via de transducció de senyals estimulada per TGF- $\beta$ 1, aquest estudi confirma que la via de senyalització de Smad és funcional en aquest model cel·lular, ja que vam observar la fosforilació de Smad2 i Smad3 després de l'estimulació d'aquestes cèl·lules amb TGF- $\beta$ 1. L'activació d'aquestes proteïnes, que té lloc a partir dels 15 minuts de tractament amb TGF- $\beta$ 1, es correlaciona amb l'augment de mRNA de PFKFB3, suggerint que poden ser les proteïnes efectores de la inducció transcripcional de PFKFB3. La participació de la via de Smad ho hem confirmat mitjançant experiments de silenciament i sobreexpressió d'aquestes proteïnes. La inducció de la proteïna de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 disminueix quan les proteïnes Smad2/3 i Smad4 són silenciades i la sobreexpressió de Smad3 i Smad4 produeix un augment significatiu en els nivells de la proteïna de PFKFB3.

Per conèixer la contribució de Smad3 en la regulació de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 vam fer servir SIS3, ja que s'ha descrit com un inhibidor selectiu de la funció de Smad3 (Jinnin et al., 2006). Els resultats confirmen que aquesta proteïna es necessària per a la resposta transcripcional de PFKFB3, ja que quan s'inhibeix Smad3 es redueix de forma significativa la inducció de PFKFB3 a nivell de proteïna i mRNA per TGF- $\beta$ 1. Els resultats obtinguts fins aquí confirmen la implicació de la via de Smad en la regulació de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1.

A continuació, vam analitzar l'activació de les vies no-canòniques de TGF- $\beta$ 1, ja que s'ha demostrat que aquest factor pot activar la cascada de MAPKs (p38, Erk, JNK) com PI3K i membres de la família de Rho (Derynck and Zhang, 2003). Aquestes vies són activades en determinats contextos i de manera específica del tipus cel·lular (Zhang, 2009). Els resultats obtinguts mostren que, en aquest model cel·lular, el tractament amb TGF- $\beta$ 1 dóna lloc a l'activació de la via de p38 MAPK i d'Akt per part del receptor, ja que la fosforilació de p38 i Akt es dóna a temps molts curts, entre 15 i 30 minuts i, a més, la inhibició del receptor tipus I/II bloqueja aquesta activació. A més, les vies de p38 MAPK

i Akt participen en la regulació de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 ja que l'ús dels inhibidors específics d'aquestes, SB203580 inhibidor de p38 i LY294002 inhibidor de PI3K redueixen de forma significativa la inducció en l'expressió del mRNA i proteïna de PFKFB3 i com a conseqüència la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>.

En els resultats també s'observa que l'activació de la via d'Akt en resposta a TGF- $\beta$ 1 es troba regulada per la via de p38 MAPK, ja que la seva inhibició evita l'augment de fosforilació de la proteïna Akt. S'ha descrit que, en cèl·lules epitelials i cardiomiòcits, TGF- $\beta$  activa la via d'Akt a través de l'activació de la via p38 MAPK, en presència elevada de Smad3 (Suwanabol et al., 2012).

Donat que tant la inhibició de la via de Smad mitjançant siRNAs com la inhibició de les vies de p38 MAPK i PI3K no aconsegueix eliminar completament la inducció de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1 i que la via de p38 MAPK i PI3K s'activen independentment de Smad3, finalment, vam inhibir de forma simultània les tres vies. Els resultats obtinguts mostren que els inhibidors de Smad3 (SIS3), p38 (SB203580) i PI3K (LY294002) aboleixen completament l'increment de proteïna i mRNA de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 indicant que l'activació d'aquestes tres vies són necessàries per la completa inducció de PFKFB3.

Com s'ha comentat en l'apartat d'introducció d'aquest capítol, les R-Smads poden ser fosforilades per MAPKs ja sigui per regular l'activitat transcripcional de les Smads o la capacitat de translocar al nucli de la cèl·lula (Derynck and Zhang, 2003; Lutz and Knaus, 2002; Massagué and Chen, 2000). A més, les proteïnes Smads són capaces de interaccionar amb altres factors de transcripció, substrats de les MAPKs, afegint més complexitat en la interacció entre les vies de MAPKs i Smads.

Tot i que els mecanismes moleculars de la regulació de PFKFB3 per aquests vies no estan ben definits. Per una banda, en els resultats s'observa que la via de p38 MAPK participa en l'activació específica de Smad2 per fosforilació en l'extrem C-terminal indicant que p38 o alguna proteïna associada a la via regula Smad2. Hayes y col·laboradors, en el seu model cel·lular demostren que la via de p38 és important en la regulació de l'activació de Smad3 i suggereixen que proteïnes associades a p38 poden fosforilar a Smad3 i que aquesta fosforilació és específica, ja que no fosforila Smad2 (Hayes et al., 2003). Per

altra banda, la interacció de les proteïnes Smad amb diferents factors de transcripció proporciona la possibilitat d'una interacció a nivell nuclear entre les diferents vies de senyalització. La via de p38 MAPK pot activar diferents factors de transcripció com és l'AP-1, la família de factors de transcripció formada per homo- i heterodímers de Fos, Jun i els membres de la família de ATF, que participen en el control de la proliferació cel·lular, mort i supervivència, com també en la tumorigènesi (Eferl and Wagner, 2003; Karin et al., 1997; Shaulian and Karin, 2001). S'ha descrit que l'activació de la via de p38 MAPK per TGF- $\beta$ 1 en les cèl·lules T98G dóna lloc a la fosforilació del factor de transcripció ATF-2 i c-Jun als 30 minuts (Dziembowska et al., 2007). En un altre estudi mostren que l'activació del factor de transcripció ATF-2 dóna lloc a la formació d'un complex amb Smad4 activant la transcripció del gen diana (Hanafusa et al., 1999; Sano et al., 1999). Per tant, els factors activats per la via de p38 MAPK, com es ATF-2, podrien cooperar amb el complex de Smad al nucli per induir la transcripció de PFKFB3, aportant un altre nivell de regulació entre les MAPK i la via de Smads.

Un altre nivell d'interacció entre la via de Smad i les MAPKs és la fosforilació de les proteïnes Smads en la regió *linker* per part de les MAPKs donant lloc tant a efectes negatius com positius sobre l'activitat de les Smads. Per exemple, s'ha descrit que en resposta a senyals mitogèniques Smad1, Smad2 i Smad3 es fosforilen a través del receptor tirosina quinasa i també a través de la via de Ras/MAPK per ERK en la regió *linker* donant lloc a un efecte negatiu sobre les funcions de les Smads (Kretschmar et al., 1999). En canvi, també s'ha vist que en la línia cel·lular de càncer de mama MCF10CA1h la via de p38 i la via de Rho/ROCK fosforilen les R-Smad en la regió *linker* de tal manera que augmenten l'activitat transcripcional de les R-Smads (Kamaraju and Roberts, 2005).

Encara que no hem pogut corroborar els efectes del TGF- $\beta$ 1 sobre la transcripció de PFKFB3 per assajos d'activitat del promotor, ja que les 3.5 kb de la regió del promotor del gen PFKFB3 que disposem al laboratori no responen a TGF- $\beta$ 1, això no exclou la possibilitat de que la seqüència responsable de la inducció transcripcional de PFKFB3 estigui en una regió diferent de la que tenim clonada. Ssegons els nostres resultats, la regulació de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 es dóna a través d'un mecanisme transcripcional que involucra a les Smads i a més l'anàlisi de les regions conservades evolutivament del

promotor de PFKFB3 mitjançant el programa ECR Browser va desvelar la presència d'un lloc d'unió per Smads altament conservat en rata, ratolí, gos, vaca, mono, chimpanzé i humà entre la posició -3766 i -3758 des de l'inici de transcripció del gen humà de PFKFB3.

En quan al paper fisiològic de PFKFB3, els resultats obtinguts indiquen que l'activitat de l'isoenzim PFKFB3 proporciona la capacitat de les cèl·lules T98G de formar colònies en resposta a TGF- $\beta$ 1, que és una de les característiques de la transformació cel·lular.

En resum, els resultats obtinguts en aquest capítol clarament indiquen que TGF- $\beta$ 1 juga un paper important en la reprogramació metabòlica. La inducció de PFKFB3 en resposta a aquest factor pot ser un dels principals mecanismes implicats en aquesta reprogramació de les cèl·lules de glioblastoma indicant que la inhibició d'aquest isoenzim podria ser una alternativa efectiva a les teràpies tradicionals contra el glioblastoma.

Actualment, la via de senyalització del TGF- $\beta$  es considera una diana terapèutica en els tumors avançats com el glioblastoma. Diferents fàrmacs enfront el TGF- $\beta$  es troben en assajos clínics i mostren resultats prometedors (Akhurst and Hata, 2012; Neuzillet et al., 2015; Seoane, 2008). L'estudi més detallat a nivell molecular dels mecanismes implicats en les funcions pro-tumorogèniques del TGF- $\beta$  permetria el descobriment de noves dianes terapèutiques, oferint una nova esperança en el tractament de molts pacients.

Els gliomes es caracteritzen per presentar una proliferació agressiva, infiltració difusa i resistència a radio i quimioteràpia. Donat que el TGF- $\beta$  té un paper important en la progressió del glioma, les teràpies dirigides contra el TGF- $\beta$ 1 o les seves vies de senyalització en combinació amb radio i quimioteràpia podria oferir una millor aproximació terapèutica. Encara que diferents estudis han demostrat els beneficis dels tractaments dirigits contra el TGF- $\beta$ 1 en glioma, la inhibició de la unió del TGF- $\beta$ 1 al seu receptor o de l'activitat quinasa d'aquest pot donar lloc a l'activació de vies compensatòries per altres activadors de les vies de Smad o per factors independents de Smads. Per això, a més d'inhibir la via de TGF- $\beta$ 1, s'hauria de bloquejar de manera simultània altres vies com la de PI3K/Akt, p38, etc., per obtenir una millor eficàcia del tractament. En alguns assajos clínics estan avaluant l'efecte de l'inhibidor de l'activitat



quinasa del receptor tipus I de TGF- $\beta$ 1 en combinació amb un inhibidor de diferents tirosina quinases i Raf quinases, Sorafenib, en carcinoma hepatocel·lular (Sun et al., 2016)

Com ja s'ha comentat en la introducció, les cèl·lules normals diferenciades preferentment utilitzen la fosforilació oxidativa mitocondrial per la producció d'energia. En canvi, la majoria de cèl·lules canceroses, com és el cas del glioblastoma multiforme, que és el tumor cerebral primari més comú en adults, depenen de la glicòlisi aeròbica (Li et al., 2016; Wolf et al., 2011). És per això que la reprogramació metabòlica ha sigut extensivament estudiada en el càncer, i molts agents terapèutics s'estan desenvolupant amb l'objectiu d'inhibir els requeriments metabòlics de les cèl·lules canceroses.

# DISCUSSIÓ GENERAL

---



Els resultats que es presenten en la memòria d'aquesta tesi doctoral aporten informació sobre la regulació del gen PFKFB3 en resposta a diferents estímuls i vies de senyalització.

La importància del gen PFKFB3 en la progressió tumoral va quedar reforçada l'any 1999 quan Chesney i col·laboradors, utilitzant oligonucleòtids *anti-sense* contra aquest gen, van observar que la mida dels tumors generats en ratolins immunodeprimits amb cèl·lules tumorals K562 transfectades amb oligonucleòtids eren menors que els generats en cèl·lules transfectades amb oligonucleòtids *sense*. A més, disminuïa la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, fosforibosil pirofosfat (PRPP), metabòlit precursor de la síntesi de nucleòtids sintetitzat a partir de la ribosa-5-P i ATP, i la proliferació de les cèl·lules K562. Així, es demostrava la regulació de l'expressió del gen PFKFB3 no només afectava la glicòlisi sinó també la proliferació cel·lular (Chesney et al., 1999b).

Posteriorment, altres estudis han demostrat la correlació entre l'increment de la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, el flux glicolític i la proliferació cel·lular, assenyalant l'important paper que exerceix aquest metabòlit en cèl·lules proliferants, ja siguin deguts a proliferació cel·lular induïda per agents mitogènics o processos tumorals. El gen PFKFB3 està sobreexpressat en la majoria de càncers (Novellademunt et al., 2013b) i la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> està augmentada en aquestes cèl·lules, regulant el flux glicolític i afavorint la proliferació. Les cèl·lules neoplàsiques expressen de forma constitutiva nivells més elevats de la proteïna PFKFB3, comparat amb les cèl·lules epitelials adjacents de teixits normals. En concret, el càncer de mama, pròstata, colon ovari i tiroides són els que presenten una major activació de l'expressió de PFKFB3 *in situ* (Atsumi et al., 2002). I moltes línies de càncer de mama mostren nivells alts de mRNA del gen PFKFB3, com les T47D, MCF7, MDA-MB-231 i MDA-MB-157 (Hamilton et al., 1997; Novellademunt et al., 2013b).

Diferents treballs, inhibint l'expressió d'aquest gen o l'activitat de l'isoenzim que codifica, han demostrat que és una diana important en la regulació del metabolisme de les cèl·lules canceroses, la proliferació cel·lular i l'angiogènesi (Calvo et al., 2006; De Bock et al., 2013; Han et al., 2017; Trenti et al., 2017). Conèixer els factors que regulen la seva

expressió, així com les diferents vies de transducció de senyals que hi participen, pot permetre dissenyar nous mètodes terapèutics basats en la seva inhibició.

Els resultats que el nostre grup ha publicat sobre la regulació del gen PFKFB3 (Calvo et al., 2006; Novellademunt et al., 2012, 2013c; Obach et al., 2004; Riera et al., 2002, 2003; Schoors et al., 2014; Simon-Molas et al., 2016) junt amb els obtinguts per altres grups (Atsumi et al., 2002; Bando et al., 2005; Chesney et al., 1999a; Clem et al., 2008; Doménech et al., 2015; Garcia-Cao et al., 2012; Hamilton et al., 1997; Houddane et al., 2017; Imbert-Fernandez et al., 2014; Minchenko et al., 2002; Telang et al., 2006; Yalcin et al., 2009), corroboren el paper clau que podria jugar aquest gen en l'adaptació del fenotip glicolític de les cèl·lules proliferants o tumorals.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi aprofundeixen encara més en l'estudi de dos factors de regulació importants, com són la insulina i el TGF- $\beta$ 1, i les vies de transducció implicades en la regulació de l'expressió del gen PFKFB3 i la regulació de l'isoenzim que codifica en un model de adenocarcinoma de colon i en un model de glioblastoma multiforme, respectivament.

Els resultats previs del grup havien demostrat que el gen PFKFB3 és un gen de resposta primerenca enfront la hipòxia (Obach et al., 2004), progestàgens (Novellademunt et al., 2012) o estímuls d'estrès (Novellademunt et al., 2013c). Es va observar que els progestàgens utilitzaven dos mecanismes per regular l'isoenzim PFKFB3 en les cèl·lules T47D: una resposta molt ràpida a través de la via ERK-RSK activada que porta a la fosforilació de la Ser461 de l'isoenzim PFKFB3; i un segon efecte, més tardà en el temps, a través del qual s'activa la transcripció del mRNA de PFKFB3 a través de seqüències *cis* localitzades al seu promotor que donen lloc a un increment de la quantitat de proteïna PFKFB3 total disponible a la cèl·lula. En aquest article es va demostrar que la fosforilació de la Ser461 de l'isoenzim PFKFB3 correlaciona amb un increment de la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> la qual activa al·lostèricament a la PFK-1 donant lloc a un increment del flux glicolític (Novellademunt et al., 2012).

Aquesta regulació de PFKFB3 a través dels dos mecanismes que s'acaben de mencionar també s'ha descrit en resposta a estímuls d'estrès en les cèl·lules Hela i T98G. En aquest cas, en resposta al tractament amb anisomicina o altres factors d'estrès, l'isoenzim PFKFB3 es fosforila a la Ser461 a temps curts donant lloc a un increment molt ràpid de la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> a través de la via de p38/MK2 MAPK. A temps més llargs, l'anisomicina indueix la transcripció del gen PFKFB3 a través de l'activitat quinasa de la MK2 que fosforila el factor SRF (*Serum response factor*) facilitant la unió a la seqüència SRE (*Serum response element*) present en el promotor humà de PFKFB3 (Novellademunt et al., 2013). En conjunt, els resultats d'aquests estudis suggereixen un mecanisme multimodal que afecta la regulació transcripcional del gen PFKFB3 i l'activació de la subunitat quinasa de l'isoenzim que codifica, a través de la fosforilació de la Ser461, que produeix un augment en la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i l'estimulació del flux glicolític.

Els resultats presentats en el primer capítol d'aquesta tesi descriuen els mecanismes de regulació de PFKFB3 en resposta a insulina. Prèviament, ja s'havia descrit a PFKFB3 com un gen de resposta a insulina en les cèl·lules HT29 (Riera et al., 2002). En aquesta tesis demostrem que la insulina utilitza dos mecanismes per regular l'isoenzim PFKFB3: una resposta molt ràpida a través de la via PI3K/Akt activada que porta a la fosforilació de la Ser 461 de PFKFB3; i un segon efecte, més tardà en el temps, a través del qual s'activa la transcripció del mRNA de PFKFB3 a través de seqüències localitzades al seu promotor que donen lloc a un increment de la quantitat de proteïna PFKFB3 total disponible en la cèl·lula. La fosforilació de la Ser 461 de PFKFB3 correlaciona amb un increment en la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i en la producció de lactat. En aquest augment de Fru-2,6-P<sub>2</sub> també hi participa l'isoenzim PFKFB2, essent l'activació dels dos isoenzims a través de la via de PI3K/Akt. Resultats previs del nostre laboratori, mostraven també la participació de l'isoenzim PFKFB2 en la síntesi de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en cèl·lules Hela i T98G en resposta a NaCl. Així doncs, en el model cel·lular HT29, la regulació de PFKFB3 a curt termini en resposta a la insulina implica la fosforilació dels isoenzims PFKFB2 (Ser 466 i Ser 483) i PFKFB3 (Ser 461) fet que produeix un increment en la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Aquesta fosforilació dels isoenzims i l'augment en la concentració del metabòlit són dependents de l'activitat PI3K, tal com s'observà a l'utilitzar l'inhibidor Akti i LY294002. En quant a la

regulació de PFKFB3 a llarg termini, la inducció transcripcional d'aquest gen ajudaria a mantenir els nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat elevats en les cèl·lules HT29. Malgrat que hem confirmat la implicació de la seqüència *E-box* en l'increment de l'activitat luciferasa en resposta a insulina, caldria profunditzar en l'estudi de la regulació transcripcional del gen PFKFB3 per aquesta hormona fins a trobar el factor de transcripció implicat en aquesta resposta.

La via de PI3K/Akt es troba comunament hiperactivada en els càncers humans, a causa de les mutacions freqüents dels enzims PI3K/Akt o PTEN, donant pas a la proliferació cel·lular, creixement, supervivència i reprogramació metabòlica (Thorpe et al., 2015). Les PI3Ks són una família de quinases lipídiques implicades en la senyalització a partir d'estímuls de supervivència com els factors de creixement, citoquines, hormones, etc., que activen vies dependents i independents d'Akt (Thorpe et al., 2015). Akt és una serina/treonina quinasa que majoritàriament és regulada per l'activació de PI3K i a través de la seva fosforilació a la Thr308 i Ser473 (Altomare and Testa, 2005; Liu et al., 2014). Com que és molt freqüent la presència d'Akt activa de forma constitutiva en els tumors humans, i aquesta és una proteïna central de la via de PI3K/Akt, molts estudis es centren en la inhibició dels components d'aquesta via com a teràpia contra el càncer (Altomare and Testa, 2005; Garcia-Cao et al., 2012) .

Els resultats presentats en el segon capítol d'aquesta tesi descriuen els mecanismes de regulació de PFKFB3 en resposta a TGF- $\beta$ 1. Els nostres resultats demostren que TGF- $\beta$ 1 indueix l'expressió de diferents gens de la glicòlisi com són GLUT1, HK-II i LDH-A sent consistent amb diferents estudis on descriuen que TGF- $\beta$  està implicat en la reprogramació metabòlica augmentant la glicòlisi en diferents línies cel·lulars (Arrick et al., 1992; Bernard et al., 2015; Guido et al., 2012; Jiang et al., 2015; Nigdelioglu et al., 2016; Nowak and Schnellmann, 1996; Young et al., 2014; Zhang et al., 2014). TGF- $\beta$ 1 indueix la transcripció del gen PFKFB3 però, a diferència de la regulació de PFKFB3 per insulina, descrita en el capítol anterior, i dels treballs publicats per Novellasdemunt et al. en resposta a progestàgens i estrès cel·lular, no regula l'isoenzim de PFKFB3 a nivell post-

traduccional, en les cèl·lules T98G. Coherentment amb aquest increment en el mRNA de PFKFB3, els nivells de proteïna total de PFKFB3 també augmenten i es correlaciona amb un increment en la concentració intracel·lular de Fru-2,-6-P<sub>2</sub> i de lactat extracel·lular. En quant a la via de senyalització, els resultats obtinguts mostren que l'activació de les vies de Smad3, p38 MAPK i PI3K/Akt, que són dependents de l'activitat quinasa del receptor de TGF-β1, és necessària per la completa inducció transcripcional de PFKFB3 en resposta a TGF-β1. Els nostres resultats indiquen que l'activitat de PFKFB3 proporciona la capacitat de les cèl·lules T98G de formar colònies en resposta a TGF-β1, que és una de les característiques de la transformació cel·lular.

Actualment, la via de senyalització del TGF-β es considera una diana terapèutica en els tumors avançats com el glioblastoma. Diferents agents contra el TGF-β es troben en assajos clínics i mostren resultats prometedors (Akhurst and Hata, 2012; Neuzillet et al., 2015; Seoane, 2008). L'estudi més detallat, a nivell molecular, dels mecanismes implicats en les funcions pro-tumorigèniques del TGF-β podria permetre el descobriment de noves dianes terapèutiques, oferint una nova esperança en el tractament del glioblastoma.

La glicòlisi de les cèl·lules tumorals és un fenomen complex en el qual aquesta i altres vies metabòliques es reprogramen per tal de millorar l'obtenció d'energia i la síntesi de biomolècules, necessàries per a la proliferació cel·lular. La comprensió de la regulació dels gens i els isoenzims glicolítics té, per tant, implicacions en el diagnòstic, el pronòstic i el desenvolupament de teràpies més selectives contra el càncer.

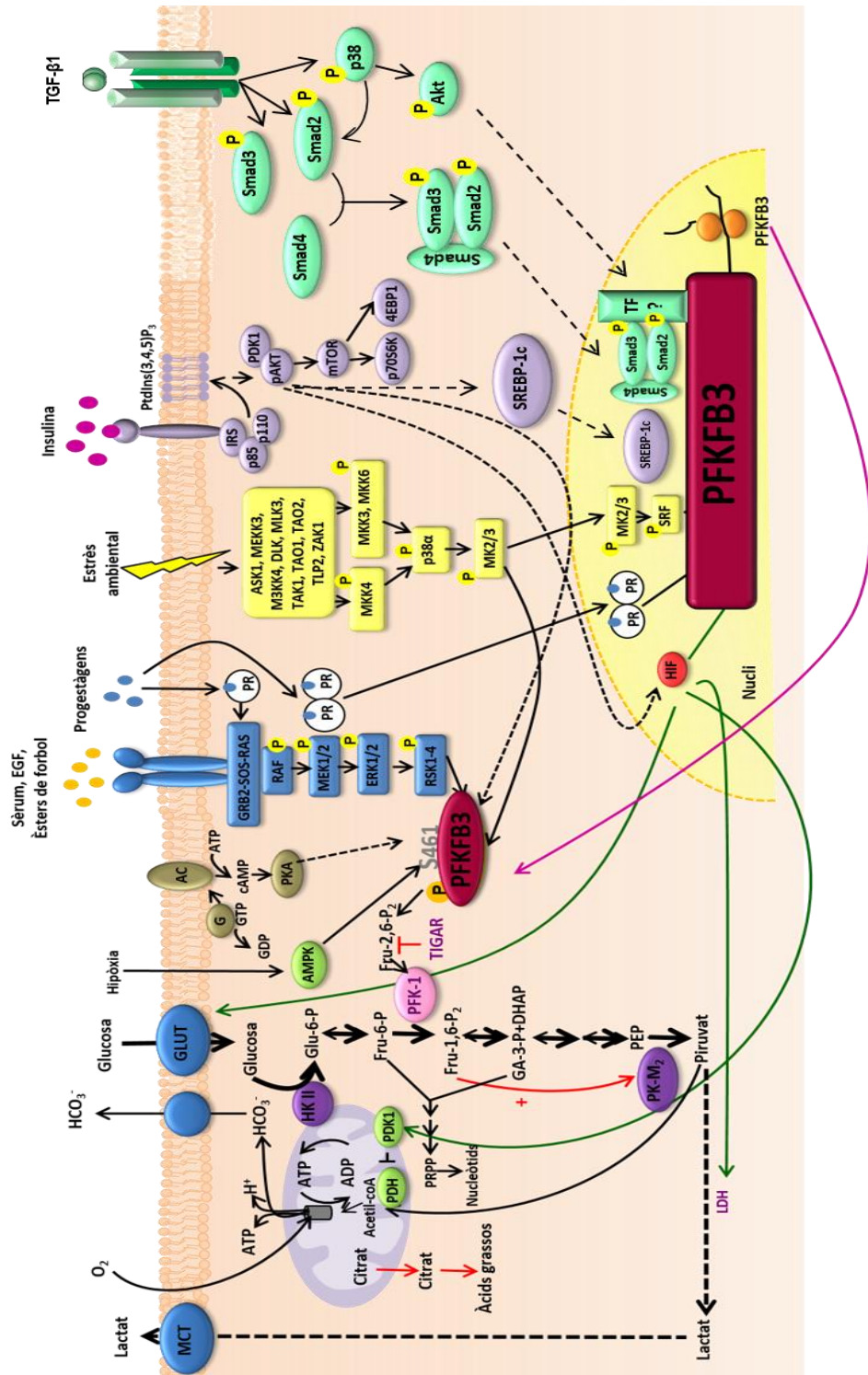
Els resultats publicats del nostre grup els darrers anys sobre PFKFB3 (Obach et al., 2004; 2006; Novellademunt et al., 2012; Novellademunt et al., 2013; Simon-Molas et al., 2016), juntament amb els obtinguts en el present treball de tesi doctoral, demostren que diversos factors implicats en la regulació del gen PFKFB3 i el producte d'aquest, l'isoenzim PFKFB3, participen en processos que afecten a la proliferació, supervivència, diferenciació i migració, tots ells esdeveniments claus en la tumorigènesi i els resultats mostrats en aquest capítol mostren un lligam entre la via de PI3K/Akt i de TGF-β1 i el



gen PFKFB3. A la **Figura 24** es poden veure els diferents factors que regulen el gen i l'isoenzim PFKFB3 i els mecanismes de transducció emprats.

En conjunt, els resultats presentats en aquesta tesi aporten noves dades de la regulació del gen PFKFB3 i l'isoenzim que codifica en resposta a diferents estímuls a través de diferents mecanismes de transducció, des del control de l'expressió del gen, fins a les modificacions post-traduccionals per fosforilació.

La dependència de les cèl·lules canceroses del consum de glucosa ha permès dissenyar diferents propostes terapèutiques. Des del punt de vista farmacològic, les drogues capaces de pertorbar el metabolisme, específicament la glicòlisi, han esdevingut cada vegada més interessants (Li et al., 2017; Yoshida, 2015; Yu et al., 2015). En relació al gen estudiat, s'ha pogut demostrar que bloquejant l'expressió del gen PFKFB3 disminueix la glicòlisi, la proliferació cel·lular, el creixement independent d'ancoratge, el creixement tumoral i l'angiogènesi (Calvo et al., 2006; De Bock et al., 2013; Doménech et al., 2015; Han et al., 2017; Trenti et al., 2017). És evident que la glicòlisi de les cèl·lules canceroses és un fenomen complex en el qual aquesta i altres vies metabòliques es reprogramen per tal de millorar l'obtenció d'energia i la síntesi de biomolècules, necessàries per la proliferació cel·lular. La comprensió de la regulació dels gens i isoenzims glicolítics ha de tenir, ben segur, implicacions en el diagnòstic, pronòstic i desenvolupament de teràpies més selectives contra el càncer.



**Figura 24. Representació esquemàtica de les diferents vies de regulació del gen i isoenzim de PFKFB3 i la seva contribució en el fenotip glicolític de les cèl·lules tumorals.** Diferents estímuls com són els progestàgens, èsters de forbol, sèrum, factors de creixement, citoquines inflamatòries estressos ambientals insulina i TGF- $\beta$ 1 poden activar l'isoenzim PFKFB3. En resposta a l'activació de diverses vies MAPKs, PFKFB3 pot fosforilar-se a la Ser 461 incrementant així l'activitat PFK-2. Apart, diversos factors de transcripció poden regular el gen PFKFB3 portant, en últim terme, a un increment de la proteïna PFKFB3. En conjunt, ambdós mecanismes permeten augmentar el flux glicolític a través de l'increment de la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> per l'isoenzim PFKFB3, el qual és el principal regulador al·lostèric positiu de la PFK-1.

# CONCLUSIONS

---



La insulina regula PFKFB3 en les cèl·lules HT29 a través de dos mecanismes diferents: per modificació post-traducciona de l'isoenzim, a temps curts, i per regulació transcripcional del gen, a temps més llargs.

1. A temps curts, de l'ordre de minuts, el tractament amb insulina activa els isoenzims PFKFB3 i PFKFB2 a través de la fosforilació a la Ser461, i a la Ser466 i Ser478, respectivament, donant lloc a un augment molt ràpid de la concentració intracel·lular de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat.
2. La fosforilació dels isoenzims PFKFB3 i PFKFB2 és dependent de la via de PI3K/Akt, ja que la inhibició d'aquesta evita la fosforilació dels isoenzims en resposta a insulina.
3. A temps llargs, la insulina augmenta l'expressió del mRNA de PFKFB3 però no dels mRNA de PFKFB2 ni PFKFB4. Aquesta inducció transcripcional de PFKFB3 permet mantenir altes concentracions de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de lactat .
4. La inducció transcripcional del gen PFKFB3 és parcialment revertida mitjançant l'ús de l'inhibidor d'Akt, indicant la participació de la via d'Akt en la seva regulació.
5. Les dues seqüències consens de la caixa *E-box*, localitzades entre els nucleòtids -1269 i -1297 relatiu a l'inici de transcripció del promotor humà de PFKFB3, són necessàries per a la inducció transcripcional d'aquest gen per insulina, ja que la mutació d'aquestes seqüències anul·la totalment l'activació del promotor.
6. Un dels elements de resposta a insulina que s'ha descrit que es pot unir a aquestes *E-boxes* és el factor de transcripció SREBP-1c. Els resultats obtinguts de l'ús del siRNA per SREBP-1c suggereixen la seva implicació en la inducció de PFKFB3 per insulina, tot i que faltaria confirmar-la a través d'altres aproximacions.

7. Tant la silenciació de PFKFB3 mitjançant siRNA com la seva inhibició amb 3PO no té cap efecte sobre l'activació de la via d'Akt per insulina.
8. TGF- $\beta$ 1 incrementa l'expressió de gens clau de la via glicolítica: GLUT1, HK-II, LDH-A i PFKFB3 en les cèl·lules T98G. Tot i que aquestes cèl·lules també expressen PFKFB2 i PFKFB4, aquests gens no es modulen per TGF- $\beta$ 1.
9. L'augment del mRNA de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 dóna lloc a un augment de la seva proteïna que, com a conseqüència, produeix la síntesi de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i incrementa la producció de lactat.
10. La regulació de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 es dóna a nivell transcripcional i no requereix la síntesi *de novo* de proteïnes.
11. En la inducció transcripcional de PFKFB3 per TGF- $\beta$ 1 hi participen les vies de Smad, p38 MAPK i PI3K/Akt, conjuntament, i són dependents de l'activitat del receptor de TGF- $\beta$ 1. L'activació de la via de p38 MAPK regula l'activació de Smad2 i Akt. En canvi, l'activació de Smad3 és independent de la via de p38 MAPK.
12. PFKFB3 és indispensable en l'augment de la capacitat de les cèl·lules T98G de formar colònies en resposta a TGF- $\beta$ 1.

# MATERIALS I MÈTODES

---





# Índex de Materials i Mètodes

---

<b>1. Tècniques de Biologia Molecular .....</b>	<b>179</b>
1.1 Cultius bacterians.....	179
1.1.1 Creixement en medi de cultiu líquid i sòlid .....	179
1.1.2 Obtenció de cèl·lules competents.....	180
1.1.3 Transformació de plasmidis de DNA.....	180
1.1.4 Estoc de glicerol.....	181
1.1.5 Plasmidis utilitzats.....	182
1.2 Purificació de DNA plasmídic a partir de cultius bacterians.....	183
1.3 Digestió enzimàtica del DNA .....	183
1.4 Electroforesi de DNA en gel d'agarosa.....	184
1.5 Purificació de bandes d'un gel de DNA.....	184
1.6 Desfosforilació dels extrems 5' i 3' del DNA .....	184
1.7 Lligació.....	185
1.8 Amplificació de fragments de DNA per PCR.....	186
1.9 Extracció de RNA.....	187
1.10 Electroforesi de RNA en gels de agarosa.....	189
1.11 Retrotranscripció.....	191
1.12 PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR) .....	192
<b>2. Tècniques de cultiu cel·lular .....</b>	<b>193</b>
2.1 Línies cel·lulars .....	193

2.2 Congelació de cèl·lules.....	194
2.3 Descongelació de cèl·lules .....	194
2.4 Reactius utilitzats per al tractament de les cèl·lules.....	195
2.5 Transfecció .....	196
2.6 Activitat luciferasa.....	196
2.7 Silenciament de gens mitjançant RNA de interferència (siRNA).....	197
2.7.1 Oligofectamine .....	197
2.7.2 Lipofectamine RNAiMAX.....	198
<b>3. Anàlisi de proteïnes.....</b>	<b>199</b>
3.1 Obtenció de mostres .....	199
3.1.1 Extractes totals a partir de cèl·lules en cultiu utilitzant el tampó CHAPS	199
3.1.2 Extractes totals a partir de cèl·lules en cultiu utilitzant el tampó 2% SDS.....	200
3.2 Valoració de la concentració de proteïnes.....	201
3.2.1 Mètode Bradford .....	201
3.2.2 Mètode BCA.....	201
3.3 Western Blot.....	202
3.3.1 Preparació de mostres .....	202
3.3.2 Electroforesi desnaturalitzant en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)	202
3.3.3 Transferència de proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa .....	204
3.3.4 Detecció de proteïnes mitjançant anticossos.....	206
<b>4. Purificació d'anticossos per cromatografia afinitat.....</b>	<b>209</b>
<b>5. Determinació de metabòlits.....</b>	<b>210</b>

5.1 Fructosa-2,6-Bifosfat (Fru-2,6-P <sub>2</sub> ) .....	210
5.1.1 Purificació de la P <sub>Pi</sub> -PFK .....	210
5.1.2 Dessalat dels enzims .....	212
5.1.3 Preparació dels substrats .....	213
5.1.4 Preparació de la mostra a partir de cèl·lules en cultiu .....	213
5.1.5 Determinació de Fru-2,6-P <sub>2</sub> .....	214
5.2 Lactat extracel·lular .....	216
<b>6. Assaig clonogènic .....</b>	<b>217</b>



# 1. Tècniques de Biologia Molecular

## 1.1 Cultius bacterians

En aquesta tesi s'ha utilitzat la soca de bacteries DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. La manipulació de les bacteries s'ha realitzat en condicions d'esterilitat.

### 1.1.1 Creixement en medi de cultiu líquid i sòlid

- Creixement en medi líquid: Les bacteries creixen en medi LB (Luria-Berani) en un erlenmeyer (no omplir més de dues tercers parts per assegurar una bona oxigenació del cultiu) amb agitació (220 rpm) a 37 °C durant 14-16 hores (*overnight*, O/N).

En el cas de que las cèl·lules estiguin transformades amb un plasmidi, s'afegeix al medi LB l'antibiòtic corresponent a la resistència per ha que codifica el plasmidi amb l'objectiu d'exercir pressió selectiva a aquelles cèl·lules que hagin incorporat el DNA.

- Creixement en medi sòlid: Aquest tipus de creixement es realitza en plaques de LB-Agar i hauran d'incloure l'antibiòtic pertinent. Les plaques es deixen cap per avall per tal d'evitar que el vapor d'aigua impregni el medi de cultiu i s'incuben durant 14-16 hores a 37 °C.

Medi LB líquid	Medi LB-Agar
5 g/L de NaCl	5 g/L de NaCl
10 g/L de Triptona/Peptona	10 g/L de Triptona/Peptona
5 g/L d'extracte de llevat	5 g/L d'extracte de llevat
	12 g/L d'agar

### 1.1.2 Obtenció de cèl·lules competents

Inocular cèl·lules de *Escherichia coli* a partir d'un estoc de glicerol en 3 ml de LB sense antibiòtic. Es deixa créixer durant 16-18 h en agitació a 37 °C.

- Passar 2 ml del creixement a un erlenmeyer amb 100 ml de LB sense antibiòtic (dilució 1:50). Es deixa créixer durant aproximadament 2 h en agitació a 37 °C fins que la densitat òptica a  $\lambda=600$  nm estigui entre 0.35-0.5 (fase exponencial del creixement).
- Posar el creixement en gel durant 30 minuts.
- Passar el cultiu a tubs prèviament refredats de 50 ml i centrifugar a 2500 rpm 15 min a 4 °C.
- A partir d'aquest punt, tot el procediment es realitza a 4°C i amb les solucions i materials prèviament refredats.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el precipitat amb CaCl<sub>2</sub> 0.1 M afegint primer 1 ml i després fins a 5 ml (important utilitzar-lo hidratat. Es pot esterilitzar per filtració o per autoclau).
- Afegir 125 µl de DMSO als 5 ml de cèl·lules competents. Barrejar suaument i deixar 5 minuts en gel.
- Tornar a afegir 125 µl de DMSO i barrejar-ho per inversió.
- Aliquotar en fraccions de 200 o 500 µl i guardar ràpidament a -80 °C.

### 1.1.3 Transformació de plasmidis de DNA

- Descongelar una alíquota de cèl·lules competents en gel.
- Afegir 50 ng de plasmidi en 50 µl de cèl·lules competents (si és una lligació afegir 5 µl d'aquesta).
- Xoc tèrmic: Barrejar i deixar 30 min en gel. Després les cèl·lules es posen 45 segons en un bany a 42 °C i es tornen a posar en gel durant 5 min.

- A la campana de bacteris, afegir 1 ml de LB sense antibiòtic i posar en agitació 30-45 min a 37 °C.
- Centrifugar 10 min a 4000 rpm per precipitar les cèl·lules.
- Descartar el sobrenedant deixant 200 µl per resuspendre el precipitat.
- Plaquejar, amb l'ajuda de les boletes de vidre, els 200 µl en plaques de LB-agar amb l'antibiòtic adequat i deixar créixer O/N a 37 °C.

Controls del procés de transformació per detectar possibles contaminacions:

- Control negatiu de les plaques de LB-agar: incubar una placa que no s'ha sembrat amb bactèries.
- Control negatiu de les cèl·lules competents: sembrar cèl·lules competents que no han sigut transformades.

#### **1.1.4 Estoc de glicerol**

- Inocular una colònia aïllada en 5 ml de medi LB amb l'antibiòtic adequat.
- Incubar O/N en agitació a 37 °C.
- Agafar 810 µl del cultiu i afegir 190 µl de glicerol al 80% (v/v) estèril, de manera que el percentatge final és del 15%.
- Barrejar pipetejant amunt i avall i guardar a -80 °C.



### 1.1.5 Plasmidis utilitzats

Plasmidi	Proteïna	Promotor	Antibiòtic	Aplicació
<b>PFKFB3/-3566</b>	Luciferasa	PFKFB3	Ampicil·lina	Assaig luciferasa
<b>PFKFB3/-2492</b>	Luciferasa	PFKFB3	Ampicil·lina	Assaig luciferasa
<b>PFKFB3/-1408</b>	Luciferasa	PFKFB3	Ampicil·lina	Assaig luciferasa
<b>29WT-cfos</b>	Luciferasa	c-fos/HRE	Ampicil·lina	Assaig luciferasa
<b>29Mut-cfos</b>	Luciferasa	c-fos/HRE	Ampicil·lina	Assaig luciferasa
<b>pGL2basic</b>	Luciferasa		Ampicil·lina	Assaig luciferasa
<b>cfos-pGL2basic</b>	Luciferasa	c-fos	Ampicil·lina	Assaig luciferasa
<b><math>\beta</math>-Gal</b>	Luciferasa	CMV	Ampicil·lina	Assaig luciferasa
<b>Myc-Smad3</b>	myc-Smad3		Ampicil·lina	Expressió en cèl·lules de mamífer
<b>Flag-Smad4</b>	Flag-Smad4		Ampicil·lina	Expressió en cèl·lules de mamífer
<b>pcDNA3</b>			Ampicil·lina	Expressió en cèl·lules de mamífer
<b>SREPB-1c</b>	SREBP-1c		Ampicil·lina	Expressió en cèl·lules de mamífer

---

## 1.2 Purificació de DNA plasmídic a partir de cultius bacterians

- A petita escala: **Miniprep**

Es parteix d'un cultiu bacterià de 5 ml i seguir las instruccions del kit de miniprep *Exprep Plasmidi SV* (GeneAll Biotechnology). Un cop tenim el plasmidi purificat, aquest es digereix amb enzims de restricció per confirmar que es tracta del plasmidi correcte. El procediment s'explica en l'apartat de materials i mètodes 1.1.6.

- A gran escala: **Maxiprep**

Es parteix d'un cultiu bacterià de 250-500 ml i seguir el protocol del kit de maxiprep *Quiafilter Plasmidi Maxi Kit* (Quiagen).

Per determinar la concentració de DNA plasmídic utilitzem el NANODROP. La puresa del DNA la indica la relació  $A_{260}/A_{280}$ . Es considera que una solució de DNA pura té un valor de  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8-2.

## 1.3 Digestió enzimàtica del DNA

De forma general utilitzem:

### Digestió enzimàtica (20 $\mu$ l)

1  $\mu$ g de DNA plasmídic

1  $\mu$ l d'enzim de restricció

2  $\mu$ l de tampó 10X

Fins a 20  $\mu$ l d'aigua estèril

La digestió s'incuba durant 1 h a 37 °C. En el cas de fer una digestió doble, utilitzarem la meitat del volum de cada un dels enzims i un tampó on els dos enzims tinguin activitat.

## 1.4 Electroforesi de DNA en gel d'agarosa

El percentatge del gel d'agarosa dependrà de la mida dels fragments de DNA que es vulguin obtenir. En el nostre cas el més utilitzat ha sigut el de 1 % de agarosa. Al gel se li afegeix bromur d'etidi (0,5 µg/ml), el qual s'intercala en les bases nitrogenades del DNA i al aplicar llum ultraviolada apareix una banda blanca corresponent al DNA.

- Es carrega part de la mostra de DNA amb tampó de càrrega 10X als pouets del gel d'agarosa.
- La cubeta s'omple de tampó TAE 1X i l'electroforesi es fa a 85-100 V durant 20-30 min.

### TAE 50X (1 L)

242 g de Tris (40 mM)

100 ml d'EDTA al 0,5M (1 mM)

57,1 ml d'àcid acètic glacial (20 mM)

---

## 1.5 Purificació de bandes d'un gel de DNA

Col·loquem el gel d'agarosa damunt d'un transiluminador de llum ultraviolada per localitzar les bandes d'interès. Tallem la banda amb un bisturí i la col·loquem en un *ependorf*. El DNA de la banda el purifiquem utilitzant el kit *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

## 1.6 Desfosforilació dels extrems 5' i 3' del DNA

La fosfatasa alcalina (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, CIAP) és un enzim que treu els grups fosfats que estan al 5' i 3' del DNA, RNA i nucleòtids. Utilitzem aquest enzim per

desfosforilar el vector de DNA en el que volem clonar l'insert per tal d'evitar que el vector es recircularitzi durant la lligació.

#### Reacció CIAP (20 µl)

1 µg de DNA plasmídic lineal

2 µl de tampó 10X de CIAP

2 µl de *Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*

Fins a 20 µl d'aigua

Consisteix en incubar la CIAP amb el vector a 37 °C durant 10 minuts. Posteriorment, inactivem l'enzim incubant a 75 °C durant 5 minuts.

## 1.7 Lligació

Consisteix en unir un fragment de DNA (insert) dins d'un vector. La lligasa del bacteriòfag T4 catalitza la síntesi d'enllaços fosfodièster entre un extrem fosfat 5' i un extrem hidroxil 3' utilitzant ATP com a font d'energia per a la reacció.

Per calcular la quantitat d'insert que es necessita utilitzem la següent fórmula:

$$\text{ng Inserto} = [R \cdot \text{ng Vector} \cdot (\text{pb Insert} / \text{pb Vector})]$$

“R” és la relació molar entre el vector i l'insert, de forma general en aquesta tesi el valor de R ha sigut 3.

**Barreja de reacció per la lligació (20 µl)**

20-50 ng de DNA plasmídic

Y µl d'insert de DNA\*

2 µl de tampó de lligació 10X

0,4-0,8 µl de la solució d'ATP (25 mM)

1 µl de la T4 DNA lligasa (5 U/µl)

Fins 20 µl d'aigua estèril

---

\* El volum d'insert a afegir es calcula a partir dels ng d'insert e la fórmula anterior i la concentració de DNA de l'insert.

La reacció s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient o O/N a 16 °C. Les condicions poden variar segons si els extrems del DNA a lligar són roms o cohesius (consultar les dades del proveïdor de l'enzim).

## 1.8 Amplificació de fragments de DNA per PCR

La PCR (reacció en cadena de la polimerasa) la utilitzem per obtenir un gran número de còpies d'un fragment de DNA partint de poca quantitat d'aquest.

- Afegir a un *ependorf* estèril els següents reactius:

**Reacció de PCR (50 µl)**

1 µl de tampó de PCR 10X

1 µl de dNTPs (200 mM final de cadascun)

1 µl de cada oligonucleòtid (30 µM estoc)

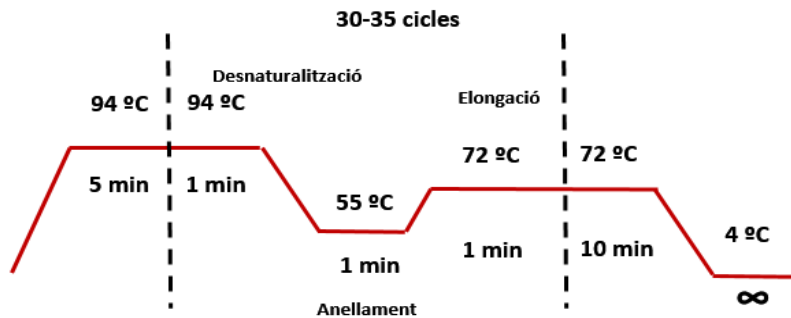
1 µl de DNA motlle o aigua en el control negatiu

1 µl de Taq polimerasa

µl d'aigua mQ estèril

---

- Col·locar les mostres al termociclador i utilitzar el següent programa:



Es poden optimitzar les següents condicions de la PCR:

- La temperatura d'anellament dependrà de la temperatura òptima dels oligonucleòtids (en general la temperatura és 2 °C per sota de la Temperatura de *melting* del primer ( $T_m$ )).
- El temps d'elongació dependrà de la mida de DNA a amplificar: 1 min/kb a elongar.

El producte de la PCR s'analitza en un gel de agarosa per comprovar la mida del fragment i el número de bandes obtingudes.

## 1.9 Extracció de RNA

El material que s'utilitza ha de ser estèril, l'aigua DEPC per evitar la degradació per RNAases i hem de treballar a la campana de tòxics.

Per a l'extracció de RNA de cèl·lules eucariotes:

- Afegir 0.5 ml de *TRI*sure per pou de placa de 6 pous.

- Escrapejar las plaques, transferir el contingut a un *ependorf* i deixar reposar 5 min a temperatura ambient.
- Afegir 0.2 ml de cloroform prèviament refredat per 1 ml de *TRIsure*, barrejar durant 15 segons per inversió e incubar durant 3 min a temperatura ambient.
- Centrifugar a 12000 g durant 15 min a 4 °C. S'obtenen dues fases, la fase orgànica (verda), una interfase i la fase aquosa que conté el RNA (incolora).
- Passem la fase aquosa a un *ependorf* nou (sense tocar la interfase).
- Precipitar el RNA afegint 200 µl d'isopropanol prèviament refredat, incubar les mostres 10 min a temperatura ambient i després congelar a -80 °C O/N.
- Centrifugar els *ependorfs* a 12000 g durant 10 min a 4 °C.
- Decantar el sobrenedant, afegir 1 ml de etanol al 75 % prèviament refredat per 1 ml de *TRIsure* afegit i fer un vòrtex.
- Centrifugar a 7500 g durant 5 min a 4 °C. Repetir el rentat amb etanol dos cops.
- Decantar el sobrenedant i treure el màxim volum d'etanol possible amb una pipeta sense emportar-nos el precipitat.
- Deixar els *ependorfs* a la campana per assecat tot l'etanol.
- Resuspendre el RNA en 15 µl d'aigua DEPC i guardar a la nevera O/N.
- Escalfar les mostres a 65 °C durant 10 min i fer un vòrtex abans de quantificar el RNA.
- Per determinar la concentració de RNA utilitzem el NANODROP. La puresa del RNA ho indica la relació A260/A280. Es considera que una solució de RNA pura té un valor de A260/A280  $\geq 2$ . Si el valor és inferior indica contaminació per proteïnes o substàncies aromàtiques com el fenol.
- La integritat del RNA es comprova mitjançant electroforesi de gel d'agarosa al 1% (veure mètodes 1.1.13). Si en el gel es diferencien dues bandes corresponents al RNA ribosòmic 28S (4,8 kb) i 18S (1,8 kb) indica que el RNA no està degradat.

## 1.10 Electroforesi de RNA en gels de agarosa

- Preparar el gel d'agarosa:

**50 ml gel 1 % agarosa/formaldehid**

36 ml d'aigua

5 ml de MOPS 10X

0,5 g d'agarosa

Escalfar fins a dissoldre l'agarosa i deixar refredar fins 55-65 °C

9 ml de formaldehid 37 %

---

- Preparar les mostres de RNA

**Mostres RNA**

2 µl de RNA

6,4 µl de tampó de mostra per a RNA

1,4 µl de tampó de càrrega per a RNA

---

- Incubar les mostres de RNA 10 min a 65 °C per desfer les possibles estructures secundàries del RNA i, immediatament, posar-les en gel.



- Carregar les mostres en el gel d'agarosa/formaldehid i córrer l'electroforesi a 80 V durant 40 min.

**MOPS 10X**

0,2 M de MOPS

50 mM d'acetat sòdic

5 mM d'EDTA

---

**Tampó de càrrega per RNA 10X**

50 % de glicerol

0,4 % de blau de bromofenol

0,4 % de xilè cianol

---

**Tampó de mostra per RNA**

6 % de formaldehid

20 mg/ml de bromur d'etidi

50 % de formamida

6 % de glicerol

---

**Tampó d'electroforesi**

MOPS 1X en aigua DEPC o autoclavada

---

## 1.11 Retrotranscripció

Síntesis de DNA a partir de RNA utilitzant el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystem).

- Calcular el volum que necessitem de cada mostra per retrotranscriure 2 µg de RNA i afegir aigua mQ fins a 10 µl.
- Preparar els següents reactius en un *ependorf* per a totes les mostres.
- Per a una reacció amb un volum final de 10 µl:

### Volum final de 10 µl per reacció

2 µl de tampó de reacció 10X

0,8 µl de 25 dNTP Mix (100 mM)

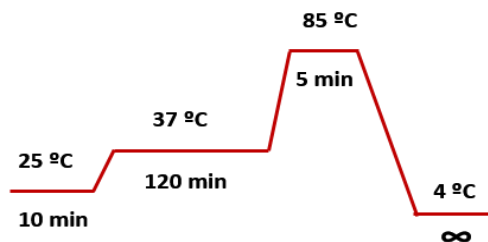
2 µl de *Random primers* 10X

1 µl de *Reverse transcriptase*

3,2 µl d'aigua estèril

És important que les reaccions siguin volum:volum entre el RNA amb l'aigua i la barreja de reacció.

- Afegir a cada mostra 10 µl de la barreja de reacció.
- Posem la PCR amb el següent programa:



## 1.12 PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR)

La RT-qPCR s'utilitza per determinar els valors relatius de les mostres tractades respecte a les control mitjançant el càlcul del  $\Delta\Delta ct$ .

### Càlcul dels valors relatius de mRNA

$$\Delta ct = ct \text{ gen problema} - ct \text{ gen control}$$

$$\Delta\Delta ct = \Delta ct \text{ mostra tractada} - \Delta ct \text{ mostra control}$$

$$\text{Quantitat relativa de mRNA} = 2^{(-\Delta\Delta ct)}$$

---

La RT-qPCR es realitza en l'ABI PRISM HT7700 Real Time Esquence Detection System (Applied Biosystem) amb plaques de 384 pous. És important evitar que la llum toqui als oligonucleòtids i cal que tot el material que s'utilitzi sigui autoclavat.

- Preparar la mostra segons el número de pous a carregar la mateixa mostra:

Per un pou: 0,5  $\mu$ l de mostra + 4,5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O mQ

- Preparar la barreja de reacció en un eppendorf per a totes les mostres.

Per una reacció:

0,5  $\mu$ l de oligonucleòtid + 5,5  $\mu$ l SensiFAST Probe Hi-ROX MIX (Bioline)

- Afegir 6  $\mu$ l de barreja de reacció i 5  $\mu$ l de mostra preparada per pou.
- La placa es centrifuga 2 min a 1200 rpm abans de posar-la a l'ABI PRISM.

**Sondes TaqMan utilitzades:**

Gen	Sonda TaqMan
<b>PFKFB1</b>	Hs00159997_m1
<b>PFKFB2</b>	Hs00359506_g1
<b>PFKFB3</b>	Hs00190079_m1
<b>PFKFB4</b>	Hs00190096_m1
<b>TBP</b>	Hs99999910_m1

Gen	Sonda TaqMan
<b>GLUT1</b>	Hs00892681_m1
<b>HK-II</b>	Hs00606086_m1
<b>LDH-A</b>	Hs01378790_g1
<b>SREBF1</b>	Hs01088690_g1
<b>GAPDH</b>	Hs99999905_m1

## 2. Tècniques de cultiu cel·lular

### 2.1 Línies cel·lulars

Les diferents línies cel·lulars utilitzades en aquesta tesi s'han mantingut en incubadors a 37 °C, amb una atmosfera al 5 % CO<sub>2</sub> i amb una humitat relativa del 70-80%. El medi de cultiu utilitzat ha sigut *high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementat amb L-glutamina (2 mM), antibiòtics (penicil·lina 100 U/ml i estreptomicina 100 µg/ml) i sèrum fetal boví (FBS) al 10% de Biological Industries.

**Línies cel·lulars utilitzades:**

Línea cel·lular	Tipus cel·lular	Referència
<b>HT29</b>	Adenocarcinoma de colon humà	ATCC
<b>T98G</b>	Glioblastoma multiforme humà	ATCC

## 2.2 Congelació de cèl·lules

- Rentar les cèl·lules amb PBS 1X i tripsinitzar-les. Parar la reacció amb DMEM complet.
- Centrifugar les cèl·lules a 1200 rpm durant 5 min.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el precipitat amb medi de congelació.

### Medi de congelació (per vial)

800 µl de DMEM complet

100 µl de FBS

100 µl de DMSO (dimetil sulfòxid)

---

- Immediatament guardar els vials a -80 °C ja que el DMSO a temperatura ambient és molt tòxic per les cèl·lules.
- Passar les cèl·lules a nitrogen líquid 24 hores després.

## 2.3 Descongelació de cèl·lules

Hi ha dues maneres de descongelar les cèl·lules:

- Descongelar el vial de cèl·lules i passar-lo a una placa de 10 cm amb 10 ml de DMEM complet. Canviar el medi de les cèl·lules per eliminar el DMSO un cop estiguin enganxades (6-7 hores).
- Descongelar el vial i passar les cèl·lules a un falcon de 15 ml. Centrifugar-les a 1200 rpm durant 5 min. Aspirar el sobrenedant per eliminar el DMSO i resuspendre el precipitat amb DMEM complet. Passar les cèl·lules a una placa de 10 cm amb 10 ml de DMEM complet.

## 2.4 Reactius utilitzats per al tractament de les cèl·lules

Producte	Concentració	Descripció	Proveïdor
<b>Insulina</b>	1 $\mu\text{M}$	Activador de via de PI3K/Akt	Sigma-Aldrich
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	4 ng/ml	Activador de via de TGF- $\beta$	R&D Systems
<b>Clorur de Cobalt (CoCl<sub>2</sub>)</b>	200 $\mu\text{M}$	Agent químic que mimetitza l'efecte de la hipòxia fisiològica	Sigma-Aldrich
<b>IGF-1</b>	100 ng/ml	Activador de via de PI3K/Akt	Sigma-Aldrich
<b>Akti-1/2</b>	10 $\mu\text{M}$	Inhibidor d'Akt	Calbiochem
<b>Wormanina</b>	10 $\mu\text{M}$	Inhibidor de PI3K	Calbiochem
<b>SB203580</b>	10 $\mu\text{M}$	Inhibidor de p38	Calbiochem
<b>LY294002</b>	10 $\mu\text{M}$	Inhibidor de PI3K	Calbiochem
<b>SIS3</b>	20 $\mu\text{M}$	Inhibidor de Smad3	Calbiochem
<b>3PO</b>	10 $\mu\text{M}$	Inhibidor de PFKFB3	Calbiochem
<b>LY2109761</b>	2 $\mu\text{M}$	Inhibidor del receptor de TGF- $\beta$	Eli-Lilly & Co
<b>Actinomicina D</b>	5 $\mu\text{g/ml}$	Inhibidor de la transcripció	Sigma-Aldrich
<b>Cicloheximida</b>	20 $\mu\text{g/ml}$	Inhibidor de la síntesi de proteïna	Sigma-Aldrich

## 2.5 Transfecció

### ***Lipofectamine LTX (Invitrogen)***

Transfecció transitòria basada en la formació de liposomes. S'utilitza per la transfecció de les línies cel·lulars HT29 i T98G.

- Las cèl·lules es plaquegen el dia abans i han d'estar entre el 50-80% de confluència en el moment de la transfecció.

Per un pou de placa de 6 pous:

- Diluir en un eppendorf 2 µg de DNA en 266 µl de Opti-MEM (*Reduced Serum Media*).
- Afegir 2 µl del reactiu *Plus* (ratio 1:1 DNA), fer un vòrtex i incubar durant 5 min a temperatura ambient.
- Afegir 5-15 µl de *Lipofectamine LTX* (depenent de la línia cel·lular), fer un vòrtex i incubar durant 30 min a temperatura ambient durant el qual es formen els complexos DNA-*Lipofectamine LTX*.
- Canviar el medi de les cèl·lules per Opti-MEM.
- Afegir els complexos i agitar suaument.
- No es necessari canviar el medi de les cèl·lules després de la transfecció.

## 2.6 Activitat luciferasa

- Co-transfectar las cèl·lules (utilitzant el mètode adequat per cada línia cel·lular) amb el reporter i un plasmidi d'expressió de β-galactosidasa (β-gal) per avaluar l'eficiència de la transfecció.
- Tripsinitzar les cèl·lules 24 hores després de la transfecció per passar-les a plaques de 24 pous.

- Dejunar durant 24 hores les cèl·lules (rentar dos cops amb PBS 1X i afegir DMEM sense FBS) un cop estiguin enganxades.
- Realitzar el tractament corresponent durant aproximadament 16-18 hores.
- Aspirar el medi i rentar dos cops amb PBS 1X.
- Afegir 100 µl per pou de placa de 24 pous de tampó de lisi del kit *Luciferases Assay System* (Promega).
- Lisar les cèl·lules a la placa durant 20 minuts en agitació i tapades de la llum.
- Agafar en un *ependorf* un total de 6 µl de mostra per condició per mesurar l'activitat β-galactosidasa i afegir 100 µl de tampó del β-galactosidasa *Detection Kit II* (Clontech) i deixar incubar 1 hora.
- L'activitat de les dues reaccions es mesura utilitzant el luminòmetre durant intervals de 10 segons.

## 2.7 Silenciació de gens mitjançant RNA de interferència (siRNA)

### 2.7.1 *Oligofectamine* (Invitrogen)

Transfecció dels dúplex de RNA de interferència corresponents utilitzant lípid catiónic per les cèl·lules T98G.

- Plaquejar les cèl·lules un dia abans perquè estiguin al 30-40 % de confluència en el moment de la transfecció.
- Si transfectem 75 nM de siRNA, per un pou d'una placa de 6 pous preparam:  
Epp.1: 3 µl siRNA (20 µM estoc) + 350 µl Opti-MEM → vòrtex durant 10 segons  
Epp.2: 3 µl *Oligofectamine* + 350 µl Opti-MEM → vòrtex durant 10 segons
- Incubar durant 5 minuts a temperatura ambient.



- Afegir el contingut del epp.2 sobre el epp.1 i fer un vòrtex de 10 segons.
- Incubar els complexos durant 20 minuts a temperatura ambient.
- Rentar les cèl·lules 2 cops amb PBS 1X.
- Afegir els complexos a les cèl·lules i agitar suaument.
- Afegir 1 ml de DMEM complet a partir de las 4-6 hores de la transfecció.

### **2.7.2 Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)**

Transfecció dels dúplex de RNA de interferència corresponents per les cèl·lules HT29.

- Plaquejar les cèl·lules un dia abans perquè estiguin al 30-40 % de confluència en el moment de la transfecció.
- Si transfectem 75 nM de siRNA, per un pou d'una placa de 6 pous preparem:  
  
Epp.1: 3 µl siRNA (20 µM estoc) + 150µl Opti-MEM → vòrtex durant 10 segons  
  
Epp.2: 9 µl *Lipofectamine RNAiMAX*+ 150µl Opti-MEM → vòrtex durant 10 segons
- Incubar durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Afegir el contingut del epp.2 sobre el epp.1 i fer un vòrtex de 10 segons.
- Incubar els complexos durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Aspirar el medi de les cèl·lules, afegir 400 µl de DMEM complet i els complexos i agitar suaument.
- Afegir 1 ml de DMEM complet 24 hores després de la transfecció.

## 3. Anàlisi de proteïnes

### 3.1 Obtenció de mostres

#### 3.1.1 Extractes totals a partir de cèl·lules en cultiu utilitzant el tampó CHAPS

Utilitzem el tampó CHAPS generalment quan volem fer *western blot* de proteïnes fosforilades ja que és un detergent suau. Tot el procés es realitza en gel. Els inhibidors de proteases i fosfatases que no es troben ja al tampó CHAPS s'afegeixen en el moment d'agafar la proteïna de la placa.

#### Tampó CHAPS

10 mM Tris pH 7,5

100 mM NaCl

50 mM NaF

50 mM  $\beta$ -glicerolfosfat

0,3 % CHAPS

Inhibidor de fosfatases	Dissolvent	Estoc	Concentració final	Dilució
<b>NaF</b>	Aigua	1 M	1 mM	1:1000
<b>Ortovanadat sòdic</b>	Aigua	0,2 M	0,2 mM	1:1000
<b><math>\beta</math>-glicerolfosfat</b>	Aigua	1 M	1 mM	1:1000

Inhibidor de proteases	Dissolvent	Estoc	Concentració final	Dilució
<b>Leupeptina</b>	Aigua	5 mg/ml	5 µg/ml	1:1000
<b>Benzamidina</b>	Aigua	10 mg/ml	100 µg/ml	1:100
<b>Pepstatina</b>	10 % àcid acètic 90 % metanol	1 mg/ml	1 µg/ml	1:1000
<b>PMSF</b>	Isopropanol	100 mM	1 mM	1:100

- Aspirar el medi de les cèl·lules i fer dos rentats amb PBS 1X fred (no fa falta que sigui estèril).
- Afegir aproximadament 80 µl (depenent de la confluència de les cèl·lules) de tampó de lisi CHAPS per pou de placa de 6 pous.
- Escrapejar les cèl·lules i passar el contingut a un *ependorf*.
- Deixar 10 minuts en gel en agitació.
- Centrifugar a 15000 g durant 15 minuts a 4 °C.
- Recuperar el sobrenedant en un nou *ependorf*.
- Valorar la proteïna pel mètode Bradford (secció 3.2.1).

### 3.1.2 Extractes totals a partir de cèl·lules en cultiu utilitzant el tampó 2 % SDS

Utilitzem el tampó de lisi total (2 % SDS) que permet obtenir quantitats més altes de proteïnes ja que és un detergent més fort.

- Aspirar el medi de les cèl·lules i fer dos rentats amb PBS 1X (no fa falta que sigui estèril).

- Afegir aproximadament 80  $\mu\text{l}$  (depenent de la confluència de les cèl·lules) de tampó de lisis 2 % SDS.
- Escrapejar les cèl·lules i passar el contingut a un *eppendorf*.
- Escalfar les mostres a 95 °C durant 10-15 minuts.
- Valorar la proteïna pel mètode BCA (secció 3.2.2).

## 3.2 Valoració de la concentració de proteïnes

Utilitzem un patró d'albumina sèrica bovina (BSA) amb el mateix tampó en el que hem lisat les cèl·lules. De forma general, preparem un patró d'entre 0-5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteïna. El patró el guardem a -20 °C.

### 3.2.1 Mètode Bradford

- En una placa de 96 pous, posar 2  $\mu\text{l}$  de mostra o patró (fer cada mostra i patró per triplicat).
- Diluir 1:5 el reactiu de Bradford (Bio-Rad) amb aigua mQ.
- Afegir a cada pou 200  $\mu\text{l}$  de reactiu de Bradford diluït.
- Incubar durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Fer la lectura a una absorbància a  $\lambda = 595 \text{ nm}$  en el lector de plaques.

### 3.2.2 Mètode BCA

- En una placa de 96 pous, posar 2  $\mu\text{l}$  de mostra o patró (fer cada mostra i patró per triplicat).
- Diluir 1:50 el reactiu de BCA (Pierce) amb el reactiu per diluir el BCA.

- Afegir a cada pou 150 µl de reactiu de BCA diluït.
- Incubar durant 30 minuts a 37 °C.
- Fer la lectura a una absorbància a  $\lambda = 550$  nm en el lector de plaques.

### 3.3 Western Blot

#### 3.3.1 Preparació de les mostres

- Un cop quantificades les mostres, igualar-les a la mateixa concentració afegint tampó de lisi quan calgui.
- Afegir tampó de carga Laemmli 4X.

##### Tampó de càrrega Laemmli 4X

200 mM de Tris-HCl pH 6,8

40 % de glicerol

8 % de SDS

20 % de  $\beta$ -mercaptoetanol

0,8 % de blau bromofenol

---

- Escalfar les mostres a 95 °C durant 10 minuts.

#### 3.3.2 Electroforesi desnaturalitzant en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)

- Preparar el muntatge dels vidres amb el suport.
- Preparar el gel separador (*Lower*): el percentatge d'acrilamida (Acrylamide-Solution (40%)-Mix) (Panreac) depèn del pes molecular de les proteïnes que es

volen analitzar. Per proteïnes de pesos moleculars alts el percentatge d'acrilamida que es necessita per separar les proteïnes és menor.

Tampó Lower	Gel Separador			
	Percentatge d'acrilamida			
	8 %	10 %	12,5 %	
1,5 M de Tris-HCl pH 8,8				
0,4 % de SDS				
	<b>Acrilamida</b>	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
	<b>Tampó Lower</b>	2,98 ml	3,75 ml	4,65 ml
	<b>Aigua mQ</b>	6,27 ml	7,5 ml	6,6 ml
	<b>APS*</b>	75 µl	75 µl	75 µl
	<b>TEMED*</b>	25 µl	25 µl	25 µl

\* L'APS i el TEMED s'han d'afegir l'últim moment ja que són els que inicien la polimerització de l'acrilamida.

- Afegir la barreja entre els dos vidres deixant uns 2 cm per damunt pel gel concentrador.
- Afegir unes gotes d'isopropanol. Quan el gel ha polimeritzat, decantar l'isopropanol i rentar amb una mica d'aigua i assecar.
- Preparar el gel concentrador (*Upper*):

Tampó Upper
0,5 M de Tris-HCl pH 6,8
0,4 % SDS

<b>Percentatge d'acrilamida</b>	
<b>Gel Concentrador</b>	<b>3 %</b>
<b>Acrilamida</b>	0,6 ml
<b>Tampó Upper</b>	2 ml
<b>Aigua mQ</b>	5,40 ml
<b>APS</b>	40 µl
<b>TEMED</b>	10 µl

- Col·locar els gels dins la cubeta amb el tampó d'electroforesi.
- Carregar les mostres prèviament escalfades a 95°C i centrifugades breument.
- Connectar la font a 90 V i quan el front passi al gel concentrador pujar a 110 V.

#### **Tampó d'electroforesi 10X (1 L)**

30,3 g de Tris-HCl (250 mM)

144g de Glicina (1920 mM)

Ajustar a pH 8,3

50 ml de SDS al 20 % (1%)

---

### **3.3.3 Transferència de proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa (Millipore)**

Activar la membrana de nitrocel·lulosa (6 x 9 cm): col·locar la membrana en una cubeta amb metanol durant 30 segons. Després la col·loquem en una cubeta amb aigua destil·lada durant 1-2 minuts i finalment a una cubeta amb tampó de transferència o tampó ànode segons el tipus de transferència utilitzada.

Dos tipus de transferència:

### **Transferència humida** (*Trans-Blot Cell*) (BioRad)

- Muntar la transferència: col·locar damunt la part de color negra del sandvitx una esponja i 2 papers watmans (6 x 9 cm) prèviament mullats amb el tampó de transferència. Posar el gel i damunt la membrana (prèviament activada). Col·locar dos papers watmans i una esponja prèviament mullats amb el tampó de transferència. Eliminar las bombolles passant una pipeta por damunt del paper watman i de l'esponja. Finalment tancar el sandvitx i col·locar-lo en la cubeta amb tampó de transferència 1X, un imant i un bloc de gel.
- Connectar la font a 400 mA durant 1 hora o a 250 mA O/N a 4°C.
- A l'hora de preparar el tampó de transferència 1X es fa per ordre: aigua-tampó de transferència-10 % de metanol i es guarda a 4 °C.

#### **Tampó de transferència 10X (1 L)**

30,3 g de Tris-HCl (250mM)

144g de Glicina (1920 mM)

Ajustar a pH 8,3

---

### **Transferència semiseca** (*Trans-Blot SD Cell*) (BioRad)

- Muntar la transferència: humitejar la part de sota del casset del *Trans-Blot* amb paper *watman* mullat en el tampó ànode. Col·locar tres papers *watmans* mullats amb el tampó ànode i damunt posar la membrana (prèviament activada), després el gel i tres papers *watmans* mullats amb el tampó càtode. Humitejar la part de damunt del casset amb un paper *watman* mullat amb tampó càtode i tancar el casset.



**Tampó ànode (500 ml)**

18,16 g de Tris base (0,3 M)

100 ml de Metanol (20 %)

---

**Tampó càtode (500 ml)**

2,6 g d'àcid 6-aminocaproic (40mM)

100 ml de Metanol (20 %)

---

- Connectar el *Trans-Blot* a 0.5 mA durant 30 minuts.

### 3.3.4 Detecció de proteïnes mitjançant anticossos

- Bloquejar la membrana incubant-la amb 5 % de llet en pols en T-TBS 1X durant 1 hora a temperatura ambient.
- Fer tres rentats de 10 minuts cada un amb T-TBS 1X.

**TBS 20X (500 ml)**

12,11 g de Tris-HCl (200 mM)

87,66 g de NaCl (3 M)

Ajustar a pH 7,5

---

**TBS-Tween (T-TBS) (500 ml)**

12,11 g de Tris-HCl (200 mM)

87,66 g de NaCl (3 M)

Ajustar a pH 7,5

10 ml de Tween-20

---

- Incubar la membrana amb l'anticòs primari O/N a 4°C o 2 hores a temperatura ambient.
- Treure l'anticòs primari (es reutilitza) i fer un rentat amb T-TBS 1X de 10 minuts.
- Incubar l'anticòs secundari (preparat amb 5 % de llet en pols en T-TBS 1X) durant 1h a temperatura ambient.
- Fer dos rentats de 10 minuts cada un amb T-TBS 1X i un últim rentat de 10 minuts amb TBS 1X.
- Revelat de la membrana: Preparar una barreja amb els reactius A i B del ECL Western Blotting 1:1 (Biological Industries) (aproximadament utilitzem 1 ml total

per una membrana sencera). Aplicar la barreja sobre la membrana i incubar 1-2 minuts.

- Utilitzem el revelador digital *Fujifilm LAS 3000 Intelligent Dark Box IV*.
- Després del revelat les membranes es renten amb T-TBS 1x 10 minuts i es poden assecar o incubar amb un altre anticòs primari O/N.

Per fer la densitometria de les membranes utilitzem el programa *Multi Gauge v3.0* (*FujiFilm Corporation, 2007*). Primer quantifiquem la intensitat de la banda de la nostra proteïna d'interès i fem la relació entre la quantificació de la intensitat de la banda de la proteïna normalitzadora. Finalment, els resultats els expressem com a vegades d'inducció del tractament corresponent respecte a la condició control.

Els anticossos secundaris utilitzats en aquesta tesi han sigut: *anti-rabbit* i *anti-mouse IgG* (dilució: 1:10000) de Advansta i *anti-goat* (dilució 1:1000) de Sigma-Aldrich.

#### Anticossos primaris utilitzats:

Anticòs	Mida (kDa)	Dilució	Origen	Distribuidor
<b>Akt</b>	60	1:1000	Cabra	Cell Signaling
<b>P-S473-Akt</b>	60	1:1000	Conill	Cell Signaling
<b>P-Thr308-Akt</b>	60	1:1000	Conill	Cell Signaling
<b>P-Thr202/Tyr204-Erk1/2</b>	42, 44	1:2000	Ratolí	Cell Signaling
<b>P-S21/9-GSK3<math>\alpha/\beta</math></b>	46, 51	1:1000	Conill	Cell Signaling
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	120	1:1000	Cabra	Cell Signaling
<b>P-Ser86-Hsp25</b>	23	1:1000	Conill	Invitrogen
<b>P-Thr183/185-JNK</b>	46/54	1:1000	Ratolí	Santa Cruz Biotechnology
<b>P-Thr180/Tyr182-p38</b>	43	1:1000	Conill	Cell Signaling

Anticòs	Mida (kDa)	Dilució	Origen	Distribuidor
<b>PFKFB2</b>	55	1:600	Conill	Abcam
<b>P-Ser466-PFKFB2</b>	55	1:250	Conill	Santa Cruz Biotechnology
<b>P-Ser48-PFKFB2</b>	55	1:600	Conill	Santa Cruz Biotechnology
<b>PFKFB3</b>	59	1:1000	Conill	Dr. R.Bartrons
<b>P-Ser461-PFKFB3</b>	59	1:200	Conill	Dr. R.Bartrons
<b>P-Ser235/236-S6</b>	32	1:1000	Conill	Cell Signaling
<b>Smad2/3</b>	52/60	1:1000	Ratolí	BD Biosciences
<b>P-Ser465/467-Smad2</b>	52	1:1000	Conill	Cell Signaling
<b>P-Ser423/425-Smad3</b>	60	1:1000	Conill	Merck
<b>Smad4</b>	60	1:100	Conill	Sèrum Dr. F.Ventura
<b>SREBP1</b>	120/60	1:1000	Conill	Santa Cruz Biotechnology
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	50	1:1000	Ratolí	Sigma-Aldrich

## 4. Purificació d'anticossos per cromatografia d'afinitat

Tot el procés i els reactius a 4 °C. Utilitzem columnes que tenen l'antigen que volem immobilitzat realitzades pel Servei de Síntesi de Pèptids de la Universitat de Barcelona.

- Rentar la columna per gravetat amb 40 ml de PBS 1 X (filtrat).
- Diluir el sèrum 1: amb PBS 1 X i afegir-lo a la columna. Passar-ho tres cops.
- Rentar la columna amb 40 ml de PBS 1 X.
- Preparar una sèrie de 10-15 *ependorfs* amb tampó neutralitzador.

Per saber el volum del tampó neutralitzador que hem d'afegir, en un *ependorf* afegim 500 µl de tampó glicina (que serà el volum de les fraccions que recollirem) i afegim tampó neutralitzador fins arribar a un pH de 7-7,5 utilitzant una tira reactiva de pH (40 µl de tampó neutralitzador aproximadament).

- Eluir l'anticòs amb tampó glicina en fraccions de 500 µl.
- Passar 20 ml de tampó glicina per al columna.
- Rentar la columna amb 40 ml de PBS 1X i un últim rentat amb 20 ml PBS 1X/Azida per conservar la columna (4 °C).
- Quantificar la proteïna de cada fracció.

Abans de fer el Bradford, fer una primera valoració de les fraccions afegint en una placa de 96 pous 10 µl de cada fracció i 100 µl de reactiu Bradford (diluït 1:5).

- Ajustar las fraccions que tinguin els valors d'absorbància més alts i dialitzar-les amb 2 L de PBS 1X filtrat i fred durant 2 h a 4 °C.
- Canviar el PBS per fer una altra diàlisi O/N.

- Canviar el PBS i fer una última diàlisi de 2 h.
- Quantificar la proteïna dialitzada (Bradford), utilitzant el patró de BSA en PBS. (secció 3.2.1).
- Afegir glicerol al 20% final, aliquotar i congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5. Determinació de metabòlits

### 5.1 Fructosa-2,6-Bifosfat (Fru-2,6-P<sub>2</sub>)

#### 5.1.1 Purificació de la PPI-PFK

- Pesar 165 g de patata pelada (preferentment patata vella).
- Immediatament triturar la patata amb una liquidadora. Recollir la polpa amb el líquid en un vas de precipitats en gel.
- Ràpidament, afegir 2 volums (330 ml) de tampó Hepes/KAcCOOH/DTT

#### Hepes/KAcCOOH/DTT (500 ml)

2,38 g de Hepes (20 mM)

0,98 g de KAcCOOH (20 mM)

Ajustar a pH 8,2 amb KOH

1 ml de DTT 1M (2 mM)

---

- Flitar-lo amb gases utilitzant un embut col·locat en una proveta. Apuntar el volum i passar el filtrat a un vas de precipitats en gel.

- Afegir PPI (sòlid) i MgCl<sub>2</sub> (estoc 1M) per obtenir una concertació final de 2 mM de cadascun.
- Posar el vas a agitar i anar mesurant el pH fins arribar a 7,6.
- Ajustar a un pH de 8,2 en gel amb KOH 5 M i apuntar el volum afegit.
- Posar la barreja en un bany de 70 °C i esperar a que la barreja arribi a 59 °C (agitant amb la mà i utilitzant un termòmetre per la barreja). Quan la barreja estigui a 59 °C, mantenir-la a aquesta temperatura durant 5 minuts (traient i posant la barreja dins del bany). És important controlar la temperatura en aquests 5 minuts ja que la PPI-PFK es podria degradar si la temperatura augmenta més.
- Refredar ràpidament en gel.
- Ajustar a un pH de 7 amb HCl 5 M i apuntar el volum d'àcid afegit. En aquest punt es pot guardar una alíquota de 200 µl a -80 °C com a control.
- Afegir a la barreja 6 g de PEG-6000/100 ml (6 %) en gel.

$$Y \text{ g PEG} = (6 \text{ g} \cdot X \text{ ml recuperats})/100 \text{ ml}$$

- Col·locar la barreja en agitació a 4 °C durant 15 minuts i 10 minuts més sense agitació.
- Passar la barreja a falcons de 50 ml prèviament refredats i centrifugar 10 minuts a 4000 g. Obtenim un precipitat de dos colors, blanc al fons i groc damunt.
- Recuperar el sobrenedant junt amb el pelet de color groc amb una espàtula, sense tocar el blanc. Apuntar el volum recuperat.
- Afegir 10 g de PEG-6000/100 ml (10 %) en funció del volum recuperat i deixar-lo en gel.

$$Y \text{ g PEG} = (10 \text{ g} \cdot X \text{ ml recuperats})/100 \text{ ml}$$

- Posar en agitació suau a 4 °C durant 15 minuts i 10 minuts més sense agitació.
- Centrifugar 10 minuts a 4000 g en un rotor. En aquest cas, descartar el sobrenedant, del qual podem guardar una alíquota com a control.
- Recuperem el precipitat groc sense tocar el blanc i afegim un volum de glicerol 100 %.
- Barrejar bé i aliquotar en *eppendorfs* en la càmera freda i en gel. Guardar a -80 °C.

### 5.1.2 Dessalat dels enzims

- Col·locar llana de vidre en el fons de xeringuilles d'1 ml i posar-les a l'interior de falcons de 15 ml i omplir amb Sephadex G-25 en Tris/acetat.
- Centrifugar a 2500 rpm durant 5 minuts a 4 °C. La llana de vidre queda empaquetada en forma de columna. Passar las xeringuilles a un nou falcon de 15 ml.
- Preparar en un *eppendorf*:

<b>Enzims (0,417 ml)</b>	
0,217 ml aldolasa (5 mg)	* <i>α-Glycerophosphate dehydrogenase-triosephosphate isomerase from rabbit muscle</i>
0,2 ml TIP/ <i>α</i> -GDH* (1,1 mg)	(Sigma)

- Centrifugar l'*eppendorf* a 13000 rpm durant 15 minuts a 4 °C. Descartar el sobrenedant i resuspendre el precipitat en el mateix volum (0,417 ml) de tampó Tris-acetat a pH 7,8.
- Afegir 41,7 µl d'enzims auxiliars per xeringuilla (aproximadament tindrem 10) i centrifugar-les a 2500 rpm durant 5 minuts a 4 °C.

- Recollir els eluïts i posar-les en un falcon de 15 ml al que afegirem 273,5  $\mu$ l de tampó Tris-acetat per cada eluït (10 xeringues = 2,73 ml).
- Ajuntar les fraccions i congelar-los a -20 °C sinó s'utilitzen en el moment.

### 5.1.3 Preparació dels substrats

- Preparar un estoc 20X de Fructosa-6-P (Fru-6-P) + Glucosa-6-P (Gluc-6-P) relació 1:3,5.

#### Substrats (10 ml)

0,304 g de Fru-6-P (Na<sub>2</sub> salt)

1,07 g de Gluc-6-P ( Na<sub>2</sub> salt)

Fins 10 ml amb aigua

- Utilitzar al moment o guardar a -20 °C.

### 5.1.4 Preparació de la mostra a partir de cèl·lules en cultiu

Per determinar la Fru-2,6-P<sub>2</sub> normalment plaquem les cèl·lules en plaques de 6 pous. Tot el procés ho realitzem en gel i amb els reactius freds.

- Aspirar el medi de les cèl·lules i rentar dos cops amb PBS 1X (no estèril).
- Afegir 70-80  $\mu$ l de tampó de lisis de Fru-2,6-P<sub>2</sub> Tris/Acetacat i escrapejar les cèl·lules.

#### Tampó lisi Fru-2,6-P<sub>2</sub>

NaOH 100 mM

Tritó 0,1 %



- Escalfar les mostres a 80-85 °C durant 15 minuts.
- Centrifugar les mostres a 14000 rpm durant 15 minuts a 4 °C.
- Passar el sobrenedant a un *ependorf* nou. Separar 50-60 µl de mostra per a la determinació de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i la resta l'utilitzarem per a la quantificació de la proteïna pel mètode Bradford (secció 3.2.1) utilitzant el patró de BSA en NaOH 100mM/0,1% de Tritó.
- Neutralitzar la mostra per la lectura de Fru-2,6-P<sub>2</sub> amb acètic/acetat 250 mM diluït amb aigua 1:2. Anar afegint 2 µl de acètic/acetat cada cop i anar mirant el pH amb tires reactives fins que la mostra tingui un pH neutre (7-7,5). Apuntar el volum afegit. La mostra un cop neutralitzada no es pot guardar.
- Centrifugar a 14000 rpm i passem el sobrenedant a un nou *ependorf*.

### 5.1.5 Determinació de Fru-2,6-P<sub>2</sub>

- La lectura la fem en el espectrofotòmetre *Beckman Coulter DU 800 Spectrophotometer* a una  $\lambda$  de 320 nm. Hem d'encendre la làmpada del visible i la de la llum UV.
- Primer fem el blanc amb 1 ml de tampó Tris/acetat.

#### Tampó Tris/Acetat (250 ml)

13,5 ml de Tris 1M

5 ml Acetat magnesi

Ajusta a pH 7,8

---

- Afegim NADH al tampó Tris/acetat fins que l'absorbància del tampó arribi a 1,8-2 i es mantingui estable en el temps. Tapem el tampó de la llum amb paper de plata.

- Preparar el patró de Fru-2,6-P<sub>2</sub> a partir de 3,5 mM:

**Patró de Fru-2,6-P<sub>2</sub> a partir d'un estoc de 3,5 mM**

**30 pmols/μl** 99 μl H<sub>2</sub>O + 1 μl de solució de 3.5 mM de Fru-2,6-P<sub>2</sub>

**8 pmols/μl** 491 μl H<sub>2</sub>O + 9 μl de solució de 30 pmols/μl

**6 pmols/μl** 50 μl de la solució de 4 pmols/μl + 50 μl de solució de 8 pmols/μl

**4 pmols/μl** 50 μl H<sub>2</sub>O + 50 μl de solució de 8 pmols/μl

**2 pmols/μl** 50 μl H<sub>2</sub>O + 50 μl de solució de 4 pmols/μl

**1 pmols/μl** 50 μl H<sub>2</sub>O + 50 μl de solució de 2 pmols/μl

**0 pmols/μl** 50 μl H<sub>2</sub>O

- Per a la lectura tant de las mostres com de la patró afegim a cada cubeta els següents reactius i en l'ordre indicat:

Reactius per cubeta (1 ml)	2.3.1.1.
Tampó Tris-Acetata + NADH	730 μl
Enzims auxiliars	40 μl
Substrats	40 μl
H <sub>2</sub> O mQ	85 μl
Mostra/Patró	15 μl
PPI-PFK	40 μl
<b>Barrejar per inversió</b>	
PPi	50 μl
<b>Barrejar per inversió</b>	

- Fem lectures de 10 minuts. Primer llegir el patró i si surt bé continuar amb les mostres.
- El volum de mostra afegida a la cubeta pot augmentar-se en mostres amb poca Fru-2,6-P<sub>2</sub> compensant el volum final de la cubeta amb aigua mQ.

## 5.2 Lactat extracel·lular

Per determinar el lactat extracel·lular normalment plaquegem les cèl·lules en plaques de 6 pous. A l'hora d'aplicar el tractament desitjat, es canvia el medi de les cèl·lules per medi sense sèrum. Abans de fer l'experiment:

- Preparar el patró de lactat: 0, 62.5, 125, 250, 500 i 1000 µM.

Tampó de reacció	
Hidrazina sulfat pH 9.5	0.3M
Glicina	0.87M
NAD <sup>+</sup> *	2.5mM
EDTA *	0.19mM

- Preparar el tampó de reacció i guardar-lo a 4°C i tapat de la llum fins el seu ús.

\*En el moment de duu a terme la determinació de lactat, afegir el NAD<sup>+</sup> i l'EDTA al tampó de reacció.

- Recollir el medi després del tractament en un *ependorf* en gel. Si no es fa la determinació en el moment es pot guardar a -80°C.

- Rentar les cèl·lules dos cops amb PBS 1X no estèril i afegir tampó de lisi total 2 % SDS per determinar la concentració de proteïna pel mètode BCA, descrit a la secció 3.2.2 de materials i mètodes.
- Posar 10  $\mu$ l de patró o de medi recollit de les cèl·lules en una placa de 96 pous. Carregar cada mostra per triplicat i es recomana fer un parell de dilucions de la mostra perquè no s'obtinguin valors fora del rang de linealitat del patró.
- Afegir a cada pou 190  $\mu$ l tampó de reacció i fer una primera lectura en un lector de plaques a una  $\lambda$  de 340 nm. Aquesta és la lectura a temps 0.
- Diluir la LDH 1:4 amb aigua mQ, afegir 20  $\mu$ l a cada pou als 20 minuts i fer la segona lectura.
- Obtenim les nmols de lactat/ml de la diferència entre la lectura a temps 20 respecte a la lectura a temps 0.
- El resultat final s'expressa en nmols de lactat/ $\mu$ g de proteïna.

## 6. Assaig clonogènic

L'assaig de clonogenicitat o de formació de colònies es basa en l'habilitat d'una sola cèl·lula de créixer i de formar una colònia (252).

- Després de fer els tractaments corresponents, contar el número de cèl·lules per plaquejar 500 cèl·lules per pou en plaques de 12 pous o 1000 cèl·lules en el cas de plaques de 6 pous.
- Deixar les cèl·lules créixer en medi amb 10% de FBS durant 14 dies.
- Rentar les cèl·lules amb PBS 1X no estèril i afegir una solució de 0.2% de cristall violeta (preparada amb 2% d'etanol) fins a cobrir el pou.
- Deixar incubar durant 30 minuts.
- Rentar els pous amb aigua destil·lada i deixar assecar.
- Contar el número de colònies ( $\geq 50$  cèl·lules).



# BIBLIOGRAFIA

---



Abbey, C.K., Borowsky, A.D., Gregg, J.P., Cardiff, R.D., and Cherry, S.R. (2006). Preclinical Imaging of Mammary Intraepithelial Neoplasia with Positron Emission Tomography. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 11, 137–149.

Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 635–645.

Aigner, L., and Bogdahn, U. (2008). TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 331, 225–241.

Akhurst, R.J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGFβ signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 790–811.

Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 27489–27494.

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.* 7, 261–269.

Almeida, A., Moncada, S., and Bolaños, J.P. (2004). Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat. Cell Biol.* 6, 45–51.

Almeida, A., Bolaños, J.P., and Moncada, S. (2010). E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 738–741.

Altomare, D.A., and Testa, J.R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455–7464.

Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M., and Melino, G. (2014). Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 39, 191–198.

Anderson, M., Marayati, R., Moffitt, R., and Jen Yeh, J. (2014). Hexokinase 2 promotes tumor growth and metastasis by regulating lactate production in pancreatic cancer. *Oncotarget.*

Ando, M., Uehara, I., Kogure, K., Asano, Y., Nakajima, W., Abe, Y., Kawauchi, K., and Tanaka, N. (2010). Interleukin 6 enhances glycolysis through expression of the glycolytic enzymes hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3. *J. Nippon Med. Sch.* 77, 97–105.

Arias, W.M., Mezquita, C., and Mezquita, J. (2000). Expression of lactate dehydrogenases A and B during chicken spermatogenesis: characterization of testis specific transcripts. *J. Cell. Biochem.* 79, 15–27.



## Bibliografia

---

Arora, K.K., and Pedersen, P.L. (1988). Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J. Biol. Chem.* *263*, 17422–17428.

Arrick, B.A., Lopez, A.R., Elfman, F., Ebner, R., Damsky, C.H., and Derynck, R. (1992). Altered metabolic and adhesive properties and increased tumorigenesis associated with increased expression of transforming growth factor beta 1. *J. Cell Biol.* *118*, 715–726.

Arthur, J.S.C., and Ley, S.C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 679–692.

de Atauri, P., Benito, A., Vizán, P., Zanuy, M., Mangues, R., Marín, S., and Cascante, M. (2011). Carbon metabolism and the sign of control coefficients in metabolic adaptations underlying K-ras transformation. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 746–754.

Atsumi, T., Chesney, J., Metz, C., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., Mitchell, R., and Bucala, R. (2002). High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res.* *62*, 5881–5887.

Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Takeuchi, J., Bando, H., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., and Koike, T. (2005). Expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation. *Diabetes* *54*, 3349–3357.

Avnet, S., Sciacca, L., Salerno, M., Gancitano, G., Cassarino, M.F., Longhi, A., Zakikhani, M., Carboni, J.M., Gottardis, M., Giunti, A., et al. (2009). Insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor II as additional treatment targets in human osteosarcoma. *Cancer Res.* *69*, 2443–2452.

Ayala, F.R.R., Rocha, R.M., Carvalho, K.C., Carvalho, A.L., da Cunha, I.W., Lourenço, S.V., and Soares, F.A. (2010). Glut1 and Glut3 as Potential Prognostic Markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules* *15*, 2374–2387.

Azzout-Marniche, D., Bécard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferré, P., and Foufelle, F. (2000). Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.* *350 Pt 2*, 389–393.

Babia, T., Denis-Pouxviel, C., Murat, J.C., Gomez-Foix, A.M., Trocheris, V., Guinovart, J.J., and Bosch, F. (1989). Insulin controls key steps of carbohydrate metabolism in cultured HT29 colon cancer cells. *Biochem. J.* *261*, 175–179.

Baer, S.C., Casaubon, L., and Younes, M. (1997). Expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in cutaneous neoplasia. *J. Am. Acad. Dermatol.* *37*, 575–577.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., Mclauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S.C., Alessi, D.R., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* *408*, 297–315.

- 
- Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., and Koike, T. (2005). Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 5784–5792.
- Barnard, J.A., Lyons, R.M., and Moses, H.L. (1990). The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim. Biophys. Acta* 1032, 79–87.
- Barnes, K., Ingram, J.C., Porras, O.H., Barros, L.F., Hudson, E.R., Fryer, L.G.D., Fougelle, F., Carling, D., Hardie, D.G., and Baldwin, S.A. (2002). Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Cell Sci.* 115, 2433–2442.
- Barthel, A., Okino, S.T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J.P., and Roth, R.A. (1999). Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J. Biol. Chem.* 274, 20281–20286.
- Bartrons, R., and Caro, J. (2007). Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 223–229.
- Bartrons, R., Hue, L., Van Schaftingen, E., and Hers, H.G. (1983). Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 214, 829–837.
- Batra, R.S., Hatchwell, E., Rider, S., Brown, R., Brown, G.K., and Craig, I.W. (1997). Localization of Human Liver 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB1) within a YAC Contig in Xp11.21.
- Battegay, E.J., Raines, E.W., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., and Ross, R. (1990). TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 63, 515–524.
- Beardsall, K., Diderholm, B.M.S., and Dunger, D.B. (2008). Insulin and carbohydrate metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 22, 41–55.
- Bello-Fernandez, C., Packham, G., and Cleveland, J.L. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7804–7808.
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol.* 8, 1049–1057.
- Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., et al. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13681–13686.
- Bensaad, K., and Vousden, K.H. (2007). p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol.*
-

## Bibliografia

---

17, 286–291.

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* 126, 107–120.

Bernard, K., Logsdon, N.J., Ravi, S., Xie, N., Persons, B.P., Rangarajan, S., Zmijewski, J.W., Mitra, K., Liu, G., Darley-Usmar, V.M., et al. (2015). Metabolic Reprogramming Is Required for Myofibroblast Contractility and Differentiation. *J. Biol. Chem.* 290, 25427–25438.

Bertrand, L., Alessi, D.R., Deprez, J., Deak, M., Viaene, E., Rider, M.H., and Hue, L. (1999). Heart 6-phosphofructo-2-kinase activation by insulin results from Ser-466 and Ser-483 phosphorylation and requires 3-phosphoinositide-dependent kinase-1, but not protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 274, 30927–30933.

Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003129–a003129.

Bessman, S.P., and Fonyo, A. (1966). The possible role of the mitochondrial bound creatine kinase in regulation of mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 597–602.

Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.

Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235–248.

Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.

Bobarykina, A.Y., Minchenko, D.O., Opentanova, I.L., Moenner, M., Caro, J., Esumi, H., and Minchenko, O.H. (2006). 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, 789–799.

Bogoyevitch, M.A., Ngoei, K.R.W., Zhao, T.T., Yeap, Y.Y.C., and Ng, D.C.H. (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 463–475.

Bonen, A., Han, X.-X., Habets, D.D.J., Febbraio, M., Glatz, J.F.C., and Luiken, J.J.F.P. (2007). A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1740-9.

Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., and Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358–1362.

- 
- Boren, J., Montoya, A.R., de Atauri, P., Comin-Anduix, B., Cortes, A., Centelles, J.J., Frederiks, W.M., Van Noorden, C.J.F., and Cascante, M. (2002). Metabolic control analysis aimed at the ribose synthesis pathways of tumor cells: a new strategy for antitumor drug development. *Mol. Biol. Rep.* 29, 7–12.
- Bornstein, S., White, R., Malkoski, S., Oka, M., Han, G., Cleaver, T., Reh, D., Andersen, P., Gross, N., Olson, S., et al. (2009). Smad4 loss in mice causes spontaneous head and neck cancer with increased genomic instability and inflammation. *J. Clin. Invest.* 119, 3408–3419.
- Bortner, C.D., Scoltock, A.B., Cain, D.W., and Cidlowski, J.A. (2016). T-cell development of resistance to apoptosis is driven by a metabolic shift in carbon source and altered activation of death pathways. *Cell Death Differ.* 23, 889–902.
- Bosca, L., Rousseau, G.G., and Hue, L. (1985). Phorbol 12-myristate 13-acetate and insulin increase the concentration of fructose 2,6-bisphosphate and stimulate glycolysis in chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6440–6444.
- Boscá, L., Aragón, J.J., and Sols, A. (1985). Fructose 2,6-bisphosphate and enzymatic activities for its metabolism in ascites tumor. *Curr. Top. Cell. Regul.* 27, 411–418.
- Boucher, J., Kleinriders, A., and Kahn, C.R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Gregory, J.S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., and Cobb, M.H. (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249, 64–67.
- Bruna, A., Darken, R.S., Rojo, F., Ocaña, A., Peñuelas, S., Arias, A., Paris, R., Tortosa, A., Mora, J., Baselga, J., et al. (2007). High TGFβ-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* 11, 147–160.
- Bruni, P., Farnararo, M., Vasta, V., and D'Alessandro, A. (1983). Increase of the glycolytic rate in human resting fibroblasts following serum stimulation. The possible role of the fructose-2,6-bisphosphate. *FEBS Lett.* 159, 39–42.
- Burkhart, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* 8, 671–682.
- Cairns, R., Papandreou, I., and Denko, N. (2006). Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol. Cancer Res.* 4, 61–70.
- Calle, E.E., and Thun, M.J. (2004). Obesity and cancer. *Oncogene* 23, 6365–6378.
- Calvo, M.N., Bartrons, R., Castaño, E., Perales, J.C., Navarro-Sabaté, A., and Manzano, A. (2006). PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits
-

## Bibliografia

---

anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett.* 580, 3308–3314.

Cantley, L.C. (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* (80-. ). 296, 1655–1657.

Cantuaria, G., Fagotti, A., Ferrandina, G., Magalhaes, A., Nadji, M., Angioli, R., Penalver, M., Mancuso, S., and Scambia, G. (2001). GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. *Cancer* 92, 1144–1150.

Cantwell-Dorris, E.R., O'Leary, J.J., and Sheils, O.M. (2011). BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol. Cancer Ther.* 10, 385–394.

Carboni, S., Hiver, A., Szyndralewicz, C., Gaillard, P., Gotteland, J.-P., and Vitte, P.-A. (2004). AS601245 (1,3-Benzothiazol-2-yl (2-{[2-(3-pyridinyl) ethyl] amino}-4 pyrimidinyl) Acetonitrile): A c-Jun NH2-Terminal Protein Kinase Inhibitor with Neuroprotective Properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 25–32.

Carew, J.S., and Huang, P. (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Mol. Cancer* 1, 9.

Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 50–83.

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 *Suppl* 3, 4–10.

Cavalier, M.C., Kim, S.-G., Neau, D., and Lee, Y.-H. (2012). Molecular basis of the fructose-2,6-bisphosphatase reaction of PFKFB3: transition state and the C-terminal function. *Proteins* 80, 1143–1153.

Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118–132.

Ceresa, B.P., and Pessin, J.E. (1998). Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle. *Mol. Cell. Biochem.* 182, 23–29.

Chapnick, D.A., Warner, L., Bernet, J., Rao, T., and Liu, X. (2011). Partners in crime: the TGF $\beta$  and MAPK pathways in cancer progression. *Cell Biosci.* 1, 42.

Chen, J.Z., and Kadlubar, F.F. (2004). Mitochondrial Mutagenesis and Oxidative Stress in Human Prostate Cancer. *J. Environ. Sci. Heal. Part C* 22, 1–12.

Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., and Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.* 276, 9519–9525.

Chen, M.K., Espat, N.J., Bland, K.I., Copeland, E.M., and Souba, W.W. (1993). Influence of progressive tumor growth on glutamine metabolism in skeletal muscle and kidney. *Ann. Surg.* 217, 655-66-7.

- 
- Chen, R.H., Sarnecki, C., and Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 12, 915–927.
- Chen, X., Weisberg, E., Fridmacher, V., Watanabe, M., Naco, G., and Whitman, M. (1997). Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389, 85–89.
- Chen, Z., Lu, W., Garcia-Prieto, C., and Huang, P. (2007). The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 267–274.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 6, 1521–1533.
- Chesney, J., Mitchell, R., Benigni, F., Bacher, M., Spiegel, L., Al-Abed, Y., Han, J.H., Metz, C., and Bucala, R. (1999a). An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3047–3052.
- Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A., and Bucala, R. (1999b). An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol. Med.* 5, 181–191.
- Ciriello, G., Miller, M.L., Aksoy, B.A., Senbabaoglu, Y., Schultz, N., and Sander, C. (2013). Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat. Genet.* 45, 1127–1133.
- Clayton, P.E., Banerjee, I., Murray, P.G., and Renehan, A.G. (2011). Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 11–24.
- Clem, B., Telang, S., Clem, A., Yalcin, A., Meier, J., Simmons, A., Rasku, M.A., Arumugam, S., Dean, W.L., Eaton, J., et al. (2008). Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* 7, 110–120.
- Clem, B.F., O’Neal, J., Tapolsky, G., Clem, A.L., Imbert-Fernandez, Y., Kerr, D.A., Klarer, A.C., Redman, R., Miller, D.M., Trent, J.O., et al. (2013). Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1461–1470.
- Colombo, S.L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., Carcamo, S., Kovacs, I., Tudzarova, S., and Moncada, S. (2011). Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 21069–21074.
- Colomer, D., Vives-Corróns, J.L., Pujades, A., and Bartrons, R. (1987). Control of phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate in B-lymphocytes and B-chronic
-

## Bibliografía

---

lymphocytic leukemia cells. *Cancer Res.* 47, 1859–1862.

Constam, D.B., Philipp, J., Malipiero, U. V, ten Dijke, P., Schachner, M., and Fontana, A. (1992). Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J. Immunol.* 148, 1404–1410.

Cordero-Espinoza, L., and Hagen, T. (2013). Increased concentrations of fructose 2,6-bisphosphate contribute to the Warburg effect in phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient cells. *J. Biol. Chem.* 288, 36020–36028.

Courtney, R., Ngo, D.C., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S.M., and Karagiannis, T.C. (2015). Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol. Biol. Rep.* 42, 841–851.

Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* 23, 536–545.

Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1998). Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 35347–35354.

Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* 429, 403–417.

Cuezva, J.M., Krajewska, M., de Heredia, M.L., Krajewski, S., Santamaría, G., Kim, H., Zapata, J.M., Marusawa, H., Chamorro, M., and Reed, J.C. (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* 62, 6674–6681.

da Cunha, A., and Vitković, L. (1992). Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression and regulation in rat cortical astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 36, 157–169.

Dalmay, M., Bartrons, R., and Gil, J. (1994). Control of fructose 2,6-bisphosphate metabolism by different mitogenic signals in Swiss 3T3 fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 212, 93–96.

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

Dang, C. V, O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16, 253–264.

Dang, C. V, Le, A., and Gao, P. (2009). MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin. Cancer Res.* 15, 6479–6483.

Dang, C. V., Kim, J., Gao, P., and Yustein, J. (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 51–56.

Darville, M.I., Crepin, K.M., Hue, L., and Rousseau, G.G. (1989). 5' flanking sequence and

structure of a gene encoding rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6543–6547.

Darville, M.I., Chikri, M., Lebeau, E., Hue, L., and Rousseau, G.G. (1991). A rat gene encoding heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* 288, 91–94.

Darville, M.I., Antoine, I. V, and Rousseau, G.G. (1992). Characterization of an enhancer upstream from the muscle-type promoter of a gene encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Nucleic Acids Res.* 20, 3575–3583.

Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* 13, 2905–2927.

Davis, B.N., Hilyard, A.C., Nguyen, P.H., Lagna, G., and Hata, A. (2010). Smad Proteins Bind a Conserved RNA Sequence to Promote MicroRNA Maturation by Drosha. *Mol. Cell* 39, 373–384.

Davis, J.L., Fallon, H.J., and Morris, H.P. (1970). Two enzymes of serine metabolism in rat liver and hepatomas. *Cancer Res.* 30, 2917–2920.

Dayan, F., Roux, D., Brahimi-Horn, M.C., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res.* 66, 3688–3698.

Daye, D., and Wellen, K.E. (2012). Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 362–369.

De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B.W., Cantelmo, A.R., Quaegebeur, A., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., et al. (2013). Role of PFKFB3-Driven Glycolysis in Vessel Sprouting. *Cell* 154, 651–663.

Deberardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., and Thompson, C.B. (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 54–61.

DeBerardinis, R.J., and Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29, 313–324.

DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* 7, 11–20.

DeFeo-Jones, D., Barnett, S.F., Fu, S., Hancock, P.J., Haskell, K.M., Leander, K.R., McAvoy, E., Robinson, R.G., Duggan, M.E., Lindsley, C.W., et al. (2005). Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members. *Mol. Cancer Ther.* 4, 271–279.



## Bibliografia

---

Denis-Pouxviel, C., Gauthier, T., Daviaud, D., and Murat, J.C. (1990). Phosphofructokinase 2 and glycolysis in HT29 human colon adenocarcinoma cell line. Regulation by insulin and phorbol esters. *Biochem. J.* 268, 465–470.

Denko, N.C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer* 8, 705–713.

Dennler, S., Goumans, M.-J., and ten Dijke, P. (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* 71, 731–740.

Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L., and Rider, M.H. (1997). 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, 17269–17275.

Deprez, J., Bertrand, L., Alessi, D.R., Krause, U., Hue, L., and Rider, M.H. (2000). Partial purification and characterization of a wortmannin-sensitive and insulin-stimulated protein kinase that activates heart 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochem. J.* 347 Pt 1, 305–312.

Derynck, R., and Feng, X.H. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1333, F105-50.

Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584.

Derynck, R., Zhang, Y., and Feng, X.H. (1998). Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95, 737–740.

Derynck, R., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* 29, 117–129.

Desideri, E., Vegliante, R., Cardaci, S., Nepravishta, R., Paci, M., and Ciriolo, M.R. (2014). MAPK14/p38 $\alpha$ -dependent modulation of glucose metabolism affects ROS levels and autophagy during starvation. *Autophagy* 10, 1652–1665.

Desideri, E., Vegliante, R., and Ciriolo, M.R. (2015). Mitochondrial dysfunctions in cancer: Genetic defects and oncogenic signaling impinging on TCA cycle activity. *Cancer Lett.* 356, 217–223.

Dewhirst, M.W. (2007). Intermittent hypoxia furthers the rationale for hypoxia-inducible factor-1 targeting. *Cancer Res.* 67, 854–855.

Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245–6251.

Dif, N., Euthine, V., Gonnet, E., Laville, M., Vidal, H., and Lefai, E. (2006). Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem. J.* 400, 179–188.

- 
- Dombrauckas, J.D., Santarsiero, B.D., and Mesecar, A.D. (2005). Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry* 44, 9417–9429.
- Doménech, E., Maestre, C., Esteban-Martínez, L., Partida, D., Pascual, R., Fernández-Miranda, G., Seco, E., Campos-Olivas, R., Pérez, M., Megias, D., et al. (2015). AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat. Cell Biol.* 17, 1304–1316.
- Dong, G., Mao, Q., Xia, W., Xu, Y., Wang, J., Xu, L., and Jiang, F. (2016). PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncol. Lett.* 11, 1980–1986.
- Drakas, R., Tu, X., and Baserga, R. (2004). Control of cell size through phosphorylation of upstream binding factor 1 by nuclear phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9272–9276.
- Dupriez, V.J., Darville, M.I., Antoine, I. V., Gegonne, A., Ghysdael, J., and Rousseau, G.G. (1993). 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8224–8228.
- Duran, J., Gómez, M., Navarro-Sabate, A., Riera-Sans, L., Obach, M., Manzano, A., Perales, J.C., and Bartrons, R. (2008a). Characterization of a new liver- and kidney-specific pfkfb3 isozyme that is downregulated by cell proliferation and dedifferentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 748–754.
- Duran, J., Navarro-Sabate, A., Pujol, A., Perales, J.C., Manzano, A., Obach, M., Gómez, M., and Bartrons, R. (2008b). Overexpression of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase in the liver of transgenic mice results in weight gain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 291–297.
- Duran, J., Obach, M., Navarro-Sabate, A., Manzano, A., Gómez, M., Rosa, J.L., Ventura, F., Perales, J.C., and Bartrons, R. (2009). Pfkfb3 is transcriptionally upregulated in diabetic mouse liver through proliferative signals. *FEBS J.* 276, 4555–4568.
- Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* 39, 171–183.
- Dziembowska, M., Danilkiewicz, M., Wesolowska, A., Zupanska, A., Chouaib, S., and Kaminska, B. (2007). Cross-talk between Smad and p38 MAPK signalling in transforming growth factor  $\beta$  signal transduction in human glioblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 1101–1106.
- Edwards, P.A., Tabor, D., Kast, H.R., and Venkateswaran, A. (2000). Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 103–113.
- Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat.*
-

## Bibliografia

---

Rev. Cancer 3, 859–868.

Ehata, S., Hanyu, A., Hayashi, M., Aburatani, H., Kato, Y., Fujime, M., Saitoh, M., Miyazawa, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2007). Transforming Growth Factor- Promotes Survival of Mammary Carcinoma Cells through Induction of Antiapoptotic Transcription Factor DEC1. *Cancer Res.* 67, 9694–9703.

el-Maghrabi, M.R., Correia, J.J., Heil, P.J., Pate, T.M., Cobb, C.E., and Pilkis, S.J. (1986). Tissue distribution, immunoreactivity, and physical properties of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5005–5009.

El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., Pilkis, J., Fox, E., and Pilkis, S.J. (1982). Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 257, 7603–7607.

Elliott, R.L., and Blobe, G.C. (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 2078–2093.

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., et al. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 64, 3892–3899.

Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–619.

Fabregat, I., Fernando, J., Mainez, J., and Sancho, P. (2014). TGF-beta signaling in cancer treatment. *Curr. Pharm. Des.* 20, 2934–2947.

Farnararo, M., Vasta, V., Bruni, P., and D'Alessandro, A. (1984). The effect of insulin on Fru-2,6-P2 levels in human fibroblasts. *FEBS Lett.* 171, 117–120.

Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., et al. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 18623–18632.

Feinberg, A.P., and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* 4, 143–153.

Feng, X.-H., and Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 659–693.

Feng, Y., and Wu, L. (2017). mTOR up-regulation of PFKFB3 is essential for acute myeloid leukemia cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 897–903.

Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., and Levine, A.J. (2007). The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* 67, 3043–3053.

---

Fenske, W., Volker, H.-U., Adam, P., Hahner, S., Johanssen, S., Wortmann, S., Schmidt, M., Morcos, M., Muller-Hermelink, H.-K., Allolio, B., et al. (2009). Glucose transporter GLUT1 expression is an stage-independent predictor of clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 16, 919–928.

Fernández-Medarde, A., and Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2, 344–358.

Fernández-Ramos, A.A., Poindessous, V., Marchetti-Laurent, C., Pallet, N., and Loriot, M.-A. (2016). The effect of immunosuppressive molecules on T-cell metabolic reprogramming. *Biochimie* 127, 23–36.

Ferré, P., Foretz, M., Azzout-Marniche, D., Bécard, D., and Foufelle, F. (2001). Sterol-regulatory-element-binding protein 1c mediates insulin action on hepatic gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 547–552.

Fierz, Y., Novosyadlyy, R., Vijayakumar, A., Yakar, S., and LeRoith, D. (2010). Mammalian target of rapamycin inhibition abrogates insulin-mediated mammary tumor progression in type 2 diabetes. *Endocr. Relat. Cancer* 17, 941–951.

Floridi, A., Paggi, M.G., and Fanciulli, M. (1989). Modulation of glycolysis in neuroepithelial tumors. *J. Neurosurg. Sci.* 33, 55–64.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27–31.

Franklin, C.C., Chin, P.C., Turner, J.T., and Kim, H.D. (1988). Insulin regulation of glucose metabolism in HT29 colonic adenocarcinoma cells: activation of glycolysis without augmentation of glucose transport. *Biochim. Biophys. Acta* 972, 60–68.

Franklin, D.A., He, Y., Leslie, P.L., Tikunov, A.P., Fenger, N., Macdonald, J.M., and Zhang, Y. (2016). p53 coordinates DNA repair with nucleotide synthesis by suppressing PFKFB3 expression and promoting the pentose phosphate pathway. *Sci. Rep.* 6, 38067.

Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I.D., Belfiore, A., and Vigneri, R. (1999). Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3278–3288.

Frasca, F., Pandini, G., Vigneri, R., and Goldfine, I.D. (2003). Insulin and hybrid insulin/IGF receptors are major regulators of breast cancer cells. *Breast Dis.* 17, 73–89.

Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., Pezzino, V., Squatrito, S., Belfiore, A., and Vigneri, R. (2008). The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* 114, 23–37.

Frezza, C., and Gottlieb, E. (2009). Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin. Cancer Biol.* 19, 4–11.

## Bibliografia

---

Frittitta, L., Vigneri, R., Papa, V., Goldfine, I.D., Grasso, G., and Trischitta, V. (1993). Structural and functional studies of insulin receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 25, 73–82.

Fry, C.J., and Farnham, P.J. (1999). Context-dependent transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 29583–29586.

Fryer, L.G.D., Parbu-Patel, A., and Carling, D. (2002). Protein kinase inhibitors block the stimulation of the AMP-activated protein kinase by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside. *FEBS Lett.* 531, 189–192.

Fukasawa, M., Takayama, E., Shinomiya, N., Okumura, A., Rokutanda, M., Yamamoto, N., and Sakakibara, R. (2000). Identification of the Promoter Region of Human Placental 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 703–708.

Fukasawa, M., Tsuchiya, T., Takayama, E., Shinomiya, N., Uyeda, K., Sakakibara, R., and Seki, S. (2004). Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J. Biochem.* 136, 273–277.

Funaba, M., Zimmerman, C.M., and Mathews, L.S. (2002). Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 41361–41368.

Gabay, M., Li, Y., and Felsher, D.W. (2014). MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, a014241–a014241.

Gallagher, E.J., and LeRoith, D. (2011). Minireview: IGF, Insulin, and Cancer. *Endocrinology* 152, 2546–2551.

Garcia-Cao, I., Song, M.S., Hobbs, R.M., Laurent, G., Giorgi, C., de Boer, V.C.J., Anastasiou, D., Ito, K., Sasaki, A.T., Rameh, L., et al. (2012). Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell* 149, 49–62.

Gatenby, R.A. (1995). The potential role of transformation-induced metabolic changes in tumor-host interaction. *Cancer Res.* 55, 4151–4156.

Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899.

Gaude, E., and Frezza, C. (2014). Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab.* 2, 10.

Ge, X., Lyu, P., Gu, Y., Li, L., Li, J., Wang, Y., Zhang, L., Fu, C., and Cao, Z. (2015). Sonic hedgehog stimulates glycolysis and proliferation of breast cancer cells: Modulation of PFKFB3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 862–868.

Geyer, M., and Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer

---

(3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 786–792.

Gillies, R.J., Robey, I., and Gatenby, R.A. (2008). Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J. Nucl. Med.* **49 Suppl 2**, 24S–42S.

Goidts, V., Bageritz, J., Puccio, L., Nakata, S., Zapatka, M., Barbus, S., Toedt, G., Campos, B., Korshunov, A., Momma, S., et al. (2012). RNAi screening in glioma stem-like cells identifies PFKFB4 as a key molecule important for cancer cell survival. *Oncogene* **31**, 3235–3243.

Gokul, G., and Khosla, S. (2013). DNA methylation and cancer. *Subcell. Biochem.* **61**, 597–625.

Goldfine, I.D. (1987). The Insulin Receptor: Molecular Biology and Transmembrane Signaling\*. *Endocr. Rev.* **8**, 235–255.

Gómez, M., Manzano, A., Navarro-Sabaté, A., Duran, J., Obach, M., Perales, J.C., and Bartrons, R. (2005). Specific expression of *pfkfb4* gene in spermatogonia germ cells and analysis of its 5'-flanking region. *FEBS Lett.* **579**, 357–362.

Gómez, M., Navarro-Sabaté, A., Manzano, A., Duran, J., Obach, M., and Bartrons, R. (2009). Switches in 6-phosphofructo-2-kinase isoenzyme expression during rat sperm maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**, 330–335.

Gómez, M., Manzano, A., Figueras, A., Viñals, F., Ventura, F., Rosa, J.L., Bartrons, R., and Navarro-Sabaté, À. (2012). Sertoli-secreted FGF-2 induces PFKFB4 isozyme expression in mouse spermatogenic cells by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **303**, E695-707.

Gordan, J.D., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 71–77.

Gordan, J.D., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2007). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* **12**, 108–113.

Goren, N., Manzano, A., Riera, L., Ambrosio, S., Ventura, F., and Bartrons, R. (2000). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase expression in rat brain during development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **75**, 138–142.

Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**, 7410–7425.

Gregoriou, M., Cornish-Bowden, A., and Trayer, I.P. (1981). Isotope-exchange evidence for allosteric regulation of hexokinase II by glucose 6-phosphate and for an obligatory addition of substrates. *Biochem. Soc. Trans.* **9**, 62–63.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer.

## Bibliografia

---

Cell 140, 883–899.

Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Capparelli, C., Balliet, R., Lin, Z., Pestell, R.G., Howell, A., Aquila, S., Andò, S., Martinez-Outschoorn, U., et al. (2012). Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- $\beta$  drives tumor growth: Connecting TGF- $\beta$  signaling with “Warburg-like” cancer metabolism and L-lactate production. *Cell Cycle* 11, 3019–3035.

Guppy, M., Greiner, E., and Brand, K. (1993). The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur. J. Biochem.* 212, 95–99.

Vander Haar, E., Lee, S.-I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.-H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9, 316–323.

Haber, R.S., Rathan, A., Weiser, K.R., Pritsker, A., Itzkowitz, S.H., Bodian, C., Slater, G., Weiss, A., and Burstein, D.E. (1998). GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer* 83, 34–40.

Hamilton, J.A., Callaghan, M.J., Sutherland, R.L., and Watts, C.K. (1997). Identification of PRG1, a novel progestin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Mol. Endocrinol.* 11, 490–502.

Han, J., Alvarez-Breckenridge, C.A., Wang, Q.-E., and Yu, J. (2015). TGF- $\beta$  signaling and its targeting for glioma treatment. *Am. J. Cancer Res.* 5, 945–955.

Han, J., Meng, Q., Xi, Q., Wang, H., and Wu, G. (2017). PFKFB3 was overexpressed in gastric cancer patients and promoted the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Cancer Biomarkers* 18, 249–256.

Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J. Biol. Chem.* 274, 27161–27167.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Hanahan, D., Coussens, L.M., Bissell, M.J., Lindblom, P., Betsholtz, C., Gerhardt, H., Semb, H., Pollard, J.W., Segall, J., Condeelis, J., et al. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309–322.

Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 774–785.

---

Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* 25, 1895–1908.

Hardie, D.G., Schaffer, B.E., and Brunet, A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol.* 26, 190–201.

Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 27879–27887.

Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2, 28.

Hayes, S.A., Huang, X., Kambhampati, S., Plataniias, L.C., and Bergan, R.C. (2003). p38 MAP kinase modulates Smad-dependent changes in human prostate cell adhesion. *Oncogene* 22, 4841–4850.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

Heine-Suñer, D., Díaz-Guillén, M.A., Lange, A.J., and Rodríguez de Córdoba, S. (1998). Sequence and structure of the human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase heart isoform gene (PFKFB2). *Eur. J. Biochem.* 254, 103–110.

Heldin, C.-H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471.

Hennipman, A., van Oirschot, B.A., Smits, J., Rijksen, G., and Staal, G.E. (1988). Glycolytic enzyme activities in breast cancer metastases. *Tumour Biol.* 9, 241–248.

Hers, H.G., and Van Schaftingen, E. (1982). Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* 206, 1–12.

Heuson, J.C., Legros, N., and Heimann, R. (1972). Influence of insulin administration on growth of the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in intact, oophorectomized, and hypophysectomized rats. *Cancer Res.* 32, 233–238.

Hirata, T., Watanabe, M., Miura, S., Ijichi, K., Fukasawa, M., and Sakakibara, R. (2000). Inhibition of tumor cell growth by a specific 6-phosphofructo-2-kinase inhibitor, N-bromoacetyethanolamine phosphate, and its analogues. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2047–2052.

Holmes, B.F., Kurth-Kraczek, E.J., and Winder, W.W. (1999). Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J.*



## Bibliografia

---

Appl. Physiol. 87, 1990–1995.

Hoppe, S., Bierhoff, H., Cado, I., Weber, A., Tiebe, M., Grummt, I., and Voit, R. (2009). AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17781–17786.

Horowitz, J.C., Lee, D.Y., Waghray, M., Keshamouni, V.G., Thomas, P.E., Zhang, H., Cui, Z., and Thannickal, V.J. (2004). Activation of the Pro-survival Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway by Transforming Growth Factor-1 in Mesenchymal Cells Is Mediated by p38 MAPK-dependent Induction of an Autocrine Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 279, 1359–1367.

Horst, H.A., Scheithauer, B.W., Kelly, P.J., and Kovach, J.S. (1992). Distribution of transforming growth factor-beta 1 in human astrocytomas. *Hum. Pathol.* 23, 1284–1288.

Horton, J.D. (2002). Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1091–1095.

Houddane, A., Bultot, L., Novellasdemunt, L., Johanns, M., Gueuning, M.-A., Vertommen, D., Coulie, P.G., Bartrons, R., Hue, L., and Rider, M.H. (2017). Role of Akt/PKB and PFKFB isoenzymes in the control of glycolysis, cell proliferation and protein synthesis in mitogen-stimulated thymocytes. *Cell. Signal.* 34, 23–37.

Huang, C., and Freter, C. (2015). Lipid Metabolism, Apoptosis and Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 924–949.

Huang, G., Shi, L.Z., and Chi, H. (2009). Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine* 48, 161–169.

Hue, L., and Rider, M.H. (1987). Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* 245, 313–324.

Hunt, T.K., Aslam, R.S., Beckert, S., Wagner, S., Ghani, Q.P., Hussain, M.Z., Roy, S., and Sen, C.K. (2007). Aerobically Derived Lactate Stimulates Revascularization and Tissue Repair via Redox Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1115–1124.

Huo, Y., Guo, X., Li, H., Wang, H., Zhang, W., Wang, Y., Zhou, H., Gao, Z., Telang, S., Chesney, J., et al. (2010). Disruption of inducible 6-phosphofructo-2-kinase ameliorates diet-induced adiposity but exacerbates systemic insulin resistance and adipose tissue inflammatory response. *J. Biol. Chem.* 285, 3713–3721.

Iannolo, G., Conticello, C., Memeo, L., and De Maria, R. (2008). Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 66, 42–51.

Ikushima, H., and Miyazono, K. (2010). Cellular context-dependent “colors” of transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Cancer Sci.* 101, 306–312.

Imagawa, M., Chiu, R., and Karin, M. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction

---

by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51, 251–260.

Imbert-Fernandez, Y., Clem, B.F., O'Neal, J., Kerr, D.A., Spaulding, R., Lanceta, L., Clem, A.L., Telang, S., and Chesney, J. (2014). Estradiol stimulates glucose metabolism via 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3). *J. Biol. Chem.* 289, 9440–9448.

Inoki, K., Haneda, M., Maeda, S., Koya, D., and Kikkawa, R. (1999). TGF-beta 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 55, 1704–1712.

Jiang, B., and Liu, L. (2009). PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. In *Advances in Cancer Research*, pp. 19–65.

Jiang, L., Deberardinis, R., and Boothman, D.A. (2015). The cancer cell “energy grid”: TGF- $\beta$ 1 signaling coordinates metabolism for migration. *Mol. Cell. Oncol.* 2, e981994.

Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., and Yang, X. (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat. Cell Biol.* 13, 310–316.

Jinnin, M., Ihn, H., and Tamaki, K. (2006). Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol. Pharmacol.* 69, 597–607.

Jurica, M.S., Mesecar, A., Heath, P.J., Shi, W., Nowak, T., and Stoddard, B.L. (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* 6, 195–210.

Kahn, C.R. (2003). Knockout Mice Challenge our Concepts of Glucose Homeostasis and the Pathogenesis of Diabetes. *Exp. Diabetes Res.* 4, 169–182.

Kamaraju, A.K., and Roberts, A.B. (2005). Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 1024–1036.

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. (2002). Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 1123–1128.

Karin, M., Liu, Z. g, and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240–246.

Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 517–531.

Kasuya, J., Paz, I.B., Maddux, B.A., Goldfine, I.D., Hefta, S.A., and Fujita-Yamaguchi, Y. (1993). Characterization of human placental insulin-like growth factor-I/insulin hybrid

## Bibliografia

---

receptors by protein microsequencing and purification. *Biochemistry* 32, 13531–13536.

Kessler, R., and Eschrich, K. (2001). Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 87, 190–195.

Khalil, N. (1999). TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect.* 1, 1255–1263.

Khan, M.I., Chesney, J.A., Laber, D.A., and Miller, D.M. (2009). Digitalis, A Targeted Therapy for Cancer? *Am. J. Med. Sci.* 337, 355–359.

Kim, E.K., and Choi, E.-J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1802, 396–405.

Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163–175.

Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C. V. (2006a). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177–185.

Kim, S.-G., Manes, N.P., El-Maghrabi, M.R., and Lee, Y.-H. (2006b). 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, 2939–2944.

Kim, Y., Ratziu, V., Choi, S.G., Lalazar, A., Theiss, G., Dang, Q., Kim, S.J., and Friedman, S.L. (1998). Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J. Biol. Chem.* 273, 33750–33758.

Kitagawa, T., Masumi, A., and Akamatsu, Y. (1991). Transforming growth factor-beta 1 stimulates glucose uptake and the expression of glucose transporter mRNA in quiescent Swiss mouse 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 266, 18066–18071.

Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H., and Uyeda, K. (1988). 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, 16796–16801.

Kjellman, C., Olofsson, S.P., Hansson, O., Von Schantz, T., Lindvall, M., Nilsson, I., Salford, L.G., Sjögren, H.O., and Widegren, B. (2000). Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int. J. Cancer* 89, 251–258.

Klarer, A.C., O'Neal, J., Imbert-Fernandez, Y., Clem, A., Ellis, S.R., Clark, J., Clem, B., Chesney, J., and Telang, S. (2014). Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3)

---

induces autophagy as a survival mechanism. *Cancer Metab.* 2, 2.

Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G.A., Grossman, A.B., and Korbonits, M. (2006). Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 205–215.

Kole, H.K., Resnick, R.J., Van Doren, M., and Racker, E. (1991). Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in ras-transformed rat-1 fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 286, 586–590.

Koochekpour, S., Merzak, A., and Pilkington, G.J. (1996). Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett.* 102, 209–215.

Kretschmer, M., and Fraenkel, D.G. (1991). Yeast 6-phosphofructo-2-kinase: sequence and mutant. *Biochemistry* 30, 10663–10672.

Kretschmer, M., Schellenberger, W., Otto, A., Kessler, R., and Hofmann, E. (1987). Fructose-2,6-bisphosphatase and 6-phosphofructo-2-kinase are separable in yeast. *Biochem. J.* 246, 755–759.

Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., and Massagué, J. (1999). A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 13, 804–816.

Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* 13, 472–482.

Kuratomi, G., Komuro, A., Goto, K., Shinozaki, M., Miyazawa, K., Miyazono, K., and Imamura, T. (2005). NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF-beta (transforming growth factor-beta) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF-beta type I receptor. *Biochem. J.* 386, 461–470.

Kurth-Kraczek, E.J., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., and Winder, W.W. (1999). 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48, 1667–1671.

Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81, 807–869.

Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol. Rev.* 92, 689–737.

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

Leber, M.F., and Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int. J. Oncol.* 34, 881–895.

## Bibliografia

---

Lee, J.-K., Choi, Y.-L., Kwon, M., and Park, P.J. (2016). Mechanisms and Consequences of Cancer Genome Instability: Lessons from Genome Sequencing Studies. *Annu. Rev. Pathol.* 11, 283–312.

Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Keys, J.R., Land vatter, S.W., et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739–746.

Lenormand, P., Sardet, C., Pagès, G., L'Allemain, G., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122, 1079–1088.

Levine, A.J., and Puzio-Kuter, A.M. (2010). The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Science* (80-. ). 330, 1340–1344.

Levy, L., and Hill, C.S. (2006). Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 41–58.

Li, H.-M., Yang, J.-G., Liu, Z.-J., Wang, W.-M., Yu, Z.-L., Ren, J.-G., Chen, G., Zhang, W., and Jia, J. (2017). Blockage of glycolysis by targeting PFKFB3 suppresses tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 36, 7.

Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., et al. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943–1947.

Li, J., Zhu, S., Tong, J., Hao, H., Yang, J., Liu, Z., and Wang, Y. (2016). Suppression of lactate dehydrogenase A compromises tumor progression by downregulation of the Warburg effect in glioblastoma. *Neuroreport* 27, 110–115.

Li, W., Wei, Z., Liu, Y., Li, H., Ren, R., and Tang, Y. (2010). Increased 18F-FDG uptake and expression of Glut1 in the EMT transformed breast cancer cells induced by TGF-beta. *Neoplasma* 57, 234–240.

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., et al. (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 218–224.

Liang, Y., Liu, J., and Feng, Z. (2013). The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell Biosci.* 3, 9.

Liberti, M. V., and Locasale, J.W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* 41, 211–218.

Lin, J., Yang, R., Tarr, P.T., Wu, P.-H., Handschin, C., Li, S., Yang, W., Pei, L., Uldry, M., Tontonoz, P., et al. (2005). Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated

---

through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell* 120, 261–273.

Liu, M., Quek, L.-E., Sultani, G., and Turner, N. (2016). Epithelial-mesenchymal transition induction is associated with augmented glucose uptake and lactate production in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Metab.* 4, 19.

Liu, P., Begley, M., Michowski, W., Inuzuka, H., Ginzberg, M., Gao, D., Tsou, P., Gan, W., Papa, A., Kim, B.M., et al. (2014). Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature* 508, 541–545.

Liu, W., Le, A., Hancock, C., Lane, A.N., Dang, C. V., Fan, T.W.-M., and Phang, J.M. (2012). Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8983–8988.

Liu, Y.-C., Li, F., Handler, J., Huang, C.R.L., Xiang, Y., Neretti, N., Sedivy, J.M., Zeller, K.I., and Dang, C. V. (2008). Global Regulation of Nucleotide Biosynthetic Genes by c-Myc. *PLoS One* 3, e2722.

Locasale, J.W. (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* 13, 572–583.

López, M., Varela, L., Vázquez, M.J., Rodríguez-Cuenca, S., González, C.R., Velagapudi, V.R., Morgan, D.A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R., et al. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat. Med.* 16, 1001–1008.

López-Barneo, J., Pardal, R., and Ortega-Sáenz, P. (2001). Cellular Mechanism of Oxygen Sensing. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 259–287.

López-Rovira, T., Chalaux, E., Massagué, J., Rosa, J.L., and Ventura, F. (2002). Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J. Biol. Chem.* 277, 3176–3185.

Lu, Y., Jiang, F., Zheng, X., Katakowski, M., Buller, B., To, S.-S.T., and Chopp, M. (2011). TGF- $\beta$ 1 promotes motility and invasiveness of glioma cells through activation of ADAM17. *Oncol. Rep.* 25, 1329–1335.

Lum, J.J., Bui, T., Gruber, M., Gordan, J.D., DeBerardinis, R.J., Covelto, K.L., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2007). The transcription factor HIF-1 alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev.* 21, 1037–1049.

Lutz, M., and Knaus, P. (2002). Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell. Signal.* 14, 977–988.

Lyshchik, A., Higashi, T., Hara, T., Nakamoto, Y., Fujimoto, K., Doi, R., Imamura, M., Saga, T., and Togashi, K. (2007). Expression of glucose transporter-1, hexokinase-II,

## Bibliografía

---

proliferating cell nuclear antigen and survival of patients with pancreatic cancer. *Cancer Invest.* 25, 154–162.

Macheda, M.L., Rogers, S., and Best, J.D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell. Physiol.* 202, 654–662.

Macias, M.J., Martin-Malpartida, P., and Massagué, J. (2015). Structural determinants of Smad function in TGF- $\beta$  signaling. *Trends Biochem. Sci.* 40, 296–308.

Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P.E., Skeen, J.E., Gottlob, K., Chandel, N.S., Thompson, C.B., Robey, R.B., and Hay, N. (2004). Hexokinase-Mitochondria Interaction Mediated by Akt Is Required to Inhibit Apoptosis in the Presence or Absence of Bax and Bak. *Mol. Cell* 16, 819–830.

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–1274.

Manzano, A., Rosa, J.L., Ventura, F., Pérez, J.X., Nadal, M., Estivill, X., Ambrosio, S., Gil, J., and Bartrons, R. (1998). Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphatase gene (PFKFB3). *Cytogenet. Cell Genet.* 83, 214–217.

Manzano, A., Pérez, J.X., Nadal, M., Estivill, X., Lange, A., and Bartrons, R. (1999). Cloning, expression and chromosomal localization of a human testis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Gene* 229, 83–89.

Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J.C., Ralph, S.J., Rodríguez-Enríquez, S., and Moreno-Sánchez, R. (2009). HIF-1 $\alpha$  modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 1084–1101.

Markert, C.L., Shaklee, J.B., and Whitt, G.S. (1975). Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 189, 102–114.

Marsin, A.-S., Bouzin, C., Bertrand, L., and Hue, L. (2002). 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, 30778–30783.

Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* 10, 1247–1255.

Martinez-Outschoorn, U.E., Pavlides, S., Howell, A., Pestell, R.G., Tanowitz, H.B., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2011). Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43,

---

1045–1051.

Martinez-Outschoorn, U.E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 113–113.

Martinive, P., Defresne, F., Bouzin, C., Saliez, J., Lair, F., Grégoire, V., Michiels, C., Dessy, C., and Feron, O. (2006). Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer Res.* *66*, 11736–11744.

Massague, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* *19*, 2783–2810.

Massagué, J. (1987). The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* *49*, 437–438.

Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 169–178.

Massagué, J. (2008). TGF $\beta$  in Cancer. *Cell* *134*, 215–230.

Massagué, J., and Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* *14*, 627–644.

Massagué, J., and Weis-Garcia, F. (1996). Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv.* *27*, 41–64.

Massie, C.E., Lynch, A., Ramos-Montoya, A., Boren, J., Stark, R., Fazli, L., Warren, A., Scott, H., Madhu, B., Sharma, N., et al. (2011). The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J.* *30*, 2719–2733.

Mathieu, M.C., Clark, G.M., Allred, D.C., Goldfine, I.D., and Vigneri, R. (1997). Insulin receptor expression and clinical outcome in node-negative breast cancer. *Proc. Assoc. Am. Physicians* *109*, 565–571.

Mathupala, S.P., Heese, C., and Pedersen, P.L. (1997). Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J. Biol. Chem.* *272*, 22776–22780.

Matsuyama, S., Iwadate, M., Kondo, M., Saitoh, M., Hanyu, A., Shimizu, K., Aburatani, H., Mishima, H.K., Imamura, T., Miyazono, K., et al. (2003). SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* *63*, 7791–7798.

Mattaini, K.R., Sullivan, M.R., and Vander Heiden, M.G. (2016). The importance of serine metabolism in cancer. *J. Cell Biol.* *214*.



## Bibliografia

---

Mazurek, S. (2011). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 969–980.

Medina, R.A., and Owen, G.I. (2002). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol. Res.* 35, 9–26.

Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am. J. Physiol.* 273, E1107-12.

Merzak, A., McCrea, S., Koocheckpour, S., and Pilkington, G.J. (1994). Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1. *Br. J. Cancer* 70, 199–203.

Meulmeester, E., and ten Dijke, P. (2011). The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. *J. Pathol.* 223, 206–219.

Meyer, N., and Penn, L.Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer* 8, 976–990.

Mezquita, J., Pau, M., and Mezquita, C. (1998). Several novel transcripts of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expressed in adult chicken testis. *J. Cell. Biochem.* 71, 127–139.

Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V., and Caro, J. (2002). 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, 6183–6187.

Minchenko, D.O., Mykhalchenko, V.G., Tsuchihara, K., Kanehara, S., Yavorovsky, O.P., Zavgorodny, I. V, Paustovsky, Y.O., Komisarenko, S. V, Esumi, H., and Minchenko, O.H. (2008). Alternative splice variants of rat 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase-4 mRNA. *Ukr. Biokhimichni Zhurnal* (1999 ) 80, 66–73.

Minchenko, O., Opentanova, I., and Caro, J. (2003). Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett.* 554, 264–270.

Minchenko, O., Opentanova, I., Minchenko, D., Ogura, T., and Esumi, H. (2004). Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activation. *FEBS Lett.* 576, 14–20.

Minchenko, O.H., Ogura, T., Opentanova, I.L., Minchenko, D.O., Ochiai, A., Caro, J., Komisarenko, S. V, and Esumi, H. (2005a). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in human lung tumor. *Ukr. Biokhimichni Zhurnal* (1999 ) 77, 46–50.

---

Minchenko, O.H., Ochiai, A., Opentanova, I.L., Ogura, T., Minchenko, D.O., Caro, J., Komisarenko, S.V., and Esumi, H. (2005b). Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie* 87, 1005–1010.

Minchenko, O.H., Opentanova, I.L., Ogura, T., Minchenko, D.O., Komisarenko, S. V, Caro, J., and Esumi, H. (2005c). Expression and hypoxia-responsiveness of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in mammary gland malignant cell lines. *Acta Biochim. Pol.* 52, 881–888.

Mizukami, Y., Yoshioka, K., Morimoto, S., and Yoshida, K. i (1997). A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J. Biol. Chem.* 272, 16657–16662.

Momcilovic, M., Hong, S.-P., and Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* 281, 25336–25343.

Montcourrier, P., Silver, I., Farnoud, R., Bird, I., and Rochefort, H. (1997). Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin. Exp. Metastasis* 15, 382–392.

Moon, J.-S., Jin, W.-J., Kwak, J.-H., Kim, H.-J., Yun, M.-J., Kim, J.-W., Park, S.W., and Kim, K.-S. (2011). Androgen stimulates glycolysis for de novo lipid synthesis by increasing the activities of hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 in prostate cancer cells. *Biochem. J.* 433, 225–233.

Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274, 1393–1418.

Morissette, M.R., Cook, S.A., Foo, S., McKoy, G., Ashida, N., Novikov, M., Scherrer-Crosbie, M., Li, L., Matsui, T., Brooks, G., et al. (2006). Myostatin Regulates Cardiomyocyte Growth Through Modulation of Akt Signaling. *Circ. Res.* 99, 15–24.

Morrison, D.K. (2012). MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011254–a011254.

Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2005). Non-Smad TGF- signals. *J. Cell Sci.* 118, 3573–3584.

Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* 31, 268–275.

Nandi, S., Guzman, R.C., and Yang, J. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3650–3657.

Narabayashi, H., Lawson, J.W., and Uyeda, K. (1985). Regulation of phosphofructokinase

## Bibliografía

---

in perfused rat heart. Requirement for fructose 2,6-bisphosphate and a covalent modification. *J. Biol. Chem.* 260, 9750–9758.

Navarro-Sabaté, A., Manzano, A., Riera, L., Rosa, J.L., Ventura, F., and Bartrons, R. (2001). The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene* 264, 131–138.

Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., and de Gramont, A. (2015). Targeting the TGF $\beta$  pathway for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 147, 22–31.

Nigdelioglu, R., Hamanaka, R.B., Meliton, A.Y., O'Leary, E., Witt, L.J., Cho, T., Sun, K., Bonham, C., Wu, D., Woods, P.S., et al. (2016). Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  Promotes de Novo Serine Synthesis for Collagen Production. *J. Biol. Chem.* 291, 27239–27251.

Nishimura, M., Fedorov, S., and Uyeda, K. (1994). 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. *J. Biol. Chem.* 269, 26100–26106.

Nordgren, K.K., and Skildum, A.J. (2015). The deep end of the metabolite pool: influences on epigenetic regulatory mechanisms in cancer. *Eur. J. Clin. Invest.* 45 Suppl 1, 9–15.

Novellademunt, L., Obach, M., Millán-Ariño, L., Manzano, A., Ventura, F., Rosa, J.L., Jordan, A., Navarro-Sabate, À., and Bartrons, R. (2012). Progestins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) in breast cancer cells. *Biochem. J.* 442, 345–356.

Novellademunt, L., Tato, I., Navarro-Sabate, A., Ruiz-Meana, M., Méndez-Lucas, A., Perales, J.C., Garcia-Dorado, D., Ventura, F., Bartrons, R., and Rosa, J.L. (2013a). Akt-dependent activation of the heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids. *J. Biol. Chem.* 288, 10640–10651.

Novellademunt, L., Navarro-Sabaté, À., Manzano, A., Rodríguez-García, A., and Bartrons, R. (2013b). PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*

Novellademunt, L., Bultot, L., Manzano, A., Ventura, F., Rosa, J.L., Vertommen, D., Rider, M.H., Navarro-Sabate, À., and Bartrons, R. (2013c). PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli. *Biochem. J.* 452, 531–543.

Nowak, G., and Schnellmann, R.G. (1996). Autocrine production and TGF-beta 1-mediated effects on metabolism and viability in renal cells. *Am. J. Physiol.* 271, F689-97.

O'Neal, J., Clem, A., Reynolds, L., Dougherty, S., Imbert-Fernandez, Y., Telang, S., Chesney, J., and Clem, B.F. (2016). Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) suppresses

---

glucose metabolism and the growth of HER2+ breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 160, 29–40.

Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., and Kemp, B.E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332, 1433–1435.

Obach, M., Navarro-Sabate, A., Caro, J., Kong, X., Duran, J., Gomez, M., Perales, J.C., Ventura, F., Rosa, J.L., and Bartrons, R. (2004). 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, 53562–53570.

Ogawa, J., Inoue, H., and Koide, S. (1997). Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int. J. Cancer* 74, 189–192.

Ohgushi, M., Kuroki, S., Fukamachi, H., O'Reilly, L.A., Kuida, K., Strasser, A., and Yonehara, S. (2005). Transforming Growth Factor  $\beta$ -Dependent Sequential Activation of Smad, Bim, and Caspase-9 Mediates Physiological Apoptosis in Gastric Epithelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10017–10028.

Okamura, N., and Sakakibara, R. (1998). 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. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2039–2042.

Okar, D.A., Manzano, A., Navarro-Sabatè, A., Riera, L., Bartrons, R., and Lange, A.J. (2001). PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem. Sci.* 26, 30–35.

Olofsson, A., Miyazono, K., Kanzaki, T., Colosetti, P., Engström, U., and Heldin, C.H. (1992). Transforming growth factor- $\beta$  1, - $\beta$  2, and - $\beta$  3 secreted by a human glioblastoma cell line. Identification of small and different forms of large latent complexes. *J. Biol. Chem.* 267, 19482–19488.

Olson, S., Uyeda, K., and McBride, O.W. (1989). Localization of fructose 6-P,2-kinase: fructose 2,6-bisphosphatase to human chromosome X. *Somat. Cell Mol. Genet.* 15, 617–621.

Orlichenko, L.S., and Radisky, D.C. (2008). Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 593–600.

Osborne, T.F. (2000). Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs): Key Regulators of Nutritional Homeostasis and Insulin Action. *J. Biol. Chem.* 275, 32379–32382.

Osborne, C.K., Bolan, G., Monaco, M.E., and Lippman, M.E. (1976). Hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture: effect of insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 4536–4540.

Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee,

## Bibliografia

---

L.A., and Dang, C. V (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275, 21797–21800.

Ottensmeyer, F.P., Beniac, D.R., Luo, R.Z., and Yip, C.C. (2000). Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry* 39, 12103–12112.

Palmieri, D., Fitzgerald, D., Shreeve, S.M., Hua, E., Bronder, J.L., Weil, R.J., Davis, S., Stark, A.M., Merino, M.J., Kurek, R., et al. (2009). Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Mol. Cancer Res.* 7, 1438–1445.

Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3, 187–197.

Pastorino, J.G., Shulga, N., and Hoek, J.B. (2002). Mitochondrial Binding of Hexokinase II Inhibits Bax-induced Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 7610–7618.

Patra, K.C., and Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* 39, 347–354.

Paulus, W., Baur, I., Huettnner, C., Schmausser, B., Roggendorf, W., Schlingensiepen, K.H., and Brysch, W. (1995). Effects of transforming growth factor-beta 1 on collagen synthesis, integrin expression, adhesion and invasion of glioma cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 236–244.

Pavelić, J., Matijević, T., and Knezević, J. (2007). Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J. Med. Res.* 125, 511–522.

Pavlidis, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., et al. (2009). The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8, 3984–4001.

Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 23, 27–47.

Pedersen, P.L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 211–222.

Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R.-H., and Huang, P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25, 4633–4646.

Peng, Q., Zhou, Q., Zhou, J., Zhong, D., Pan, F., and Liang, H. (2008). Stable RNA

---

interference of hexokinase II gene inhibits human colon cancer LoVo cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1128–1135.

Peñuelas, S., Anido, J., Prieto-Sánchez, R.M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., García-Dorado, D., Poca, M.A., Sahuquillo, J., Baselga, J., et al. (2009). TGF- $\beta$  Increases Glioma-Initiating Cell Self-Renewal through the Induction of LIF in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 15, 315–327.

Peti, W., and Page, R. (2013). Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci.* 22, 1698–1710.

Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., and Claus, T.H. (1988a). Hormonal Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 755–783.

Pilkis, S.J., Claus, T.H., and el-Maghrabi, M.R. (1988b). The role of cyclic AMP in rapid and long-term regulation of gluconeogenesis and glycolysis. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 22, 175–191.

Pilkis, S.J., Claus, T.H., Kurland, I.J., and Lange, A.J. (1995). 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase: A Metabolic Signaling Enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 799–835.

Platten, M., Wick, W., and Weller, M. (2001). Malignant glioma biology: Role for TGF- $\beta$  in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc. Res. Tech.* 52, 401–410.

Pollak, M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* 8, 915–928.

Porporato, P.E., Dhup, S., Dadhich, R.K., Copetti, T., and Sonveaux, P. (2011). Anticancer Targets in the Glycolytic Metabolism of Tumors: A Comprehensive Review. *Front. Pharmacol.* 2, 49.

Porstmann, T., Griffiths, B., Chung, Y.-L., Delpuech, O., Griffiths, J.R., Downward, J., and Schulze, A. (2005). PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* 24, 6465–6481.

Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.-K., Jang, H.G., Jha, A.K., et al. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476, 346–350.

Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437–443.

Pozuelo Rubio, M., Pegg, M., Wong, B.H.C., Morrice, N., and MacKintosh, C. (2003). 14-3-3s regulate fructose-2,6-bisphosphate levels by binding to PKB-phosphorylated cardiac fructose-2,6-bisphosphate kinase/phosphatase. *EMBO J.* 22, 3514–3523.

Principe, D.R., Doll, J.A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H.G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C.,

## Bibliografia

---

and Grippo, P.J. (2014). TGF- : Duality of Function Between Tumor Prevention and Carcinogenesis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 106, djt369-djt369.

Prior, I.A., Lewis, P.D., and Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 72, 2457–2467.

Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* 141, 39–51.

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270, 7420–7426.

Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100–3112.

Rankin, E.B., and Giaccia, A.J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 15, 678–685.

Rathmell, J.C., Fox, C.J., Plas, D.R., Hammerman, P.S., Cinalli, R.M., and Thompson, C.B. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7315–7328.

Regan, J., Breitfelder, S., Cirillo, P., Gilmore, T., Graham, A.G., Hickey, E., Klaus, B., Madwed, J., Moriak, M., Moss, N., et al. (2002). Pyrazole urea-based inhibitors of p38 MAP kinase: from lead compound to clinical candidate. *J. Med. Chem.* 45, 2994–3008.

Rempel, A., Mathupala, S.P., Griffin, C.A., Hawkins, A.L., and Pedersen, P.L. (1996). Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type II hexokinase. *Cancer Res.* 56, 2468–2471.

Rho, M., Kim, J., Jee, C. Do, Lee, Y.M., Lee, H.E., Kim, M.A., Lee, H.S., and Kim, W.H. (2007). Expression of type 2 hexokinase and mitochondria-related genes in gastric carcinoma tissues and cell lines. *Anticancer Res.* 27, 251–258.

Rider, M.H., and Bartrons, R. (2010). Fructose 2,6-bisphosphate: the last milestone of the 20th century in metabolic control? *Biochem. J.* c2.

Rider, M.H., and Hue, L. (1985). Regulation of fructose 2,6-bisphosphate concentration in white adipose tissue. *Biochem. J.* 225, 421–428.

Rider, M.H., van Damme, J., Vertommen, D., Michel, A., Vandekerckhove, J., and Hue, L. (1992). 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, 139–142.

Rider, M.H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P.A., Rousseau, G.G., and Hue, L. (2004).

---

6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem. J.* 381, 561–579.

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

Riera, L., Obach, M., Navarro-Sabaté, A., Duran, J., Perales, J.C., Viñals, F., Rosa, J.L., Ventura, F., and Bartrons, R. (2003). Regulation of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway during myogenic C2C12 cell differentiation. *FEBS Lett.* 550, 23–29.

Rimpi, S., and Nilsson, J.A. (2007). Metabolic enzymes regulated by the *Myc* oncogene are possible targets for chemotherapy or chemoprevention. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 305–310.

Rincón, M., and Davis, R.J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol. Rev.* 228, 212–224.

Robbins, D.J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C.A., Ebert, D., Geppert, T.D., and Cobb, M.H. (1993). Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J. Biol. Chem.* 268, 5097–5106.

Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291–3310.

Rodríguez-García, A., Fontova, P., Simon, H., Manzano, A., Bartrons, R., and Navarro-Sabaté, À. (2014). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology INIST-CNRS OPEN ACCESS JOURNAL PFKFB2 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose- 2,6-bisphosphatase 2). *Gene Sect. Rev. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 18.

Ros, S., and Schulze, A. (2013). Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metab.* 1, 8.

Rosen, O.M. (1989). Banting lecture 1989. Structure and function of insulin receptors. *Diabetes* 38, 1508–1511.

Ross, S., and Hill, C.S. (2008). How the Smads regulate transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 383–408.

Rousseau, G.G., and Hue, L. (1993). Mammalian 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 45, 99–127.

Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 320–344.



## Bibliografia

---

- Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G., and Sloane, B.F. (1994). Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res.* *54*, 6517–6525.
- Ruiz-Garcia, A., Monsalve, E., Novellasedemunt, L., Navarro-Sabate, A., Manzano, A., Rivero, S., Castrillo, A., Casado, M., Laborda, J., Bartrons, R., et al. (2011). Cooperation of Adenosine with Macrophage Toll-4 Receptor Agonists Leads to Increased Glycolytic Flux through the Enhanced Expression of PFKFB3 Gene. *J. Biol. Chem.* *286*, 19247–19258.
- Ruley, H.E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* *304*, 602–606.
- Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S.Y., Bauer, A., Karin, M., and Wagner, E.F. (2004). Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol. Cell* *15*, 713–725.
- Sachdev, D., and Yee, D. (2001). The IGF system and breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *8*, 197–209.
- Saj, A., and Lai, E.C. (2011). Control of microRNA biogenesis and transcription by cell signaling pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 504–510.
- Sakai, A., Kato, M., Fukasawa, M., Ishiguro, M., Furuya, E., and Sakakibara, R. (1996). Cloning of cDNA encoding for a novel isozyme of fructose 6-phosphate, 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase from human placenta. *J. Biochem.* *119*, 506–511.
- Sakakibara, R., Uemura, M., Hirata, T., Okamura, N., and Kato, M. (1997). Human placental fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: its isozymic form, expression and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *61*, 1949–1952.
- Sakata, J., Abe, Y., and Uyeda, K. (1991). Molecular cloning of the DNA and expression and characterization of rat testes fructose-6-phosphate,2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* *266*, 15764–15770.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* *414*, 799–806.
- Samuels, V., Barrett, J.M., Bockman, S., Pantazis, C.G., and Allen, M.B. (1989). Immunocytochemical study of transforming growth factor expression in benign and malignant gliomas. *Am. J. Pathol.* *134*, 894–902.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496–1501.
- Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T., and Ishii, S. (1999). ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* *274*, 8949–8957.

- 
- Santos, C.R., and Schulze, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* 279, 2610–2623.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* (80-. ). 307, 1098–1101.
- Van Schaftingen, E. (1987). Fructose 2,6-bisphosphate. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 59, 315–395.
- Schering, B., Eigenbrodt, E., Linder, D., and Schoner, W. (1982). Purification and properties of pyruvate kinase type M2 from rat lung. *Biochim. Biophys. Acta* 717, 337–347.
- Schoors, S., De Bock, K., Cantelmo, A.R., Georgiadou, M., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Kuchnio, A., Wong, B.W., Quaegebeur, A., Goveia, J., et al. (2014). Partial and Transient Reduction of Glycolysis by PFKFB3 Blockade Reduces Pathological Angiogenesis. *Cell Metab.* 19, 37–48.
- Schwartzberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M., and Karnieli, E. (2004). The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* 64, 2627–2633.
- Semenza, G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64, 993–998.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721–732.
- Semenza, G.L. (2008). Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis. *IUBMB Life* 60, 591–597.
- Semenza, G.L. (2010). Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 336–361.
- Seoane, J. (2008). The TGFβ pathway as a therapeutic target in cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 10, 14–19.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390–2400.
- Shaw, R.J., and Cantley, L.C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424–430.
- Shaw, R.J., Bardeesy, N., Manning, B.D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 6, 91–99.
- Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Implications of mapping the human telomerase gene (hTERT) as the most distal gene on chromosome 5p. *Neoplasia* 2, 195–196.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane
-

## Bibliografía

---

to the nucleus. *Cell* 113, 685–700.

Shields, J.D., Kourtis, I.C., Tomei, A.A., Roberts, J.M., and Swartz, M.A. (2010). Induction of Lymphoidlike Stroma and Immune Escape by Tumors That Express the Chemokine CCL21. *Science* (80-. ). 328, 749–752.

Siegel, P.M., and Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–820.

Simon-Molas, H., Calvo-Vidal, M.N., Castaño, E., Rodríguez-García, A., Navarro-Sabaté, À., Bartrons, R., and Manzano, A. (2016). Akt mediates TIGAR induction in HeLa cells following PFKFB3 inhibition. *FEBS Lett.* 590, 2915–2926.

Simpson, L., Li, J., Liaw, D., Hennessy, I., Oliner, J., Christians, F., and Parsons, R. (2001). PTEN expression causes feedback upregulation of insulin receptor substrate 2. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3947–3958.

Singh, S., and Trigun, S.K. (2010). Activation of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Cerebellum of Chronic Hepatic Encephalopathy Rats is Associated with Up-regulation of NADPH-Producing Pathway. *The Cerebellum* 9, 384–397.

Slamon, D.J. (1987). Proto-Oncogenes and Human Cancers. *N. Engl. J. Med.* 317, 955–957.

Slot, J.W., Geuze, H.J., Gigengack, S., James, D.E., and Lienhard, G.E. (1991). Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7815–7819.

Smallbone, K., Gavaghan, D.J., Gatenby, R.A., and Maini, P.K. (2005). The role of acidity in solid tumour growth and invasion. *J. Theor. Biol.* 235, 476–484.

Snell, K. (1984). Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 325–400.

Steigerwalt, R.W., Rundhaug, J.E., and Nettesheim, P. (1992). Transformed rat tracheal epithelial cells exhibit alterations in transforming growth factor-beta secretion and responsiveness. *Mol. Carcinog.* 5, 32–40.

Stewart, H.B., el-Maghrabi, M.R., and Pilkis, S.J. (1986). Mechanism of activation of fructose-2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 261, 8793–8798.

Sun, H., Zhong, X., Wang, C., Wang, S., Lin, L., Zou, R., Wu, Y., Sun, N., Sun, G., Wen, T., et al. (2016). SNF5 is Involved in Suppression of Hepatocellular Carcinoma Progression via TGF-Beta 1 Signaling. *Anat. Rec.* 299, 869–877.

Sun, Q., Chen, X., Ma, J., Peng, H., Wang, F., Zha, X., Wang, Y., Jing, Y., Yang, H., Chen, R., et al. (2011). Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase

---

isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4129–4134.

Sun, X.J., Crimmins, D.L., Myers, M.G., Miralpeix, M., and White, M.F. (1993). Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7418–7428.

Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., and Neumann, D. (2006). Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 281, 32207–32216.

Suwanabol, P.A., Seedial, S.M., Zhang, F., Shi, X., Si, Y., Liu, B., and Kent, K.C. (2012). TGF- $\beta$  and Smad3 modulate PI3K/Akt signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H2211-9.

Szabolcs, M., Keniry, M., Simpson, L., Reid, L.J., Koujak, S., Schiff, S.C., Davidian, G., Licata, S., Gruvberger-Saal, S., Murty, V.V.V.S., et al. (2009). Irs2 Inactivation Suppresses Tumor Progression in Pten<sup>+/-</sup> Mice. *Am. J. Pathol.* 174, 276–286.

Takekawa, M., Tatebayashi, K., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K., and Saito, H. (2002). Smad-dependent GADD45 $\beta$  expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- $\beta$ . *EMBO J.* 21, 6473–6482.

Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669.

Tarrado-Castellarnau, M., de Atauri, P., and Cascante, M. (2016). Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming. *Oncotarget* 7, 62726–62753.

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

Telang, S., Yalcin, A., Clem, A.L., Bucala, R., Lane, A.N., Eaton, J.W., and Chesney, J. (2006). Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* 25, 7225–7234.

Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., and Zhao, J.J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer* 15, 7–24.

Tian, M., Neil, J.R., and Schiemann, W.P. (2011). Transforming growth factor- $\beta$  and the hallmarks of cancer. *Cell. Signal.* 23, 951–962.

Toth, J.I., Datta, S., Athanikar, J.N., Freedman, L.P., and Osborne, T.F. (2004). Selective Coactivator Interactions in Gene Activation by SREBP-1 $\alpha$  and -1 $\gamma$ . *Mol. Cell. Biol.* 24, 8288–8300.

Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 579–

## Bibliografia

---

591.

Tran, H., Maurer, F., and Nagamine, Y. (2003). Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7177–7188.

Trefely, S., Khoo, P.-S., Krycer, J.R., Chaudhuri, R., Fazakerley, D.J., Parker, B.L., Sultani, G., Lee, J., Stephan, J.-P., Torres, E., et al. (2015). Kinome Screen Identifies PFKFB3 and Glucose Metabolism as Important Regulators of the Insulin/Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 290, 25834–25846.

Trenti, A., Tedesco, S., Boscaro, C., Ferri, N., Cignarella, A., Trevisi, L., and Bolego, C. (2017). The glycolytic enzyme PFKFB3 is involved in estrogen-mediated angiogenesis via GPER1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* jpet.116.238212.

Tsuchiya, Y., and Uyeda, K. (1994). Bovine heart fructose 6-P<sub>2</sub>-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase mRNA and gene structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 467–474.

Tsun, Z.-Y., and Possemato, R. (2015). Amino acid management in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 43, 22–32.

Tudzarova, S., Colombo, S.L., Stoeber, K., Carcamo, S., Williams, G.H., and Moncada, S. (2011). Two ubiquitin ligases, APC/C-Cdh1 and SKP1-CUL1-F (SCF)-beta-TrCP, sequentially regulate glycolysis during the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5278–5283.

Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.C., and Tsubokawa, M. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313, 756–761.

Valera, A., Pujol, A., Gregori, X., Riu, E., Visa, J., and Bosch, F. (1995). Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis. *FASEB J.* 9, 1067–1078.

Vallett, S.M., Sanchez, H.B., Rosenfeld, J.M., and Osborne, T.F. (1996). A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J. Biol. Chem.* 271, 12247–12253.

Vazquez, A., Markert, E.K., and Oltvai, Z.N. (2011). Serine biosynthesis with one carbon catabolism and the glycine cleavage system represents a novel pathway for ATP generation. *PLoS One* 6, e25881.

Venkatesan, S., Natarajan, A.T., and Hande, M.P. (2015). Chromosomal instability—mechanisms and consequences. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 793, 176–184.

Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Gil, J., and Bartrons, R. (1991). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in rat brain. *Biochem. J.* 455–460.

- 
- Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Pilkis, S.J., and Bartrons, R. (1992). Bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Evidence for a neural-specific isozyme. *J. Biol. Chem.* *267*, 17939–17943.
- Ventura, F., Ambrosio, S., Bartrons, R., el-Maghrabi, M.R., Lange, A.J., and Pilkis, S.J. (1995). Cloning and expression of a catalytic core bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *209*, 1140–1148.
- Vidal, H., Crepin, K.M., Rider, M.H., Hue, L., and Rousseau, G.G. (1993). Cloning and expression of novel isoforms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from bovine heart. *FEBS Lett.* *330*, 329–333.
- Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Frittitta, L., and Vigneri, R. (2006). Obesity and cancer. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* *16*, 1–7.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* *70*, 523–526.
- Vora, S., Halper, J.P., and Knowles, D.M. (1985). Alterations in the activity and isozymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo and in vitro: transformation- and progression-linked discriminants of malignancy. *Cancer Res.* *45*, 2993–3001.
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 594–604.
- Wahlström, T., and Henriksson, M.A. (2015). Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* *1849*, 563–569.
- Wallace, D.C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 685–698.
- Wang, X., and Jin, H. (2010). The epigenetic basis of the Warburg effect. *Epigenetics* *5*, 566–568.
- Wang, X., Destrument, A., and Tournier, C. (2007). Physiological roles of MKK4 and MKK7: Insights from animal models. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1773*, 1349–1357.
- Wang, Y., Zhou, Y., and Graves, D.T. (2014). FOXO Transcription Factors: Their Clinical Significance and Regulation. *Biomed Res. Int.* *2014*, 1–13.
- Warburg, O. (1925). THE METABOLISM OF CARCINOMA CELLS. *J. Cancer Res.* *9*, 148–163.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* *123*, 309–314.
- Watanabe, F., Sakai, A., Furuya, E., and Uyeda, K. (1994). Molecular-Cloning and Tissue-Specific Expression of Fructose 6-Phosphate 2-Kinase:Fructose 2,6-Bisphosphatase of Rat Brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *198*, 335–340.
-

## Bibliografia

---

Wątroba, M., Maślińska, D., and Maśliński, S. (2012). Current overview of functions of FoxO proteins, with special regards to cellular homeostasis, cell response to stress, as well as inflammation and aging. *Adv. Med. Sci.* 57, 183–195.

Wee, P., and Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 9, 52.

Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8788–8793.

Weiss, A., and Attisano, L. (2013). The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 47–63.

Weiss, M., Steiner, D.F., and Philipson, L.H. (2000). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships (MDText.com, Inc.).

Weller, M., and Fontana, A. (1995). The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 21, 128–151.

White, M.F., and Kahn, C.R. (1994). The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269, 1–4.

Wicks, S.J., Lui, S., Abdel-Wahab, N., Mason, R.M., and Chantry, A. (2000). Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8103–8111.

Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., et al. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18782–18787.

Wojtczak, L., Teplova, V. V, Bogucka, K., Czyz, A., Makowska, A., Wieckowski, M.R., Duszyński, J., and Evtodienko, Y. V (1999). 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, 495–501.

Wolf, A., Agnihotri, S., Micallef, J., Mukherjee, J., Sabha, N., Cairns, R., Hawkins, C., and Guha, A. (2011). Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J. Exp. Med.* 208, 313–326.

Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* 13, 2004–2008.

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.-P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson,

- 
- M., and Carling, D. (2005). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2, 21–33.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* 370, 341–347.
- Wrighton, K.H., Lin, X., and Feng, X.-H. (2009). Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Res.* 19, 8–20.
- Wu, L., and Derynck, R. (2009). Essential Role of TGF- $\beta$  Signaling in Glucose-Induced Cell Hypertrophy. *Dev. Cell* 17, 35–48.
- Xiao, B., Sanders, M.J., Carmena, D., Bright, N.J., Haire, L.F., Underwood, E., Patel, B.R., Heath, R.B., Walker, P.A., Hallen, S., et al. (2013). Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat. Commun.* 4, 3017.
- Xie, M., Zhang, D., Dyck, J.R.B., Li, Y., Zhang, H., Morishima, M., Mann, D.L., Taffet, G.E., Baldini, A., Khoury, D.S., et al. (2006). A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17378–17383.
- Yalcin, A., Telang, S., Clem, B., and Chesney, J. (2009). Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 86, 174–179.
- Yalcin, A., Clem, B.F., Imbert-Fernandez, Y., Ozcan, S.C., Peker, S., O'Neal, J., Klarer, A.C., Clem, A.L., Telang, S., and Chesney, J. (2014). 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis.* 5, e1337.
- Yamada, N., Kato, M., Yamashita, H., Nistér, M., Miyazono, K., Heldin, C.H., and Funai, K. (1995). Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma. *Int. J. Cancer* 62, 386–392.
- Yang, M., and Vousden, K.H. (2016). Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 650–662.
- Yang, L., Pang, Y., and Moses, H.L. (2010). TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 31, 220–227.
- Yang, Y., Tang, B., Robinson, G., Hennighausen, L., Brodie, S.G., Deng, C.-X., and Wakefield, L.M. (2002). Smad3 in the mammary epithelium has a nonredundant role in the induction of apoptosis, but not in the regulation of proliferation or differentiation by transforming growth factor-beta. *Cell Growth Differ.* 13, 123–130.
- Yarza, R., Vela, S., Solas, M., and Ramirez, M.J. (2016). c-Jun N-terminal Kinase (JNK)
-



## Bibliografia

---

Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Front. Pharmacol.* 6, 321.

Ye, J., Mancuso, A., Tong, X., Ward, P.S., Fan, J., Rabinowitz, J.D., and Thompson, C.B. (2012). Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6904–6909.

Yen, C.-Y., Huang, H.-W., Shu, C.-W., Hou, M.-F., Yuan, S.-S.F., Wang, H.-R., Chang, Y.-T., Farooqi, A.A., Tang, J.-Y., and Chang, H.-W. (2016). DNA methylation, histone acetylation and methylation of epigenetic modifications as a therapeutic approach for cancers. *Cancer Lett.* 373, 185–192.

Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21–44.

Yoshida, G.J. (2015). Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34, 111.

Younes, M., Lechago, L. V, Somoano, J.R., Mosharaf, M., and Lechago, J. (1997). Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res.* 17, 2747–2750.

Young, V.J., Brown, J.K., Maybin, J., Saunders, P.T.K., Duncan, W.C., and Horne, A.W. (2014). Transforming Growth Factor- $\beta$  Induced Warburg-Like Metabolic Reprogramming May Underpin the Development of Peritoneal Endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 3450–3459.

Yu, L., Chen, X., Wang, L., and Chen, S. (2015). The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget* 7, 38908–38926.

Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497–5510.

Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., Schmidt, K., Willson, J.K. V., Markowitz, S., Zhou, S., et al. (2009). Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science* (80-. ). 325, 1555–1559.

Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19, 128–139.

Zhang, F., and Du, G. (2012). Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World J. Biol. Chem.* 3, 167.

Zhang, H., and Yee, D. (2006). Is the Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor a Therapeutic Target in Endometrial Cancer? *Clin. Cancer Res.* 12, 6323–6325.

Zhang, G., Li, X., Wang, J., and Wei, L. (2012). [Preliminary investigation of the expression and functions of insulin receptor isoforms in endometrial carcinoma]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 47, 839–845.

---

Zhang, H., Fagan, D.H., Zeng, X., Freeman, K.T., Sachdev, D., and Yee, D. (2010). Inhibition of cancer cell proliferation and metastasis by insulin receptor downregulation. *Oncogene* 29, 2517–2527.

Zhang, J., Tian, X.-J., Zhang, H., Teng, Y., Li, R., Bai, F., Elankumaran, S., and Xing, J. (2014). TGF- $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. *Sci. Signal.* 7, ra91.

Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X.-H., Meng, A., and Chen, Y.-G. (2007). Smad7 Antagonizes Transforming Growth Factor Signaling in the Nucleus by Interfering with Functional Smad-DNA Complex Formation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4488–4499.

Zhang, W., Zhang, S.-L., Hu, X., and Tam, K.Y. (2015). Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? *Int. J. Biol. Sci.* 11, 1390–1400.

Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L., and Simons, J.W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 59, 5830–5835.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167–1174.

Zhuo, B., Li, Y., Li, Z., Qin, H., Sun, Q., Zhang, F., Shen, Y., Shi, Y., and Wang, R. (2015). PI3K/Akt signaling mediated Hexokinase-2 expression inhibits cell apoptosis and promotes tumor growth in pediatric osteosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 401–406.

Zorzano, A., Sevilla, L., Tomàs, E., Gumà, A., Palacín, M., and Fischer, Y. (1997). GLUT4 trafficking in cardiac and skeletal muscle: isolation and characterization of distinct intracellular GLUT4-containing vesicle populations. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 968–974.

Zu, X.L., and Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 459–465.



# PUBLICACIONES

---



**TGF- $\beta$ 1 targets Smad, p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways to induce PFKFB3 gene expression and glycolysis in glioblastoma cells**

Ana Rodríguez-García<sup>1</sup>, Paula Samsó<sup>1</sup>, Pere Fontova<sup>1</sup>, Helga Simon-Molas<sup>1</sup>, Anna Manzano<sup>1</sup>, Esther Castaño<sup>2</sup>, Jose Luis Rosa<sup>1</sup>, Ubaldo Martinez-Outshoorn<sup>3</sup>, Francesc Ventura<sup>1</sup>, Àurea Navarro-Sabaté<sup>\*,1,2</sup>, Ramon Bartrons<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Bioquímica. Departament de Ciències Fisiològiques, IDIBELL - Universitat de Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Centres Científics i Tecnològics - Universitat de Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>Department of Medical Oncology, Sidney Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA

\* These authors share senior co-authorship

**Correspondence:**

Dr. Ramon Bartrons, Unitat de Bioquímica. Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona-IDIBELL, Feixa Llarga s/n. E-08907 L'Hospitalet, Barcelona (Spain).

Fax: (+34)934024268

Tel: (+34)934024252

E-mail: rbartrons@ub.edu

**Running title:** TGF- $\beta$ 1 induces PFKFB3 gene expression in T98G cells

Article type : Original Article

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/febs.14201

This article is protected by copyright. All rights reserved.

## Abbreviations:

3PO: 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one

Erk: Extracellular signal-regulated kinase

Fru-2,6-P<sub>2</sub>: Fructose 2,6-bisphosphate

GLUT1: Glucose transporter 1

HK-II: Hexokinase-II

Hsp25: Heat shock protein 25

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LDH-A: Lactate dehydrogenase-A

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

PFK-1: Phosphofructokinase-1

PFKFB1-4: Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 1-4

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

S6: S6 Ribosomal Protein

TGF- $\beta$ 1: Transforming growth factor 1

T $\beta$ RI: TGF- $\beta$  type I serine/threonine kinase receptor

T $\beta$ RII: TGF- $\beta$  type II serine/threonine kinase receptor

**Keywords:** TGF- $\beta$ 1, PFKFB3, gene regulation, glycolysis and glioblastoma

**Conflicts of interest:** All authors have no conflicts of interest to disclose.

## ABSTRACT

In human cancers, TGF- $\beta$ 1 plays a dual role by acting as both a tumor suppressor and a promoter of tumor metastasis. Although TGF- $\beta$ 1 contributes to the metabolic reprogramming of cancer cells and tumor-associated stromal cells, little is known of

the molecular mechanisms connecting this cytokine with enhanced glycolysis. PFKFB3 is a homodimeric bifunctional enzyme, belonging to the family of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases, that controls the conversion of fructose-6-phosphate to fructose-2,6-bisphosphate. This metabolite is important for the dynamic regulation of glycolytic flux by allosterically activating phosphofructokinase-1, a rate-limiting enzyme in glycolysis. The PFKFB3 gene is involved in cell proliferation via its role in carbohydrate metabolism. Here, we studied the mechanisms connecting TGF- $\beta$ 1, glucose metabolism and PFKFB3 in glioblastoma cell lines. We demonstrate that TGF- $\beta$ 1 upregulates PFKFB3 mRNA and protein expression resulting in an increase in Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration, glucose uptake, glycolytic flux and lactate production. Moreover, these increases in PFKFB3 mRNA and protein expression and Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration were reduced when the Smad3, p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways were inhibited. We demonstrate that inhibition of PFKFB3 activity with 3PO or siRNA-mediated knockdown of PFKFB3 significantly eliminated the capacity of the T98G cells to form colonies by TGF- $\beta$ 1, one of the hallmarks of transformation. Taken together, these results show that TGF- $\beta$ 1 induces PFKFB3 expression through activation of the p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways that complement and converge with early activation of Smad signaling. This suggests that PFKFB3 induction by TGF- $\beta$ 1 can be one of the main mechanisms mediating the reprogramming of glioma cells.

## **INTRODUCTION**

Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is a multifunctional cytokine that regulates a variety of cellular processes such as cell differentiation, proliferation, cycle arrest, survival and adhesion, as well as extracellular matrix production [1]. The pleiotropic functions of TGF- $\beta$ 1 are partly due to its capacity for direct control over multiple



Accepted Article

signaling networks, that are highly dependent on context and cell type [2,3]. TGF- $\beta$ 1 initiates signaling by stimulating the formation of heteromeric complexes of TGF- $\beta$ 1 type I and type II serine/threonine kinase receptors (T $\beta$ RI and T $\beta$ RII respectively). In the canonical pathway, upon activation of the TGF- $\beta$ 1/receptor complex, Smad2 and Smad3 (R-Smads) become phosphorylated at the C-terminal SSXS motif and associated with Smad4 (Co-Smad) [4]. This R-Smad/Co-Smad4 complex translocates to the nucleus, where it binds to DNA either directly or in association with other DNA-binding proteins. Through this combinatorial interaction with different transcription factors, the TGF- $\beta$ 1 stimulus can activate or repress hundreds of target genes at once [1]. In addition to Smads, TGF- $\beta$ 1 can trigger other signaling pathways mediated by proteins such as p38, extracellular signal-regulated kinase (Erk) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and small Rho-like GTPase, among others [5,6]. Moreover, crosstalk between the Smad and non-canonical pathways has been demonstrated although the mechanisms by which they regulate each other are not fully understood [7].

In general terms, TGF- $\beta$ 1 acts as a tumor suppressor in normal tissues, in pre-malignant cells or during early stages of tumor development, preventing tumor growth and inducing apoptosis. However, tumor cells can become selectively refractory to the cytostatic effects of TGF- $\beta$ 1 through the activation of proto-oncogenes or inactivation of tumor suppressor genes, thereby promoting epithelial to mesenchymal transition (EMT), tumor cell progression, migration, invasion, immune suppression, angiogenesis and metastasis [1,5,8]. TGF- $\beta$ 1 secretion is enhanced in glioblastoma multiforme, [9,10], in which it acts as an oncogenic factor [11,12]. TGF-

$\beta$ 1 was firstly linked to cancer metabolism through the observation of enhanced glycolysis, amino acid uptake and lactate production upon TGF- $\beta$ 1 treatment in ras- and myc-transformed cells cultures [13]. TGF- $\beta$ 1 contributes to the metabolic reprogramming of cancer cells and tumor-associated stromal cells [14–20].

Enhanced glycolysis is essential for oncogenesis and for the survival and proliferation of cancer cells in the tumor microenvironment. Cancer cells preferentially rely on aerobic glycolysis rather than oxidative phosphorylation for energy production and provision of precursors for macromolecule biosynthesis, even in the presence of oxygen, a phenomenon known as the Warburg effect [21]. The conversion of fructose 6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate by 6-Phosphofructo-1-kinase (PFK-1) is a critical step for a high glycolytic rate. Fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) is the most potent allosteric stimulator of PFK-1 and inhibitor of fructose-1,6-bisphosphatase, and hence critically regulates carbohydrate metabolism [22,23]. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) [EC:2.7.1.105/EC:3.1.3.46] catalyses both the synthesis and degradation of Fru-2,6-P<sub>2</sub>. There are four PFKFB genes in mammals (PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 and PFKFB4) coding for the different kinase/bisphosphatase isoenzymes. The four PFKFBs have different cellular expression patterns, display different kinase/bisphosphatase activity ratios and are controlled by different protein kinases. In cancer cells, the concentration of Fru-2,6-P<sub>2</sub> is generally elevated due to overexpression and activation of the PFKFB3 and PFKFB4 isoenzymes [24–28]. The PFKFB3 isoenzyme has the highest kinase/bisphosphatase activity ratio, favouring net synthesis of Fru-2,6-P<sub>2</sub> [29]. It is ubiquitously expressed and is present in proliferating tissues [30–32], transformed cells [24,25,27,33] and in various solid

tumors, such as astrocytoma and glioblastoma, contributing to enhanced glycolysis and lactate production in these tumors [32,34]. Moreover, induction of PFKFB3 gene expression has been reported in response to different stimuli including hypoxia [27], progestins [35], growth factors such as insulin [25], proinflammatory molecules such as interleukin-6 [36], lipopolysaccharide and adenosine [37], and stress stimuli [38].

To date, no link has been reported between increased concentrations of TGF- $\beta$ 1 and PFKFB3 expression. Here, we studied the role of TGF- $\beta$ 1 signaling in regulating PFKFB3-modulated glycolysis. We hypothesized that TGF- $\beta$ 1 drives glycolysis and aggressive cancer by enhancing PFKFB3 activity.

## RESULTS

### **TGF- $\beta$ 1 upregulates glycolysis and PFKFB3 expression in glioblastoma cells**

To determine the effects of TGF- $\beta$ 1 on glycolytic enzymes expression, we performed a quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in T98G cells after treatment with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) for 8 hours. TGF- $\beta$ 1 increased mRNA expression of glucose transporter 1 (GLUT1), hexokinase-II (HK-II), and lactate dehydrogenase-A (LDH-A) (Fig.1A-C). To study whether TGF- $\beta$ 1 regulates PFKFBs mRNA expression, we performed qRT-PCR using specific primers for human PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 and PFKFB4. The results showed that only PFKFB3 isoform mRNA was upregulated by TGF- $\beta$ 1 treatment. PFKFB2 and PFKFB4 remained unchanged and expression levels of PFKFB1 were undetectable (Fig. 1D). To assess the sensitivity of the TGF- $\beta$ 1 response, we incubated T98G cells with different TGF- $\beta$ 1 concentrations for 8 hours. Doses from 4 to 12 ng/ml had similar effects on PFKFB3 mRNA gene expression

(Fig. 1E) and PFKFB3 protein levels (Fig. 1F). Hence, a concentration of 4 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 was used for subsequent experiments.

In order to determine the time dependency of TGF- $\beta$ 1 stimulation on the PFKFB3 gene, we treated T98G cells with TGF- $\beta$ 1 and performed time-course experiments. qRT-PCR showed progressive induction of PFKFB3 mRNA after 30 min, reaching a maximum at 2 hours (Fig. 2A). PFKFB3 expression was maintained significantly increased at 4 and 8 hours. A parallel induction pattern of PFKFB3 protein levels was observed (Fig. 2B-C). Besides, the amount of PFKFB3 phosphorylation at S461 (P-PFKFB3) increased in parallel to total PFKFB3 levels, thus maintaining the ratio of P-PFKFB3 to total PFKFB3 remained unchanged in response to TGF- $\beta$ 1 (Fig. 2C).

Furthermore, TGF- $\beta$ 1 caused time-dependent modulation of the intracellular concentration of Fru-2,6-P<sub>2</sub>, which was significantly increased within 2 hours of incubation with TGF- $\beta$ 1. Thus, the observed increase in PFKFB3 protein levels correlated with the increase in the metabolic product of this enzyme (Fig. 3A). Consistently, glucose uptake, glycolytic flux and lactate production were increased after TGF- $\beta$ 1 treatment (Fig. 3B-D).

Similar results were obtained in the malignant glioma cell line U87MG. The results showed that only PFKFB3 mRNA isoform was upregulated after 8 hours of treatment with TGF- $\beta$ 1 (Fig. 4A). Also, the mRNA expression of the glycolytic gene GLUT1 was significantly increased (Fig. 4B). Time-course experiments showed progressive

induction of PFKFB3 mRNA after 1 hour of treatment (Fig. 4C) and increased PFKFB3 protein levels, accompanied with significantly increased Fru-2,6-P<sub>2</sub> production (Fig. 4D-F).

To gain insight into the mechanism by which TGF- $\beta$ 1 regulates mRNA and protein expression of PFKFB3, T98G cells were pre-treated with actinomycin D (5  $\mu$ g/ml), a general transcription inhibitor, or cycloheximide (20  $\mu$ g/ml), a protein synthesis inhibitor, before TGF- $\beta$ 1 treatment. The TGF- $\beta$ 1-induced increase in PFKFB3 protein levels was significantly prevented by the addition of actinomycin D (Fig. 5A-B), suggesting that PFKFB3 is regulated at the transcriptional level. Moreover, PFKFB3 protein induction after TGF- $\beta$ 1 treatment was totally inhibited by incubation of T98G with cycloheximide, showing that translation was necessary for TGF- $\beta$ 1 to upregulate PFKFB3. mRNA analysis by qRT-PCR demonstrated that PFKFB3 mRNA induction by TGF- $\beta$ 1 was completely abrogated by pre-treating cells with actinomycin D; whereas the presence of cycloheximide did not block TGF- $\beta$ 1-mediated induction of PFKFB3 mRNA, at 2 or 4 hours (Fig. 5C). Therefore, these data suggest that induction of PFKFB3 gene transcription is a direct effect of TGF- $\beta$ 1 and does not require *de novo* protein synthesis.

To further study TGF- $\beta$ 1 transcriptional effects on PFKFB3 gene, T98G cells were first treated with TGF- $\beta$ 1 for 2 hours to achieve steady-state PFKFB3 mRNA levels, followed by actinomycin D addition to cell cultures. PFKFB3 mRNA levels decreased more rapidly after the addition of actinomycin D, compared to TGF- $\beta$ 1 treatment alone (Fig. 5D). Altogether, these results suggest that early PFKFB3 mRNA

induction by TGF- $\beta$ 1 is due to transcriptional activation of the PFKFB3 gene promoter.

### **PFKFB3 induction in response to TGF- $\beta$ 1 is mediated by the Smad pathway**

First, we assessed the activation of Smad proteins in response to TGF- $\beta$ 1 treatment. Western blot analysis showed TGF- $\beta$ 1-dependent phosphorylation of Smad2 and Smad3 in a time-dependent manner, indicating that the T98G cell line preserves an unaltered TGF- $\beta$ 1 signaling pathway (Fig. 6A-B) and has a pattern compatible with PFKFB3 mRNA induction.

Next, we aimed to prove the direct role of Smad proteins in PFKFB3 induction. For that purpose, T98G cells were transiently transfected with Smad3 and/or Smad4 expression vectors and, when indicated, treated with TGF- $\beta$ 1 for 2 hours. Overexpression of both Smad3 and Smad4 led to an increase in PFKFB3 protein levels, which was further boosted in the presence of TGF- $\beta$ 1 (Fig. 6C-D).

To further establish that Smad proteins are intermediate molecules between TGF- $\beta$ 1 and PFKFB3 modulation, we decreased Smad2/3 and/or Smad4 by siRNA-mediated knockdown. Transfection of Smad2/3 and Smad4 siRNAs for 72 hours reduced TGF- $\beta$ 1-mediated PFKFB3 induction after 2 hours of treatment by 46% and 43%, respectively. The reduction was more prominent when both siRNA were transfected together, achieving a 74% decrease in PFKFB3 protein levels (Fig. 6E-F).

We next evaluated the effect of pharmacological inhibition of Smad3 on PFKFB3 protein and gene expression. T98G cells were pre-treated with the Smad3 inhibitor SIS3 (20  $\mu$ M) for 30 minutes and then treated with TGF- $\beta$ 1 for 2 hours. PFKFB3 protein and mRNA expression were significantly reduced by Smad3 inhibition (Fig. 7A-C). Furthermore, the increase in Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration after TGF- $\beta$ 1 treatment was also reduced in the presence of SIS3 (Fig. 7D), highlighting the importance of Smad3 protein in PFKFB3 regulation in this model.

All these results suggested that Smad proteins are directly involved in PFKFB3 regulation in response to TGF- $\beta$ 1. However, neither the induction of PFKFB3 protein and mRNA expression nor the increase in Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration in response to TGF- $\beta$ 1 was decreased to control levels when cells were incubated with both TGF- $\beta$ 1 and Smad inhibitors, indicating that other signaling pathways may participate in the regulation of PFKFB3 expression.

### **p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways are involved in PFKFB3 induction by TGF- $\beta$ 1**

TGF- $\beta$ 1 activates Smad signaling pathway, but it may induce the phosphorylation of several other downstream targets in a cell type-specific manner, including p38, Akt, Erk1/2 and JNK [5,7]. To study the possible involvement of these signaling pathways in PFKFB3 protein induction, we tested p38, Akt, Erk1/2 and JNK phosphorylation in response to TGF- $\beta$ 1. Western blot analysis showed increased p38 and Akt

phosphorylation after TGF- $\beta$ 1 treatment in T98G cells; whereas Erk1/2 and JNK phosphorylation remained unaffected for 8 hours (Fig. 8A-B).

To verify that p38 and Akt phosphorylation required activation by TGF- $\beta$ 1 receptor, we next pre-treated T98G cells with the T $\beta$ RI inhibitor, LY2109761, for 30 min, followed by stimulation with TGF- $\beta$ 1 for 2 hours. LY2109761 reversed the stimulatory effect of TGF- $\beta$ 1 on PFKFB3 protein levels in T98G cells, and also the phosphorylation of Hsp25 and S6, which are downstream substrates of p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways, respectively. The inhibitory activity of LY2109761 was confirmed by the lack of Smad2 and Smad3 phosphorylation after TGF- $\beta$ 1 treatment (Fig. 8C). Additionally, the use of this inhibitor abrogated the induction of PFKFB3, GLUT1, HK-II and LDH-A gene expression (data not shown).

To gain insight into the role of p38 MAPK and Akt as mediators of PFKFB3 response to TGF- $\beta$ 1 cells, we pre-treated T98G cells with specific inhibitors of p38 MAPK and PI3K, SB203580 and LY294002 respectively, 30 minutes before TGF- $\beta$ 1 treatment. Western blot and qRT-PCR analysis showed that inhibition of p38 or PI3K activity significantly reduced PFKFB3 protein and mRNA levels after 2 hours of TGF- $\beta$ 1 treatment (Fig. 8D-F). The effectiveness of the SB203580 and LY294002 inhibitors was additionally tested in western blot experiments assessing the phosphorylation of Hsp25 and S6, respectively (Fig. 8D). Furthermore, inhibition of the p38 MAPK signaling pathway reduced S6 phosphorylation, due to Akt phosphorylation being blocked (Fig. 8D) and also reduced Smad2 phosphorylation, but not Smad3, after TGF- $\beta$ 1 treatment (Fig. 8D-E).



Moreover, we analysed Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration in T98G cells under these conditions. Inhibition of p38 MAPK and PI3K significantly reduced the increase in Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration after TGF-β1 treatment (Fig. 8G).

All these findings demonstrate that the p38 MAPK and Akt signaling pathways participate in PFKFB3 regulation by TGF-β1 and, consequently, they affect the synthesis of Fru-2,6-P<sub>2</sub> in response to this stimulus.

In the light of these results, we analysed the effects of inhibiting Smad3 together with the p38 MAPK and PI3K/Akt pathways. We found that the **induction in** PFKFB3 protein and mRNA expression and the increase in Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration after TGF-β1 treatment was completely abrogated when Smad3, p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways were inhibited at the same time (Fig. 9). Taken together, these results clearly show that the highest induction of PFKFB3 expression in T98G cells by TGF-β1 requires activation of Smad, p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways.

### **PFKFB3 mediates TGF-β1 colony formation in T98G**

We further assessed the effect of TGF-β1 on the capacity of T98G cells to generate colonies by performing a cell colony formation assay. Cells previously treated with TGF-β1 for 2 hours generated a higher number of colonies than untreated cells (Fig. 10A-B). With the aim of determining the role of PFKFB3 in colony formation, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO), a competitive inhibitor of PFKFB3,

that binds to its substrate binding site [39], or siRNA against PFKFB3 were used. The results clearly showed that both 3PO and siRNA targeting PFKFB3 inhibited the TGF- $\beta$ 1-dependent increase in colony formation (Fig. 10A-B). The effectiveness of pharmacological inhibition of PFKFB3 by 3PO was tested by measuring Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration, which was significantly decreased compared to TGF- $\beta$ 1 treatment alone (Fig. 10C). Western blot analysis showed that siRNA transfection effectively suppressed PFKFB3 protein levels by 52% (Fig. 10D-E) and significantly decreased Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration in response to TGF- $\beta$ 1 (Fig. 10C). Thereby, these results highlight the fact that decreased Fru-2,6-P<sub>2</sub> levels impair the oncogenic potential of glioblastoma cells.

## DISCUSSION

TGF- $\beta$ 1 plays a dual role in cancer, acting as a tumor suppressor in normal epithelial cells and early-stage tumors, and becoming an oncogenic factor in advanced tumors, inducing proliferation, angiogenesis, invasion, immunosuppression and metastasis [1,5,8]. Malignant glioma cells are known to be resilient to anaerobic conditions generated by a hypoxic microenvironment, due to their potential to increase glycolysis and thereby production of lactic acid [40]. TGF- $\beta$ 1 enhances glycolysis, amino acid uptake and lactate production in ras- and myc-transformed cell cultures [13]. TGF- $\beta$ 1 contributes to the metabolic reprogramming of both cancer cells and tumor-associated stromal cells [14–20]. Neoplastic cells require higher glucose metabolism in order to satisfy the increased energetic and anabolic needs of the transformed state. Moreover, most tumors are exposed to hypoxic conditions due to the abnormal vasculature. A key factor in controlling the glycolytic rate is Fru-2,6-

P<sub>2</sub>. In tumoral cells, Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration is mainly controlled by PFKFB3 which, in turn, is activated by mitogenic, inflammatory, hypoxic and stress stimuli [25,27,35,38,41]. PFKFB3 is overexpressed in tumors and its upregulation has been defined as a hallmark of high-grade astrocytoma, including glioblastoma multiforme [34].

Our data demonstrate that TGF-β1 increases the expression of genes encoding key enzymes of the glycolytic pathway, including PFKFB3, rising glucose uptake, Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration, lactate production, and enhancing the glycolytic flux in the glioblastoma cell line T98G (Fig. 1-3). Additionally, similar results have been obtained in the malignant glioma cell line U87-MG (Fig. 4). The upregulation of PFKFB3 by TGF-β1 takes place at a transcriptional level and it does not require *de novo* protein synthesis (Fig. 5).

A dual mechanism regulating PFKFB3 activity has been reported for other stimuli. Firstly, an immediate response that leads to PFKFB3 phosphorylation at its S461 and, secondly, activation of PFKFB3 mRNA transcription by *cis*-acting sequences in the PFKFB3 promoter [35,38]. In this study, an increase in PFKFB3 phosphorylation was observed in response to TGF-β1. However, it occurred after a long time and in parallel to the increase of total PFKFB3 levels (Fig. 3C).

The results obtained here show that TGF- $\beta$ 1 activates the Smad pathway (Fig. 6), which is in agreement with previous studies that detected functional Smad signaling in glioblastoma [11,42,43]. The overexpression, siRNA-mediated knockdown experiments and pharmacological inhibition of Smad indicate that PFKFB3 regulation in response to TGF- $\beta$ 1 is dependent, at least in part, on the Smad signaling pathway (Fig. 6-7). Furthermore, TGF- $\beta$ 1 activates the PI3K/Akt and p38 MAPK pathways. We found that inhibition of the PI3K signaling pathway with the specific inhibitor LY294002 reduces TGF- $\beta$ 1-induced PFKFB3 protein and mRNA expression. Meanwhile, inhibition of p38 MAPK with the specific inhibitor SB203580 also reduces TGF- $\beta$ 1-induced PFKFB3 protein and mRNA expression, possibly due to a decrease in Smad2 and Akt phosphorylation, which is in agreement with the published results [42,44]. Results obtained after T $\beta$ RI inhibition using LY2109761 indicate that T $\beta$ RI kinase activity is required not only for the activation of Smad proteins, but also for the activation of non-canonical pathways driven by p38 MAPK and Akt in T98G cells (Fig. 8). Consequently, PFKFB3 mRNA and protein expression induction is abrogated.

Previous studies reported the relationship between MAPK members and TGF- $\beta$ 1 signaling pathways in a cell-type and context-dependent manner [45–48]. It has been shown that p38 MAPK modulates Smad activation in human prostate cells [45] and also Smad4 is capable of interacting with a variety of transcription factors, including ATF-2, which is a downstream substrate of p38 MAPK [49]. An additional report showed that both p38 MAPK and Smad signaling independently regulate the  $\alpha$ 1(I)collagen gene in hepatic stellate cells in response to TGF- $\beta$ 1 [47]. Moreover, p38 MAPK has been shown to activate PI3K/Akt in vascular smooth muscle cells [44], fibroblasts [50] and cardiomyocytes [51].

The increase in PFKFB3 protein and mRNA expression together with Fru-2,6-P<sub>2</sub> production are significantly reduced to basal levels when the Smad3, p38 MAPK and PI3K signaling pathways are inhibited at the same time (Fig. 9) indicating that the activation of all these three signaling pathways are required for the maximal transcriptional activation of PFKFB3 expression (Fig. 10D). The p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways modulated by TGF-β1 may stimulate activation of transcription factors, which would cooperate with the Smad2/3/4 complex.

Previous results have shown that treatment of T98G cells with TGF-β1 does not affect cell growth or survival. This has been demonstrated by crystal violet viability assay, incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine and morphological examination [42] and cell viability by MTT assay [43]. However, it has been shown that TGF-β1 stimulates cell migration and invasion [43]. Our results show that TGF-β1 promotes the capacity of the T98G cell line to form colonies, which is one of the hallmarks of cellular transformation. Pharmacological inhibition of PFKFB3 activity with 3PO [39] or siRNA-mediated knockdown of PFKFB3 significantly eliminated this capacity (Fig. 10A-B), abrogating the increase in the number of colonies after TGF-β1 treatment.

A recent report has also identified PFKFB3 as a key TGF-β1 effector protein in the pancreatic adenocarcinoma cell line Panc1 and demonstrates that siRNA-mediated knockdown of PFKFB3 prevents the increase in Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration, lactate production and glucose consumption, obtained in response to TGF-β1, decreasing glycolysis stimulation in this cell line [52].

Our results show that selective inhibition of PFKFB3 with either siRNA transfection or 3PO in T98G cells prevents the increase in Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration by TGF-β1. PFKFB3 inhibition by 3PO or PFKFB3 gene silencing has been found to suppress glycolytic flux to lactate, decrease glucose uptake and attenuate the proliferation of several human cancer cell lines in vitro, including MDA-MB-231, K-562, HL-60, Jurkat, HeLa, A2058 and HCT-116 cells [33,39,54].

Taking into account the widely described stimulatory effect of Fru-2,6-P<sub>2</sub> on glycolysis, our study provides evidence of PFKFB3 involvement in glycolysis upregulation in response to TGF-β1 in T98G cells, which is mediated by Smad, p38 MAPk and PI3K/Akt signaling pathways.

In summary, the results here presented strongly suggest that TGF-β1, which is increased in many cancer microenvironments, represents a new paradigm in cancer metabolic reprogramming. Our study supports the notion that PFKFB3 expression induced by TGF-β1 can be one of the main mechanisms involved in the reprogramming of glioma cells and, consequently, in the glycolytic activation observed in glioblastoma. PFKFB3 plays an important role in the connection between glycolysis, cell proliferation and transformation. This isoenzyme is one of the key metabolic effectors that facilitates the adaptation, survival and proliferation of tumor cells to their hypoxic microenvironment. For instance, it has been demonstrated that the loss of the glycolytic activator PFKFB3 in endothelial cells impairs vessel formation and tumor growth [55]. Suppression of this isoenzyme may be an effective alternative to traditional cancer therapies and, accordingly, the

inhibition of PFKFB3 expression could be one of the targets for such an approach in glioblastoma multiforme.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents**

Human recombinant TGF- $\beta$ 1 was obtained from R&D Systems. The transcription inhibitor actinomycin D (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used at 5  $\mu$ g/ml and the protein synthesis inhibitor cycloheximide (Sigma-Aldrich) was used at 20  $\mu$ g/ml. The T $\beta$ RI inhibitor LY2109761 (Lilly and Co, Indianapolis, IN, USA) was used at 2  $\mu$ M. The inhibitors of p38 MAPK and PI3K, SB203580 and LY294002, respectively (Calbiochem, San Diego, CA, USA) were used at 10  $\mu$ M. The Smad3 inhibitor SIS3 (Calbiochem) was used at 20  $\mu$ M. The PFKFB3 inhibitor 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO) (Calbiochem) was used at 10  $\mu$ M. D-[5- $^3$ H]-glucose,  $^3$ H $_2$ O and 2-deoxy-D-[1,2- $^3$ H]-glucose were purchased from American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO) and 2-deoxy-D-glucose was purchased from Sigma-Aldrich.

### **Cell lines and culture conditions**

Human glioblastoma cells, T98G and U87MG, obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), were cultured in high glucose DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) supplemented with 10% FBS (foetal bovine serum; Biological Industries), penicillin/streptomycin (100 U/ml and 100  $\mu$ g/ml respectively) and L-glutamine (2 mM; Biological industries), in a humidified atmosphere of 5% CO $_2$  at 37°C. Cells were cultured in 6-well plates at different confluences: 90%-100% for time-course

and inhibitor experiments, 20% for siRNA transfection experiments and 50% for plasmid transfection experiments. 24 hours before TGF- $\beta$ 1 treatment, the cells were starved for 24 hours by incubation with serum-free medium.

### **Western blot analysis**

Total cellular protein was obtained by washing cells twice in PBS and lysing with SDS buffer containing 50 mM Tris-Cl, 1% SDS and 10% glycerol. The cells were scraped and extracts heated at 95°C for 10 min. Protein content was determined by BCA assay, as described in the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), using albumin as a standard. Protein extracts were resolved on 10% (w/v) SDS/PAGE under reducing conditions and then transferred on to nitrocellulose membranes (Merk, Darmstadt, Germany). Rabbit polyclonal antibody, recognizing the C-terminus of PFKFB3, was obtained as described in Riera *et al.*

[25]. Rabbit polyclonal phospho-Ser461-PFKFB3 antibody was obtained as described in Novellasdemunt *et al.* [35]. For Smad protein immunodetection the following antibodies were used: Smad2/3 monoclonal antibody recognizing both proteins from BD Biosciences (San Jose, CA, USA), phospho-Ser465/467-Smad2 from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) phospho-Ser423/425-Smad3 from Merck and serum containing Smad4 polyclonal antibody. Several pathways were analysed using: phospho-Thr202/Tyr204-Erk1/2 MAPK, phospho-Thr180/Tyr182-p38 MAPK, phospho-Ser473-Akt and phospho-Ser235/236-S6 from Cell Signaling Technology, phospho-Ser86-Hsp25 from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and phospho-Thr183/185-JNK from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany).  $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody from Sigma-Aldrich was used as a protein normalization control. Immunocomplexes were then visualized using horseradish



peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse IgG antibody from Advansta (Menlo Park, CA, USA) followed by incubation with ECL (enhanced chemiluminescent) Western blot reagent (Biological Industries) and detection with a LAS-3000 system (FujiFilm Corporation). Densitometric analysis was performed using Multi-Gauge v3.0 (FujiFilm Corporation, 2007) software.

### **Fru-2,6-P<sub>2</sub> determination**

Extracts were obtained by washing cells twice in ice-cold PBS and lysed with 100 mM NaOH plus 0.1% Triton X-100 and centrifuged at 14000 rpm for 10 min at 4°C. Fru-2,6-P<sub>2</sub> was determined following the method described by Van Schaftingen *et al.* [22]. Protein concentration was determined as described by the Bradford-based Bio-Rad Laboratories Assay.

### **Glucose uptake, glycolytic flux and lactate measurements**

To quantify glucose uptake the accumulation of 2-deoxy-D-Glucose was measured using radioactive 2-deoxy-D-[1,2-<sup>3</sup>H]-glucose. Briefly, cells were cultured in 24-well plates and treated with TGF-β1 for 2 hours. Then, cells were washed four times with warm PBS at 37°C and incubated with 1 μCi of 2-deoxy-D-[1,2-<sup>3</sup>H]-glucose in PBS containing 10 μM of 2-deoxy-D-glucose for 5 minutes. The reaction was stopped by four washes with cold PBS. Then, 200 μl of 0.4 M NaOH was added to each well to lyse the cells. Cell lysates were transferred into a scintillation vial containing 10 ml of liquid scintillation counter, and the radioactivity was quantified using a scintillation counter. Counts were normalized to protein concentration.

Glycolytic flux was determined by measuring the conversion of D-[5-<sup>3</sup>H]-glucose to <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O [56]. Briefly, cells were cultured in 24-well plates and, 30 minutes before the end of the treatment with TGF-β1 (2 hours), cells were incubated in 200 μl of serum-deprived medium containing 1 μCi of D-[5-<sup>3</sup>H]-glucose for 30 minutes at 37 °C. After incubation, 50 μl of medium aliquots were transferred to uncapped PCR tubes containing 50 μl of 0.2 M HCl, and each tube was placed inside a scintillation vial containing 0.5 ml of water. The vials were sealed and the <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O produced by glycolysis and released to the medium was allowed to equilibrate with H<sub>2</sub>O in the outer vial for 24 hours at 50 °C. Then, each tube was removed from the vial and 10 ml of liquid scintillation counter was added to the vial. The amount of diffused and undiffused <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O was determined by scintillation counting and compared with controls of D-[5-<sup>3</sup>H]-glucose and <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O alone. Counts were normalized to protein concentration.

Lactate was measured spectrophotometrically in 700 μl of supernatants from cells with the corresponding treatment using standard enzymatic methods [57].

#### **RNA extraction and real-time PCR (qRT-PCR)**

TRIsure (Bioline, London, UK) reagent was used to extract total cellular RNA from confluent cells according to the manufacturer's protocol. The concentration and purity of all RNA samples was determined using NanoDrop (Thermo Scientific). 2 μg of RNA was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with random primers. The human Taqman probes used for the qRT-PCR were: PFKFB1 (Hs00159997\_m1), PFKFB2 (Hs00359506\_g1), PFKFB3 (Hs00190079\_m1),

PFKFB4 (Hs00190096\_m1), GLUT1 (SLC2A1 Hs00892681\_m1), HK-II (Hs00606086\_m1), LDH-A (Hs01378790\_g1), and GAPDH, as a housekeeping control gene, (Hs99999905\_m1) from Applied Biosystems. PCR data were captured using a 7900 HT Fast Real-Time System from Applied Biosystems and the Sequence Detection Software (SDS version 3.0 Applied Biosystems). Subsequently, threshold cycle (CT) data for each sample were analysed with the double data CT ( $\Delta\Delta CT$ ). First, delta CT ( $\Delta CT$ ) values were calculated as the normalized CT values for each target gene in relation to the endogenous control GAPDH for normalization. Second,  $\Delta\Delta CT$  values were obtained with the  $\Delta CT$  of each sample minus the mean  $\Delta CT$  of the population control samples. The fold-change was determined using the equation 2

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

### **Small Interfering RNA (siRNA) transfection**

siRNA transfection was performed with Oligofectamine (Invitrogen) following the manufacture's protocol. The siRNAs used were: siRNA mix targeting sequences in Smad2 and Smad3 (target sequences not supplied) purchased from Santa Cruz Biotechnology (siRNA Smad2/3), siRNA targeting four different sequences of Smad4 (GCAAUUGAAAGUUUGGUA, CCCACAACCUUUAGACUGA, GAAUCCAUAUCACUACGAA and GUACAGAGUUACUACUUAG) purchased from Dharmacon (Lafayette, CO, USA), siRNA targeting PFKFB3 was designed and synthesized as described [33] and non-targeting control siRNA (scramble: Stealth Negative Control Medium GC Duplex) from Invitrogen. The final siRNA concentration was 75 nM and cells were maintained for 72 hours before the treatment.

### **DNA transfection**

Cells were transiently transfected with 2 µg of DNA using Lipofectamine LTX (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The expression plasmids used were myc-Smad3 and Flag-Smad4 pCS2. GFP-pcDNA3 was used as a transfection control. Cells were cultured for 24 hours in serum-depleted medium after 24 hours of transfection.

### **Colony-forming assay**

T98G cells were seeded in 12-well plates with 500 cells/well and were allowed to grow in medium containing 10% FBS in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 14 days. After that, colonies were stained and fixed in 0.2% crystal violet (containing 2% ethanol) for 30 minutes and then washed with distilled water. Colonies consisting of ≥ 50 cells were counted as a single colony.

### **Data analysis**

Results are shown as the mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of the values obtained from at least three independent experiments. Differences between conditions were analysed by Student's *t* test. Significant differences are indicated as

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  for TGF-β1 stimulated cells compared to untreated cells; and #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  and ###  $p < 0.001$  for TGF-β1 plus inhibitor-treated cells compared to TGF-β1-treated cells.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank E. Adanero, for technical assistance, Dr F. Viñals for providing material for Smad signaling pathway analysis and Dr J. Massagué for providing expression plasmids. AR was the recipient of a fellowship from the University of Barcelona. PS was supported by a grant from the Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III – Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI13/0096) and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

RB and AN conceived and designed the experiments; PF, PS, HS, AM and AR performed the experiments and analysed the data; AM, HS, PF, PS, EC, JR, UM and FV critically commented on and revised the work; and RB, AN and AR wrote the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Massagué J (2008) TGF $\beta$  in Cancer. *Cell* **134**, 215–230.
- 2 Zhang YE (2017) Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a022129.
- 3 Derynck R & Akhurst RJ (2007) Differentiation plasticity regulated by TGF- $\beta$  family proteins in development and disease. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1000–1004.

- 4 Ikushima H & Miyazono K (2010) Cellular context-dependent “colors” of transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Cancer Sci.* **101**, 306–312.
- 5 Chapnick DA, Warner L, Bernet J, Rao T & Liu X (2011) Partners in crime: the TGF $\beta$  and MAPK pathways in cancer progression. *Cell Biosci.* **1**, 42.
- 6 Moustakas A & Heldin C-H (2005) Non-Smad TGF- $\beta$  signals. *J. Cell Sci.* **118**, 3573–3584.
- 7 Massagué J (2012) TGF $\beta$  signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**.
- 8 Fabregat I, Fernando J, Mainez J & Sancho P (2014) TGF-beta signaling in cancer treatment. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 2934–47.
- 9 Jachimczak P, Hessdörfer B, Fabel-Schulte K, Wismeth C, Brysch W, Schlingensiepen KH, Bauer A, Blesch A & Bogdahn U (1996) Transforming growth factor-beta-mediated autocrine growth regulation of gliomas as detected with phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Int. J. cancer* **65**, 332–7.
- 10 Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I, Salford LG, Sjögren HO & Widegren B (2000) Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int. J. cancer* **89**, 251–8.
- 11 Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocaña A, Peñuelas S, Arias A, Paris R, Tortosa A, Mora J, Baselga J & Seoane J (2007) High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* **11**, 147–60.
- 12 Eichhorn PJA, Rodón L, González-Juncà A, Dirac A, Gili M, Martínez-Sáez E,

Aura C, Barba I, Peg V, Prat A, Cuartas I, Jimenez J, García-Dorado D, Sahuquillo J, Bernards R, Baselga J & Seoane J (2012) USP15 stabilizes TGF- $\beta$  receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF- $\beta$  signaling in glioblastoma. *Nat. Med.* **18**, 429–435.

13 Racker E, Resnick RJ & Feldman R (1985) Glycolysis and methylaminoisobutyrate uptake in rat-1 cells transfected with ras or myc oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 3535–8.

14 Nigdelioglu R, Hamanaka RB, Meliton AY, O’Leary E, Witt LJ, Cho T, Sun K, Bonham C, Wu D, Woods PS, Husain AN, Wolfgeher D, Dulin NO, Chandel NS & Mutlu GM (2016) Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  Promotes de Novo Serine Synthesis for Collagen Production. *J. Biol. Chem.* **291**, 27239–27251.

15 Jiang L, Deberardinis R & Boothman DA (2015) The cancer cell “energy grid”: TGF- $\beta$ 1 signaling coordinates metabolism for migration. *Mol. Cell. Oncol.* **2**, e981994.

16 Arrick BA, Lopez AR, Elfman F, Ebner R, Damsky CH & Derynck R (1992) Altered metabolic and adhesive properties and increased tumorigenesis associated with increased expression of transforming growth factor beta 1. *J. Cell Biol.* **118**, 715–26.

17 Zhang D, Wang Y, Shi Z, Liu J, Sun P, Hou X, Zhang J, Zhao S, Zhou BP & Mi J (2015) Metabolic Reprogramming of Cancer-Associated Fibroblasts by IDH3 $\alpha$  Downregulation. *Cell Rep.* **10**, 1335–1348.

18 Zhang J, Tian X-J, Zhang H, Teng Y, Li R, Bai F, Elankumaran S & Xing J (2014) TGF- $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise

activation of multiple feedback loops. *Sci. Signal.* **7**, ra91-ra91.

- 19 Young VJ, Brown JK, Maybin J, Saunders PTK, Duncan WC & Horne AW (2014) Transforming Growth Factor- $\beta$  Induced Warburg-Like Metabolic Reprogramming May Underpin the Development of Peritoneal Endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 3450–3459.
- 20 Guido C, Whitaker-Menezes D, Capparelli C, Balliet R, Lin Z, Pestell RG, Howell A, Aquila S, Andò S, Martinez-Outschoorn U, Sotgia F & Lisanti MP (2012) Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- $\beta$  drives tumor growth: Connecting TGF- $\beta$  signaling with “Warburg-like” cancer metabolism and L-lactate production. *Cell Cycle* **11**, 3019–3035.
- 21 Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–14.
- 22 Van Schaftingen E (1987) Fructose 2,6-bisphosphate. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **59**, 315–95.
- 23 Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG & Hue L (2004) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem. J.* **381**, 561–579.
- 24 Chesney J, Mitchell R, Benigni F, Bacher M, Spiegel L, Al-Abed Y, Han JH, Metz C & Bucala R (1999) An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3047–52.
- 25 Riera L, Manzano A, Navarro-Sabaté A, Perales JC & Bartrons R (2002) Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1589**, 89–92.



- 26 Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R & Koike T (2005) Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5784–92.
- 27 Obach M, Navarro-Sabate A, Caro J, Kong X, Duran J, Gomez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL & Bartrons R (2004) 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**, 53562–53570.
- 28 Minchenko OH, Ochiai A, Opentanova IL, Ogura T, Minchenko DO, Caro J, Komisarenko SV & Esumi H (2005) Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie* **87**, 1005–1010.
- 29 Sakakibara R, Uemura M, Hirata T, Okamura N & Kato M (1997) Human placental fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: its isozymic form, expression and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1949–52.
- 30 Manzano A, Rosa JL, Ventura F, Pérez JX, Nadal M, Estivill X, Ambrosio S, Gil J & Bartrons R (1998) Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase gene (PFKFB3). *Cytogenet. Cell Genet.* **83**, 214–7.
- 31 Duran J, Gómez M, Navarro-Sabate A, Riera-Sans L, Obach M, Manzano A, Perales JC & Bartrons R (2008) Characterization of a new liver- and kidney-

specific pfkfb3 isozyme that is downregulated by cell proliferation and dedifferentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 748–54.

- 32 Yalcin A, Telang S, Clem B & Chesney J (2009) Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp. Mol. Pathol.* **86**, 174–179.
- 33 Calvo MN, Bartrons R, Castaño E, Perales JC, Navarro-Sabaté A & Manzano A (2006) PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett.* **580**, 3308–14.
- 34 Kessler R, Bleichert F, Warnke J-P & Eschrich K (2008) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. *J. Neurooncol.* **86**, 257–64.
- 35 Novellademunt L, Obach M, Millán-Ariño L, Manzano A, Ventura F, Rosa JL, Jordan A, Navarro-Sabate À & Bartrons R (2012) Progestins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) in breast cancer cells. *Biochem. J.* **442**, 345–356.
- 36 Ando M, Uehara I, Kogure K, Asano Y, Nakajima W, Abe Y, Kawauchi K & Tanaka N (2010) Interleukin 6 enhances glycolysis through expression of the glycolytic enzymes hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3. *J. Nippon Med. Sch.* **77**, 97–105.
- 37 Ruiz-Garcia A, Monsalve E, Novellademunt L, Navarro-Sabate A, Manzano A, Rivero S, Castrillo A, Casado M, Laborda J, Bartrons R & Diaz-Guerra MJM (2011) Cooperation of Adenosine with Macrophage Toll-4 Receptor Agonists

Leads to Increased Glycolytic Flux through the Enhanced Expression of PFKFB3 Gene. *J. Biol. Chem.* **286**, 19247–19258.

38 Novellademunt L, Bultot L, Manzano A, Ventura F, Rosa JL, Vertommen D, Rider MH, Navarro-Sabate À & Bartrons R (2013) PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli. *Biochem. J.* **452**, 531–543.

39 Clem B, Telang S, Clem A, Yalcin A, Meier J, Simmons A, Rasku MA, Arumugam S, Dean WL, Eaton J, Lane A, Trent JO & Chesney J (2008) Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 110–120.

40 Floridi A, Paggi MG & Fanciulli M Modulation of glycolysis in neuroepithelial tumors. *J. Neurosurg. Sci.* **33**, 55–64.

41 Novellademunt L, Tato I, Navarro-Sabate A, Ruiz-Meana M, Méndez-Lucas A, Perales JC, Garcia-Dorado D, Ventura F, Bartrons R & Rosa JL (2013) Akt-dependent activation of the heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids. *J. Biol. Chem.* **288**, 10640–51.

42 Dziembowska M, Danilkiewicz M, Wesolowska A, Zupanska A, Chouaib S & Kaminska B (2007) Cross-talk between Smad and p38 MAPK signalling in transforming growth factor  $\beta$  signal transduction in human glioblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 1101–1106.

43 Lu Y, Jiang F, Zheng X, Katakowski M, Buller B, To S-ST & Chopp M (2011) TGF- $\beta$ 1 promotes motility and invasiveness of glioma cells through activation of

ADAM17. *Oncol. Rep.* **25**, 1329–35.

- 44 Suwanabol PA, Seedial SM, Zhang F, Shi X, Si Y, Liu B & Kent KC (2012) TGF- $\beta$  and Smad3 modulate PI3K/Akt signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H2211-9.
- 45 Hayes SA, Huang X, Kambhampati S, Plataniias LC & Bergan RC (2003) p38 MAP kinase modulates Smad-dependent changes in human prostate cell adhesion. *Oncogene* **22**, 4841–50.
- 46 Yu L, Hébert MC & Zhang YE (2002) TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.* **21**, 3749– 3759.
- 47 Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N & Rippe RA (2005) SMAD and p38 MAPK Signaling Pathways Independently Regulate 1(I) Collagen Gene Expression in Unstimulated and Transforming Growth Factor- $\beta$ -stimulated Hepatic Stellate Cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 10055–10064.
- 48 Watanabe H, de Caestecker MP & Yamada Y (2001) Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 14466–73.
- 49 Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K & Nishida E (1999) Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 27161–7.
- 50 Horowitz JC, Lee DY, Waghray M, Keshamouni VG, Thomas PE, Zhang H, Cui Z

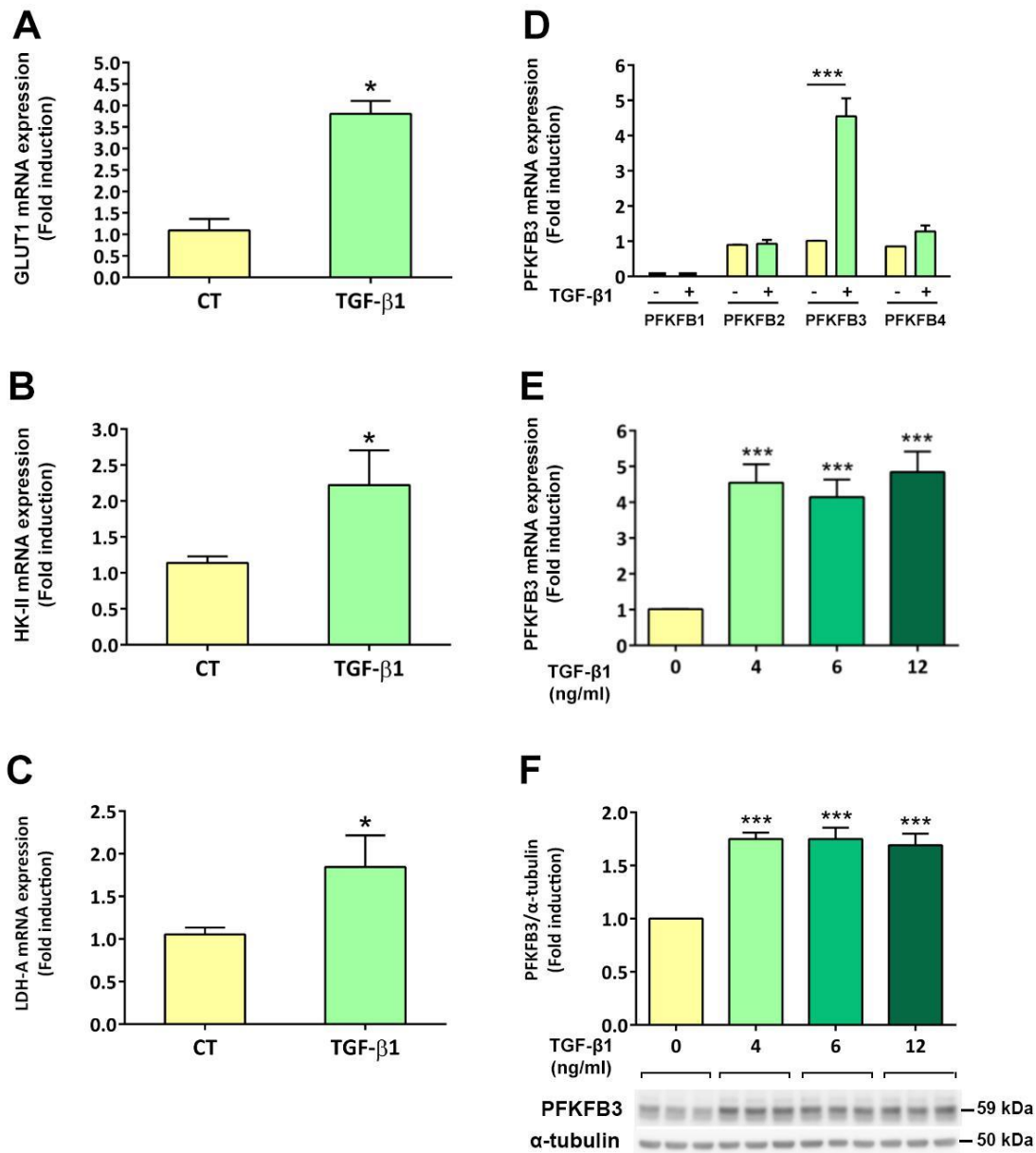
& Thannickal VJ (2004) Activation of the Pro-survival Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway by Transforming Growth Factor- 1 in Mesenchymal Cells Is Mediated by p38 MAPK-dependent Induction of an Autocrine Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 1359–1367.

- 51 Morissette MR, Cook SA, Foo S, McKoy G, Ashida N, Novikov M, Scherrer-Crosbie M, Li L, Matsui T, Brooks G & Rosenzweig A (2006) Myostatin Regulates Cardiomyocyte Growth Through Modulation of Akt Signaling. *Circ. Res.* **99**, 15–24.
- 52 Yalcin A, Clem BF, Imbert-Fernandez Y, Ozcan SC, Peker S, O’Neal J, Klarer AC, Clem AL, Telang S & Chesney J (2014) 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis.* **5**, e1337.
- 53 Yalcin A, Solakoglu TH, Ozcan SC, Guzel S, Peker S, Celikler S, Balaban BD, Sevinc E, Gurpinar Y & Chesney JA (2017) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase-3 is required for transforming growth factor  $\beta$ 1-enhanced invasion of Panc1 cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **484**, 687–693.
- 54 Klarer AC, O’Neal J, Imbert-Fernandez Y, Clem A, Ellis SR, Clark J, Clem B, Chesney J & Telang S (2014) Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) induces autophagy as a survival mechanism. *Cancer Metab.* **2**, 2.
- 55 De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Eelen G, Phng L-K, Betz I, Tembuyser B, Brepoels K, Welti J, Geudens I, Segura I, Cruys B, Bifari F,

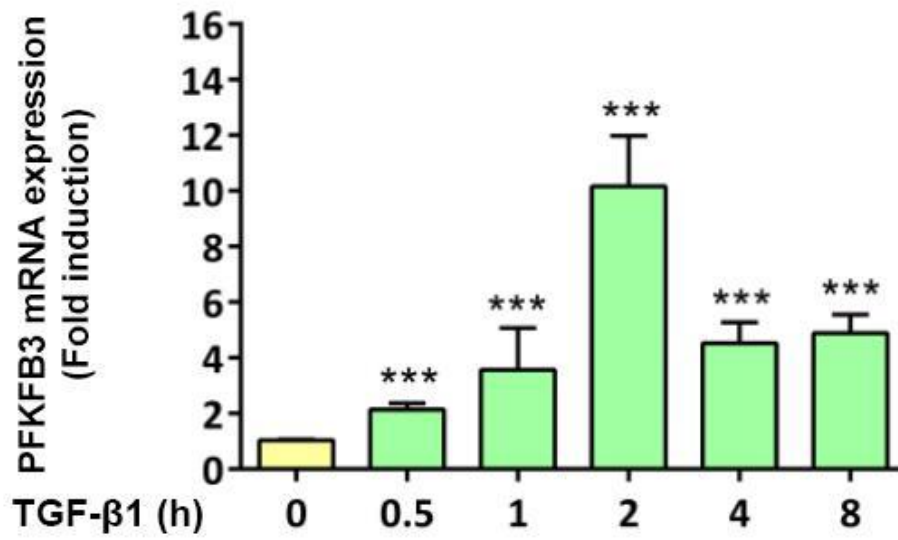
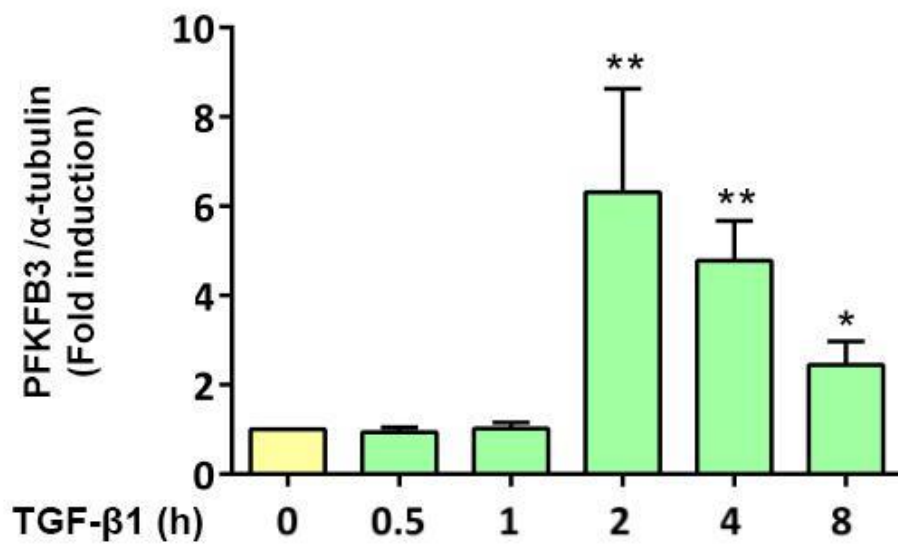
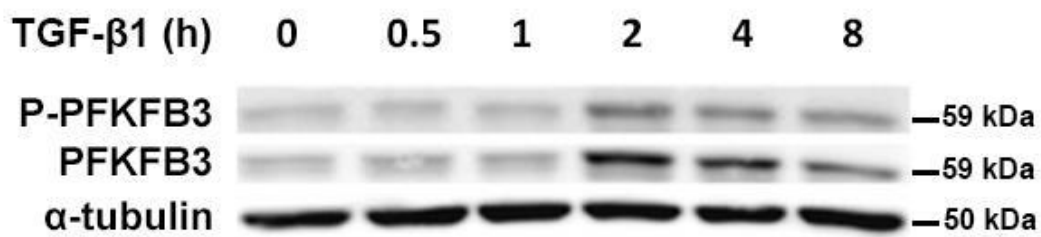
Decimo I, Blanco R, Wyns S, Vangindertael J, Rocha S, Collins RT, Munck S, Daelemans D, Imamura H, Devlieger R, Rider M, Van Veldhoven PP, Schuit F, Bartrons R, Hofkens J, Fraisl P, Telang S, DeBerardinis RJ, Schoonjans L, Vinckier S, Chesney J, Gerhardt H, Dewerchin M & Carmeliet P (2013) Role of PFKFB3-Driven Glycolysis in Vessel Sprouting. *Cell* **154**, 651–663.

56 TeSlaa T & Teitell MA (2014) Techniques to Monitor Glycolysis. In *Methods in enzymology* pp. 91–114.

57 Gutman I & Wahlenfeld AW. (1963) L-(+)-lactate. determination with LDH and NAD. *Methods Enzym. Anal.*, 1464–1467.



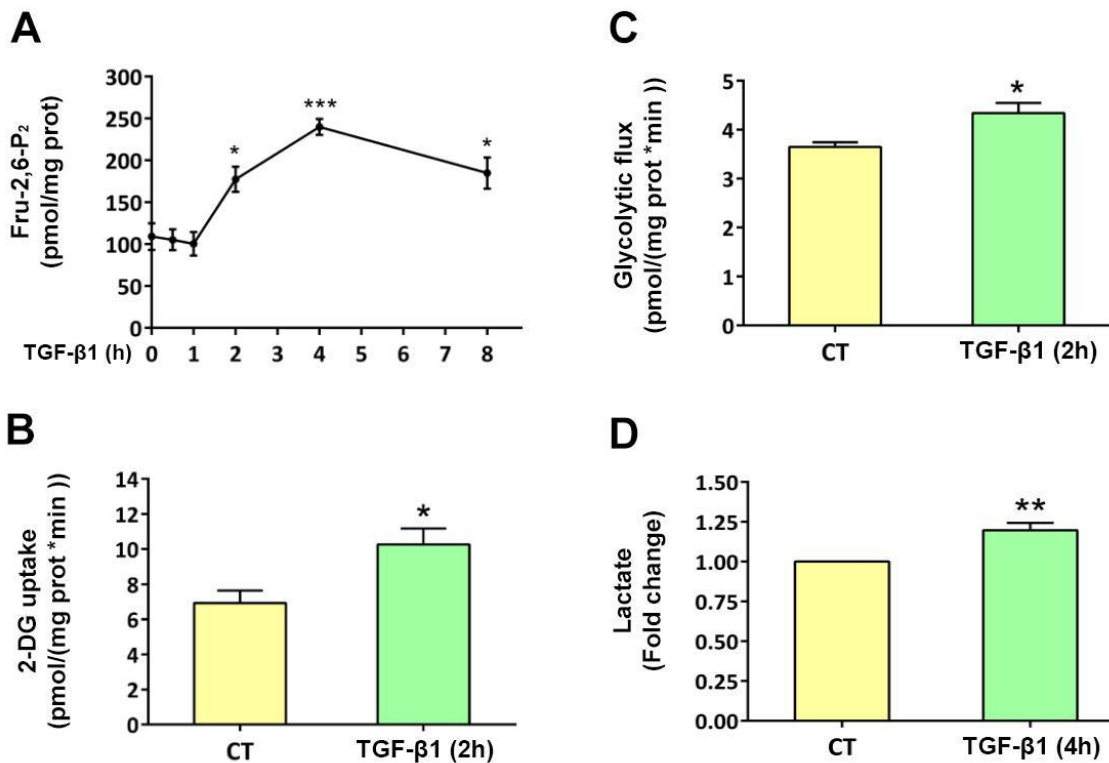
**Figure 1. TGF-β1 upregulates key glycolytic gene expression in T98G cells. A-D)** Serum-starved T98G cells treated with TGF-β1 (4 ng/ml) for 8h. qRT-PCR analysis of GLUT1, HK-II, LDH-A, PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 and PFKFB4 of four independent experiments. **E)** and **F)** Serum-starved T98G treated with different doses of TGF-β1 for 8h. **E)** qRT-PCR analysis of PFKFB3 of six independent experiments. **F)** Quantitative analysis of PFKFB3 protein levels (upper panel) and representative western blot showing the expression of PFKFB3 (lower panel) of six independent experiments. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. The data represent the average ± SEM for each condition (\* p<0.05 and \*\*\* p<0.001 determined by Student's *t* test).

**A****B****C**

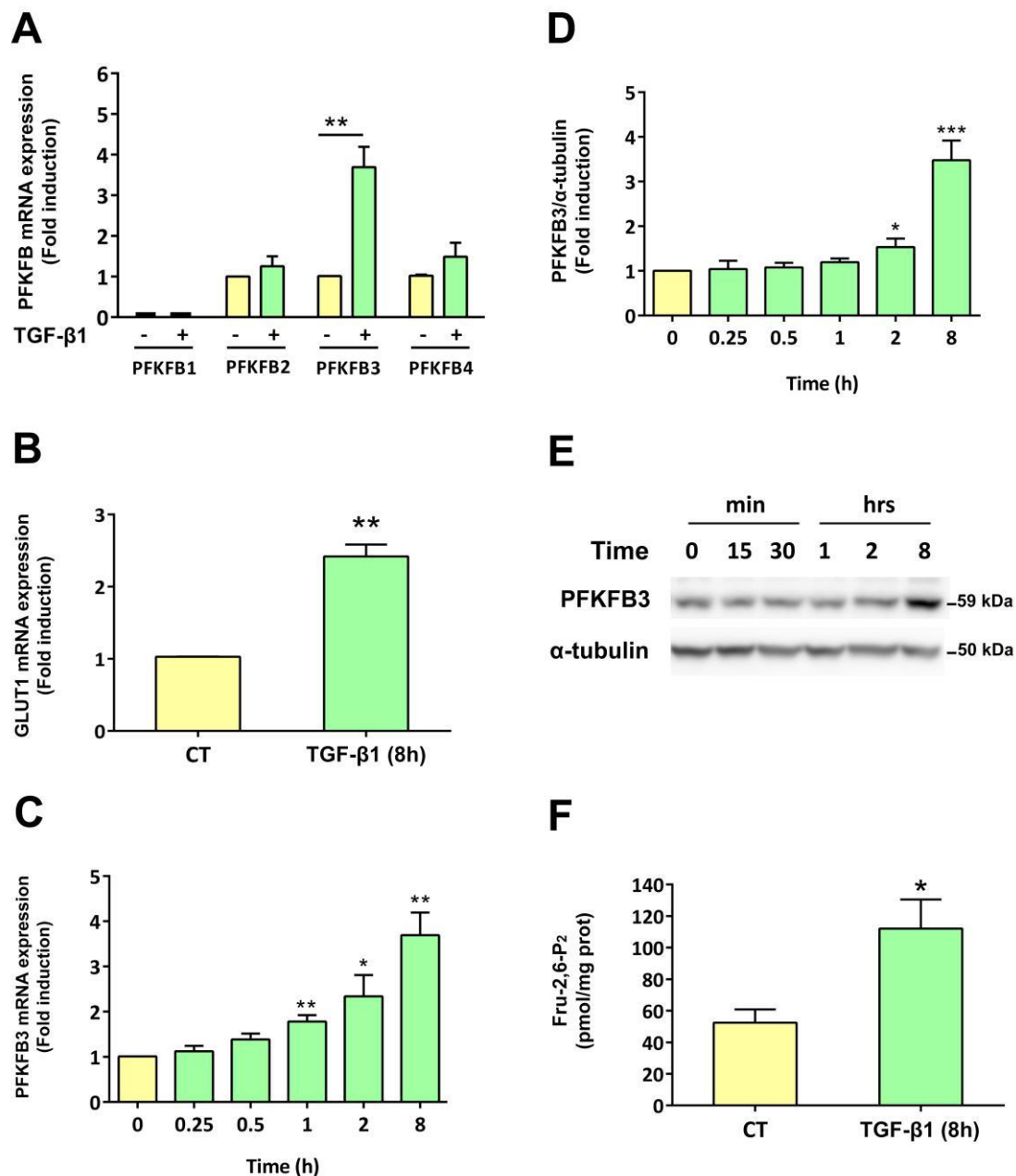


## Figure 2. Time-course analysis of PFKFB3 after TGF- $\beta$ 1 stimulation in T98G

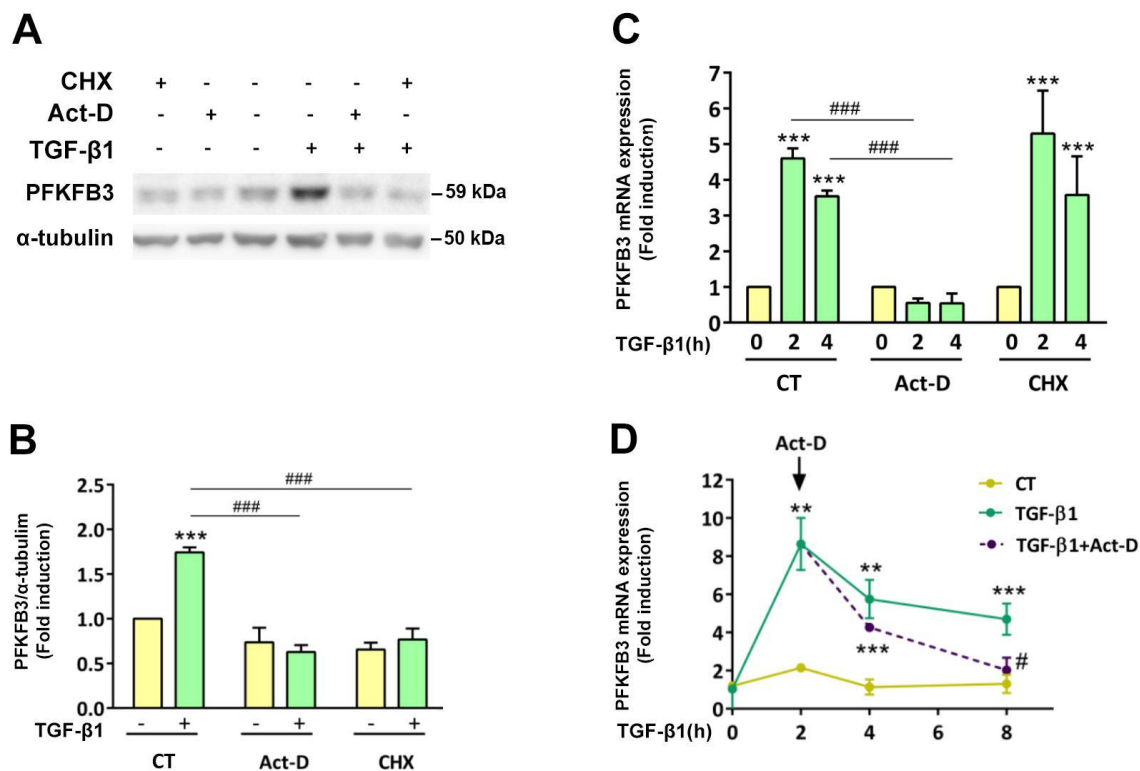
cells. Serum-starved T98G cells were treated with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) at different times. **A)** qRT-PCR analysis of PFKFB3. **B)** Quantitative analysis of PFKFB3 protein levels. **C)** Representative western blot showing PFKFB3 and Phospho-PFKFB3 protein levels of four independent experiments. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. The data represent the average  $\pm$  SEM for each condition (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  determined by Student's *t* test).



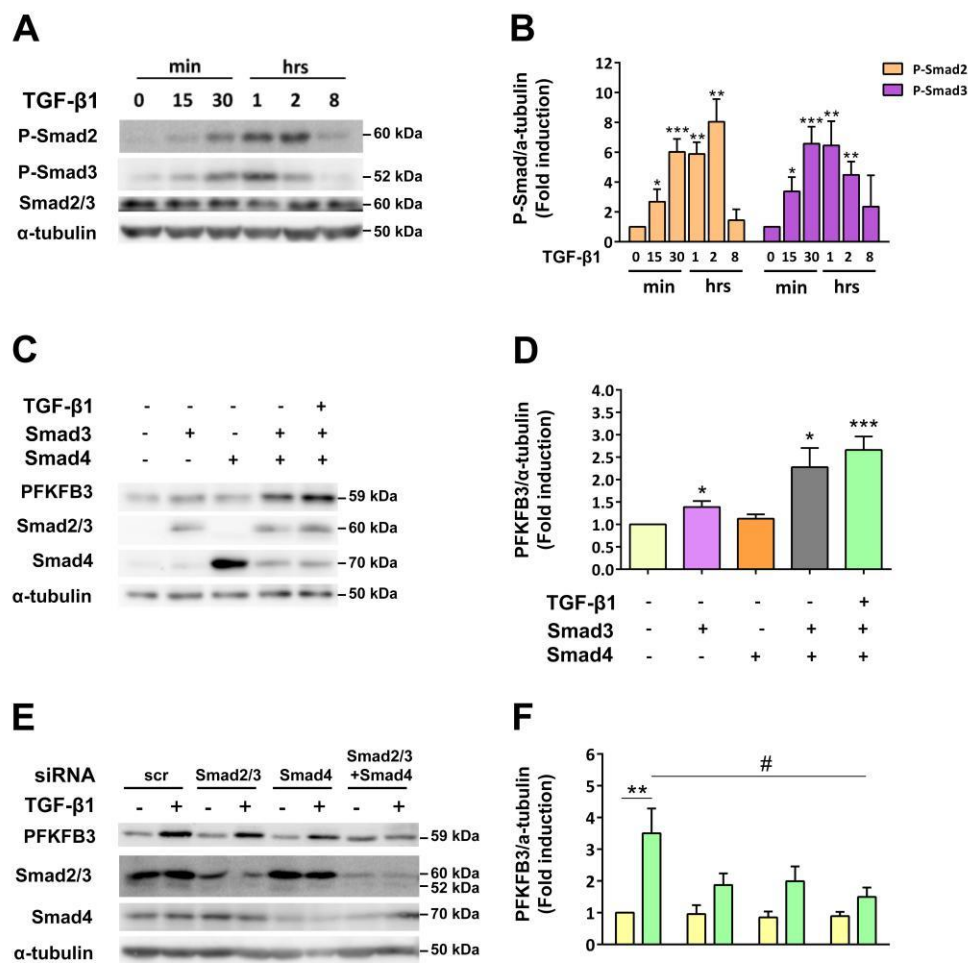
**Figure 3. TGF- $\beta$ 1 upregulates glycolysis in T98G cells.** Serum-starved T98G cells were treated with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) at the times indicated. **A)** Intracellular Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. **B)** 2-deoxy-D-Glucose (2-DG) uptake of three independent experiments. **C)** Glycolytic flux of three independent experiments. **D)** Lactate production of three independent experiments of four independent experiments. The data represent the average  $\pm$  SEM for each condition (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  determined by Student's *t* test).



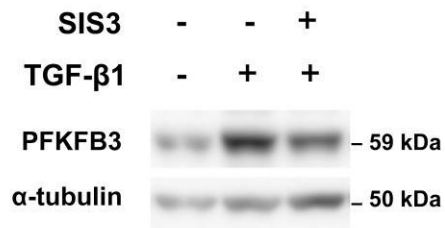
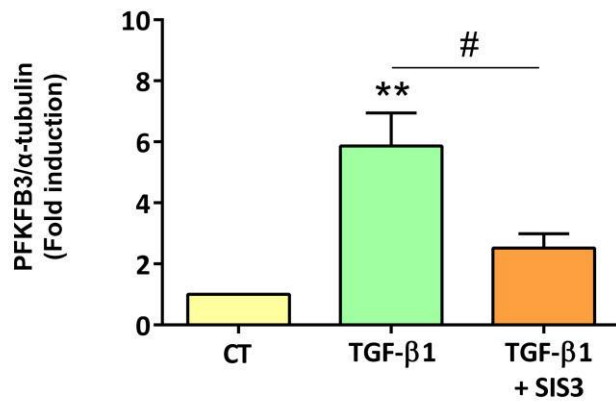
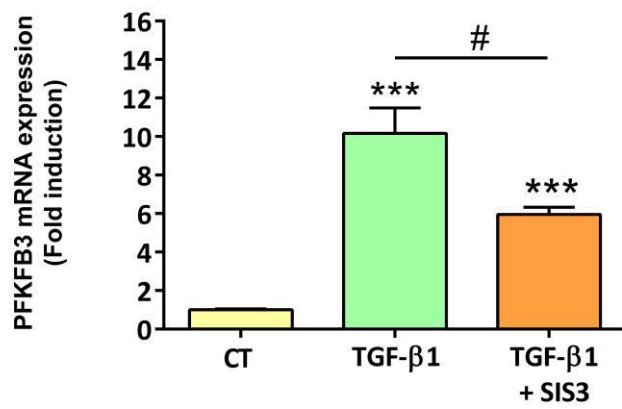
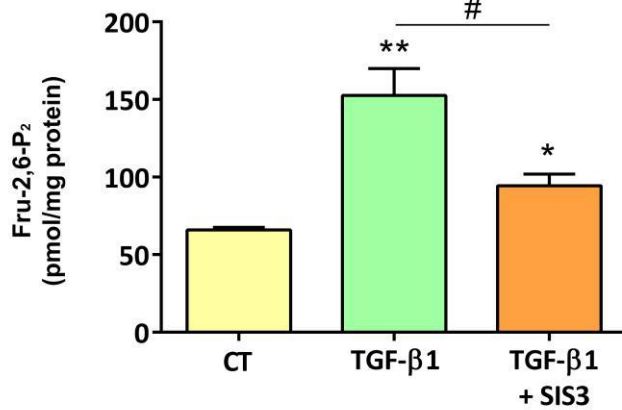
**Figure 4. TGF-β1 upregulates PFKFB3 expression and activity in the malignant glioma cell line U87MG.** Serum-starved U87MG cells treated with TGF-β1 (4 ng/ml) at the times indicated. **A)** qRT-PCR analysis of PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 and PFKFB4. **B)** qRT-PCR analysis of GLUT1. **C)** qRT-PCR analysis of PFKFB3. **D)** Quantitative analysis of PFKFB3 protein levels. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. **E)** Representative western blot showing the expression of PFKFB3. **F)** Intracellular Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration. The data represent the average of three independent experiments ± SEM for each condition (\* p<0.05, \*\*p<0.005 and \*\*\* p<0.001 determined by Student's t test).



**Figure 5. Effect of actinomycin D and cycloheximide treatment on PFKFB3 protein and mRNA increase in response to TGF-β1 in T98G cells. A) and B)** Serum-starved T98G cells with a 30 min pre-treatment of actinomycin D (5 μg/ml) or cycloheximide (20 μg/ml) and, when indicated, stimulated with TGF-β1 (4 ng/ml) for 2 h. **A)** Representative western blot showing the expression of PFKFB3. **B)** Quantitative analysis of PFKFB3 protein levels of four independent experiments. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. **C)** qRT-PCR analysis of PFKFB3 in serum-starved T98G cells with 30 min pre-treatment of actinomycin D (5 μg/ml) or cycloheximide (20 μg/ml) and, when indicated, stimulated with TGF-β1 (4 ng/ml) for 2 or 4 h, of four independent experiments. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells (time 0). **D)** qRT-PCR analysis of PFKFB3 in serum-starved T98G cells either untreated (yellow line) or treated with TGF-β1 (4 ng/ml) at different times (green line) and, when indicated, treated with actinomycin D (5 μg/ml) after 2 h of TGF-β1 stimulation (dashed line), of five independent experiments. The data represent the average ± SEM for each condition (\*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001 for conditions treated with TGF-β1 compared to the non-treated condition; # p<0.05 and ### p<0.001 for conditions treated with TGF-β1 with actinomycin D or cycloheximide compared to the TGF-β1 condition, determined by Student's *t* test).

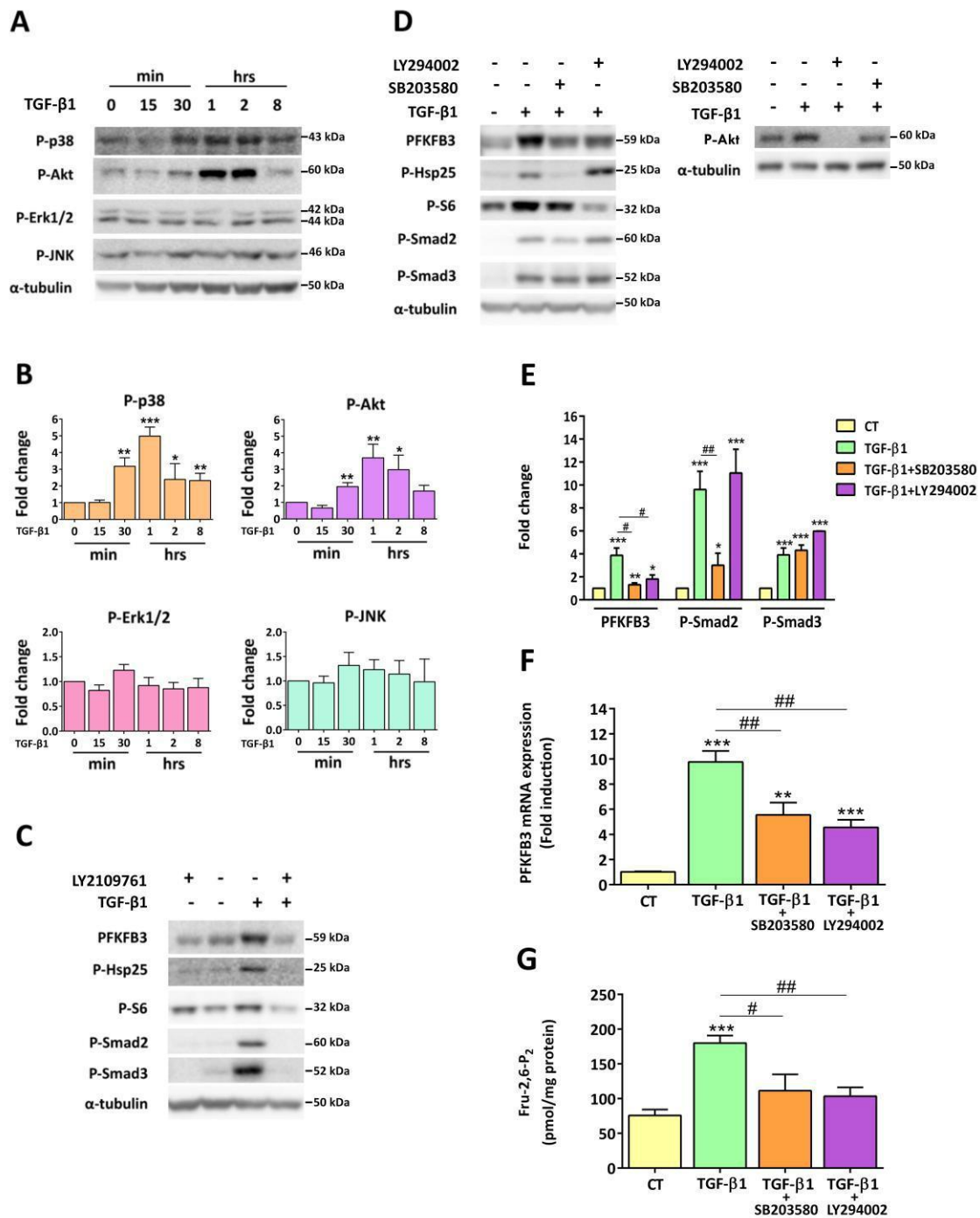


**Figure 6. Role of the Smad signaling pathway in PFKFB3 upregulation by TGF-β1 in T98G cells.** **A)** and **B)** Serum-starved T98G cells were treated with TGF-β1 (4 ng/ml) at different times. **A)** Representative western blot using the indicated antibodies. **B)** Quantitative analysis of Phospho-Smad2 and Phospho-Smad3 protein levels of five independent experiments. **C)** and **D)** T98G cells were transiently transfected with 2 μg of Smad3 and/or Smad4 expression vectors and cultured for 24 h in serum-deprived medium. When indicated, cells were treated with TGF-β1 (4 ng/ml) for 2 hours. GFP was used as a transfection control. **C)** Representative western blot using the indicated antibodies. **D)** Quantitative analysis of PFKFB3 protein levels of seven independent experiments. The values are expressed as the fold induction compared to the empty vector. **E)** and **F)** T98G cells were transfected with 75 nM siRNA, cultured for 48 hours in DMEM followed by 24 h culture in serum-deprived medium and treated with TGF-β1 (4 ng/ml) for 2 h. **E)** Representative western blot using the indicated antibodies. **F)** Quantitative analysis of PFKFB3 protein levels of five independent experiments. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. The data represents the average ± SEM for each condition (\* p<0.05, \*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001 for conditions treated with TGF-β1 compared to untreated cells and # p<0.05 for conditions treated with TGF-β1 in cells transfected with Smad siRNA compared to conditions treated with TGF-β1 in cells transfected with scramble siRNA (scr)).

**A****B****C****D**

**Figure 7. Effect of Smad3 inhibition on PFKFB3 upregulation by TGF- $\beta$ 1 in**

**T98G cells.** Serum-starved T98G cells were pre-treated with the Smad3 inhibitor SIS3 (20  $\mu$ M) 30 min before treatment with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) for 2 hours. **A)** Representative western blot using the indicated antibodies. **B)** Quantitative analysis of PFKFB3 protein levels **of six independent experiments.** **C)** qRT-PCR analysis of PFKFB3. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. **D)** Intracellular Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration of three independent experiments. The data represent the average  $\pm$  SEM for each condition (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  for conditions treated with TGF- $\beta$ 1 compared to untreated cells and #  $p < 0.05$  for conditions treated with TGF- $\beta$ 1 compared to conditions treated with TGF- $\beta$ 1 and SIS3 inhibitor, determined by Student's *t* test).

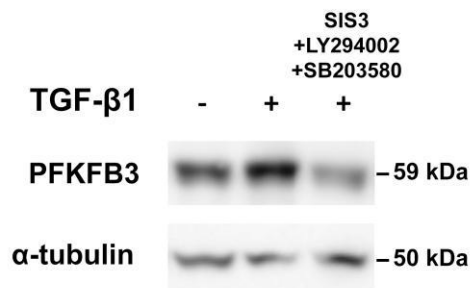
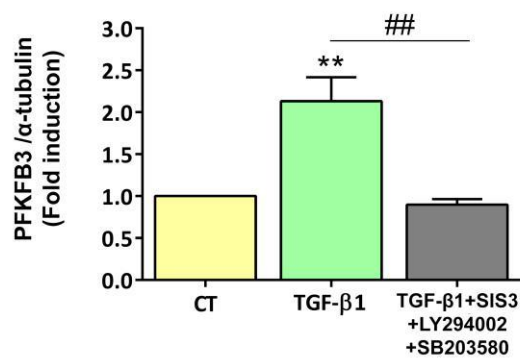
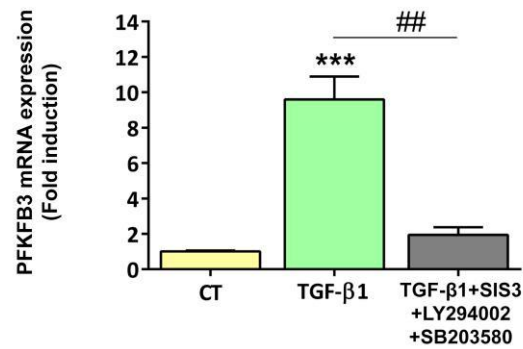
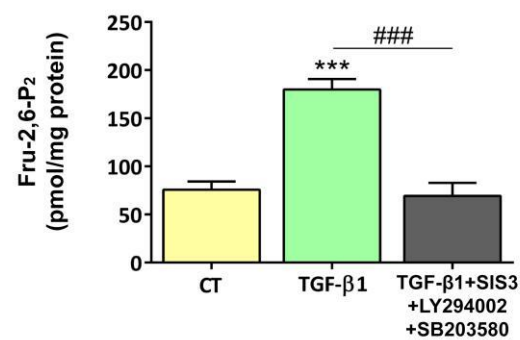


**Figure 8. Role of non-canonical signaling pathways on PFKFB3 induction by TGF- $\beta$ 1 in T98G cells. A) and B) Serum-starved T98G cells were treated with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) at different times. A) Representative western blot using the indicated**

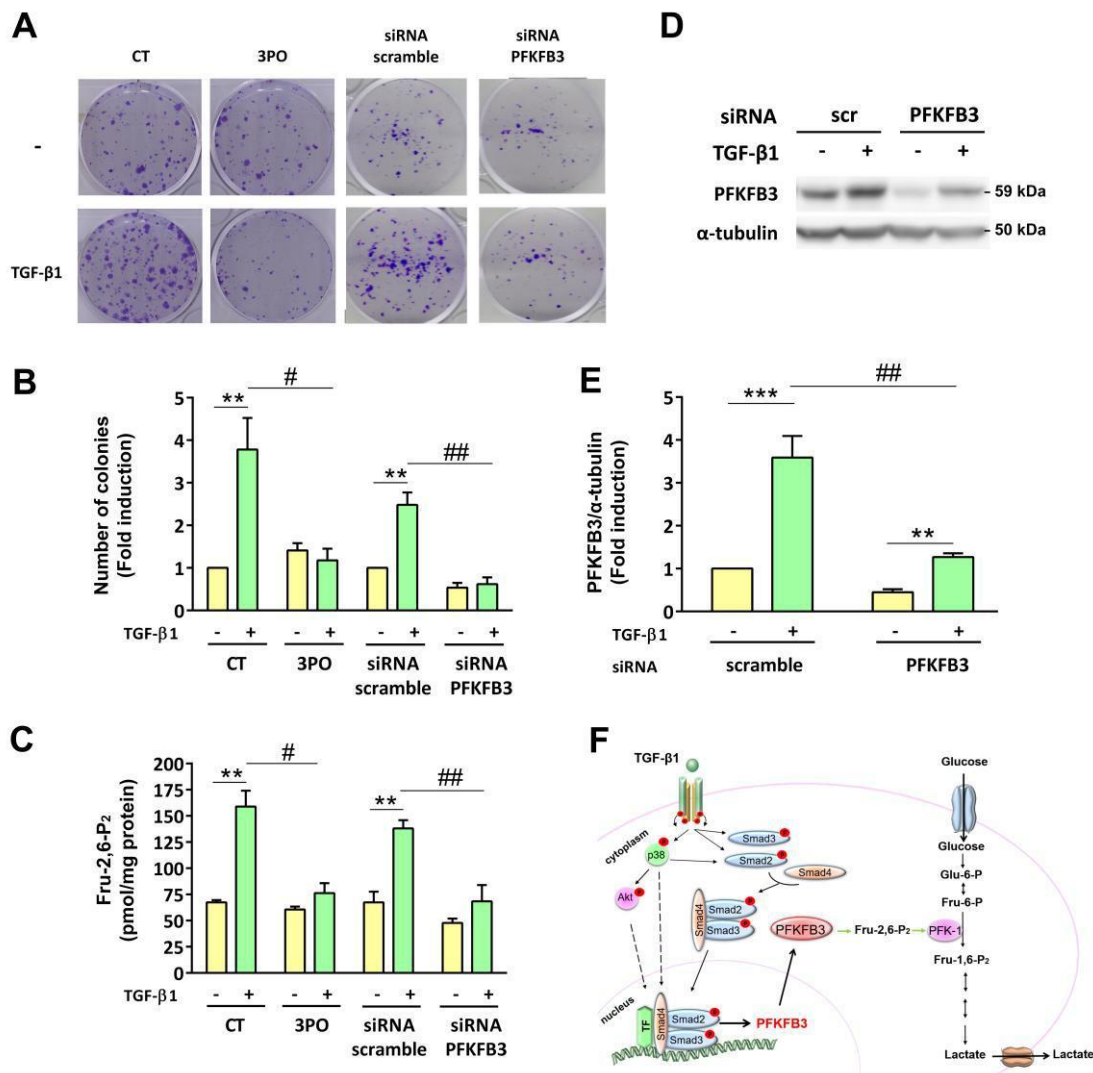
antibodies. **B)** Quantitative analysis of phosphorylated p38 MAPK, Akt, Erk1/2 MAPK and JNK MAPK proteins of four independent experiments. **C)** Western blot analysis of serum-starved T98G cells pre-treated with the T $\beta$ RI inhibitor LY2109761 (2 $\mu$ M) 30 min before treatment with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) for 2 h. **D), E), and F)** Serum-starved T98G cells pre-treated with the p38 MAPK inhibitor SB203580 (10  $\mu$ M) or PI3K inhibitor LY294002 (10  $\mu$ M) 30 min before treatment with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) for 2 h.

**D)** Representative western blot using the indicated antibodies of three independent experiments. **E)** Quantitative analysis of PFKFB3 and phosphorylated Smad2 and Smad3 proteins. **F)** qRT-PCR analysis of PFKFB3 mRNA. **G)** Intracellular Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration of six independent experiments. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. The data represent the average  $\pm$  SEM for each condition (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  for conditions treated with TGF- $\beta$ 1 compared to untreated cells and #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  for conditions treated with TGF- $\beta$ 1 compared to conditions treated with TGF- $\beta$ 1 and the indicated inhibitor, determined by Student's *t* test).



**A****B****C****D**

**Figure 9. Cooperative role of Smad and non-canonical signaling pathways in PFKFB3 induction by TGF- $\beta$ 1 in T98G cells.** Serum-starved T98G cells pre-treated with the p38 MAPK inhibitor SB203580 (10  $\mu$ M), PI3K inhibitor LY294002 (10  $\mu$ M) and Smad3 inhibitor SIS3 (20  $\mu$ M) 30 min before treatment with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) for 2 hours. **A)** Representative western blot using the indicated antibodies. **B)** Quantitative analysis of PFKFB3 protein levels. **C)** qRT-PCR analysis of PFKFB3 mRNA of five independent experiments. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. **D)** Intracellular Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration of four independent experiments. The data represents the average  $\pm$  SEM for each condition (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  for conditions treated with TGF- $\beta$ 1 compared to untreated cells and ##  $p < 0.01$  for conditions treated with TGF- $\beta$ 1 compared to conditions treated with TGF- $\beta$ 1 and the indicated inhibitors, determined by Student's *t* test).



**Figure 10. Effect of PFKFB3 inhibition on anchorage-independent growth of T98G cells.** Serum-starved T98G cells were pre-treated with the PFKFB3 inhibitor 3PO (10  $\mu$ M) 30 min before treatment with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) for 2 h or T98G cells were transfected with 75 nM siRNA, cultured for 48 hours in DMEM followed by 24 h culture in serum-deprived medium and treated with TGF- $\beta$ 1 (4 ng/ml) for 2 h. Then, the cells were seeded at 500 cells/well and allowed to form colonies for 14 days. **A)** Representative pictures of colonies stained with crystal violet. **B)** Quantification of

the number of colonies. The values are expressed as the fold induction compared to untreated cells. **C)** Intracellular Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration. **D)** Representative western blot using the indicated antibodies. **E)** Quantitative analysis of PFKFB3 protein levels of three independent experiments. The data represent the average  $\pm$  SEM for each condition (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  for conditions treated with TGF- $\beta$ 1 compared to untreated cells; #  $p < 0.05$  for conditions treated with TGF- $\beta$ 1 and 3PO inhibitor compared to TGF- $\beta$ 1 condition or for conditions treated with TGF- $\beta$ 1 in cells transfected with siRNA against PFKFB3 compared to cells transfected with siRNA against scramble (scr) treated with TGF- $\beta$ 1, determined by Student's *t* test. **F)** Schematic representation of the mechanisms implicated in the PFKFB3 regulation. Abbreviations: Fru-6-P, fructose-6-phosphate; Fru-1,6-P<sub>2</sub>, fructose-1,6-bisphosphate; Fru-2,6-P<sub>2</sub>, fructose-2,6-bisphosphate; Glu-6-P, glucose-6-phosphate; PFK-1, phosphofructokinase-1; TF, transcription factor.



## Akt mediates TIGAR induction in HeLa cells following PFKFB3 inhibition

Helga Simon-Molas<sup>1,\*</sup>, María Nieves Calvo-Vidal<sup>2,\*</sup>, Esther Castaño<sup>3</sup>, Ana Rodríguez-García<sup>1</sup>, Àurea Navarro-Sabaté<sup>1</sup>, Ramon Bartrons<sup>1</sup> and Anna Manzano<sup>1</sup>

1 Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques, IDIBELL-Universitat de Barcelona, Spain

2 Department of Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

3 Centres Científics i Tecnològics, IDIBELL-Universitat de Barcelona, Spain

### Correspondence

R. Bartrons, Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, E-08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain  
Fax: (34)934024268  
Tel: (34)934024252  
E-mail: rbartrons@ub.edu

\*These authors contributed equally to this work.

(Received 16 May 2016, revised 22 July 2016, available online 24 August 2016)

doi:10.1002/1873-3468.12338

Edited by Bé Wieringa

**Neoplastic cells metabolize higher amounts of glucose relative to normal cells in order to cover increased energetic and anabolic needs. Inhibition of the glycolytic enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) diminishes cancer cell proliferation and tumour growth in animals. In this work, we investigate the crosstalk between PFKFB3 and TIGAR (TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator), a protein known to protect cells from oxidative stress. Our results show consistent TIGAR induction in HeLa cells in response to PFKFB3 knockdown. Upon PFKFB3 silencing, cells undergo oxidative stress and trigger Akt phosphorylation. This leads to induction of a TIGAR-mediated prosurvival pathway that reduces both oxidative stress and cell death. As TIGAR is known to have a role in DNA repair, it could serve as a potential target for the development of effective antineoplastic therapies.**

**Keywords:** glycolysis; PFKFB3; TIGAR; Akt; tumour cell metabolism

Glycolysis is the most ancient pathway involved in carbohydrate oxidation and its regulation is crucial for cells to balance energy production and the synthesis of biomolecules for their proliferation and growth. Phosphofructokinase-1 (PFK-1), which converts fructose 6-phosphate into fructose 1,6-bisphosphate, is a key player in this regulation. PFK-1 is activated by the allosteric factor fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P<sub>2</sub>), a metabolite that can override the inhibitory effect of ATP, synergistically with AMP [1,2]. Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration has been found increased in proliferative and transformed cells [3–6]. Synthesis and degradation

of Fru-2,6-P<sub>2</sub> depend on the relative activities of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) isoenzymes, coded by four genes (PFKFB1-4) [7], the expression of which is tissue and developmental stage-dependent [2,8]. Importantly, tissue-specific isoenzymes are not totally exclusive and cells and tissues can express more than one to respond to different physiological conditions or stimuli [6,9]. The PFKFB3 isoenzyme has a high kinase/bisphosphatase activity ratio, which makes it a net producer of Fru-2,6-P<sub>2</sub>, and it is overexpressed in proliferative cells [10–12] and tumours [13–18].

### Abbreviations

2,3-BPG, 2,3-bisphosphoglycerate; BHA, butylated hydroxyanisole; DCFDA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium; FACS, fluorescence-activated cell sorting; Fru-2,6-P<sub>2</sub>, fructose 2,6-bisphosphate; HBSS, Hank's balanced salt solution; PFK-1, phosphofructokinase-1; PFK-2/FBPase-2, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3; PI, propidium iodide; ROS, reactive oxygen species; siRNA, small interfering RNA; TIGAR, TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator; PPP, pentose phosphate pathway.

PFKFB3 suppression decreases Fru-2,6-P<sub>2</sub> and lactate production, apoptosis, inhibition of anchorage-independent colony formation [6] and impaired vessel sprouting [19] and tumour growth [20,21].

TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) was first cloned as a TP53 target gene whose protein product has an active site similar to that of fructose-2,6-bisphosphatase and phosphoglycerate mutase, that reduces the concentration of Fru-2,6-P<sub>2</sub> [22] and 2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG) [23]. The main function attributed to TIGAR is based on its activity of inhibiting glycolysis and triggering glucose-6-phosphate to the pentose phosphate pathway (PPP), which increases the synthesis of ribose-5-phosphate and NADPH and lowers intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. These functions of TIGAR correlate with an ability to protect cells from ROS-associated apoptosis [22,24]. TIGAR overexpression has been described in invasive breast cancer [25], glioblastoma [26] and colorectal cancer [27–29]. Overexpression of TIGAR reduces ROS production, inhibiting apoptosis and promoting cell proliferation [24], and its inhibition sensitizes cells to radiotherapy by increasing ROS-mediated cell death [30]. Moreover, besides the widely studied antioxidant function of TIGAR, its recently described 2,3-BPG phosphatase activity could be crucial in understanding the role of this enzyme in cancer metabolism.

In this paper we aimed to investigate the crosstalk between PFKFB3 and TIGAR, and how the inhibition of these metabolically related enzymes impairs cancer cells survival. The results presented show that PFKFB3 silencing induces an Akt-dependent increase in TIGAR protein levels, which protects cells from DNA damage and cell death. Inhibiting both PFKFB3 and TIGAR genes increases oxidative stress and P- $\gamma$ -H2AX foci formation, and causes more severe cell death.

## Materials and methods

### Cell culture

HeLa cells, obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), were cultured in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) supplemented with 10% FBS (Biological Industries) and penicillin/streptomycin (100 U·mL<sup>-1</sup> and 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>; Biological Industries), at 37 °C, in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and a relative humidity of 70–80%.

Reagents: Akt inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2 (Cat#124018; Calbiochem, San Diego, CA, USA) was used at 10  $\mu$ M to inhibit phosphorylation of Akt-1 and Akt-2 proteins.

### siRNA transfection

Small interfering RNA (siRNA) targeting PFKFB3 were designed and synthesized as described [6]. For TIGAR silencing, three Stealth siRNA (Invitrogen) were used as described [30]. A scrambled siRNA was used as negative control and referred to as 'Scr.' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were seeded at 15% confluence in the corresponding plates for each experiment and allowed to attach overnight. Then, siRNA transfection was performed using Oligofectamine (Invitrogen) in FBS and antibiotics-free DMEM. The final siRNA concentration was 75 nM. After 4 h, complete media was added to each well.

### Antioxidant treatment

Transfected cells were treated with 1.5 mM *N*-acetyl *N*-acetylcystein (NAC) or 1  $\mu$ M butylated hydroxyanisole (BHA) 4 h after transfection and to the end of the experiments (72 h).

### Protein extraction and western blot

Protein was extracted from cells using SDS buffer (50 mM Tris-Cl, 1% SDS, 10% glycerol) and concentration was determined by bicinchoninic acid protein assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Equal amounts of total protein extracts were analysed in 12.5% (w/v) SDS/PAGE. Western blot was performed using the following antibodies: in-house rabbit polyclonal antibody against PFKFB3 [5], TIGAR (LifeSpan), P-Akt (S473), Akt, P-S6 (S235/S236), S6, P-p70S6K1 (T389), P-mTOR (S2448), mTOR and TSC2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), LC3-I/III (MBL), Bcl-2 (Dako, Sant Just Desvern, Spain), NOXA (Abgent, San Diego, CA, USA), p62 (Abnova, Taipei City, Taiwan) and  $\alpha$ -tubulin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Peroxidase-conjugated secondary antibodies goat  $\alpha$ -mouse and goat  $\alpha$ -rabbit (Advanta, Menlo Park, CA, USA) were used. Immunostaining was carried out using the ECL technique (Bio-Rad). Densitometric analysis was performed using MULTI-GAUGE v3.0 (FujiFilm Corporation, Tokyo, Japan) software. Protein levels were normalized to  $\alpha$ -tubulin in all experiments.

### Fru-2,6-P<sub>2</sub> determination

Fru-2,6-P<sub>2</sub> was determined following the method described by Van Schaftingen *et al.* [31]. Protein concentration was determined by the Bradford-based Bio-Rad assay.

### Total cellular ROS levels

Cells were seeded into 12-well plates and allowed to grow for 72 h after siRNA transfection. After three washes with PBS, cells were loaded with the oxidative-sensitive dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) at 10  $\mu$ M in Hank's Balanced

Salt Solution (HBSS). After 30 min in a cell incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>, cells were trypsinized, collected in 500 µL of PBS containing 10% of FBS and immediately analysed. All measurements were made with a FACSCanto flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipped with a 488-nm laser. DCFDA fluorescence was collected by use of a 530/30-nm filter. A minimum of 10 000 events per sample was analysed using the BD FACSDIVA software.

### Immunofluorescent phospho- $\gamma$ -H2AX staining

Cells were seeded in coverslips inside 24-well plates and allowed to grow for 72 h after siRNA transfection. Then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and immunostained with primary antibody against phospho- $\gamma$ -H2AX (S139) (EMD Millipore, Darmstadt, Germany) and secondary Cy3-conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Nuclei were stained with TO-PRO-3 Iodide (1 : 1000; Invitrogen). Images were acquired with a Spectral Confocal Microscope (TCS-SL; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using a Plan-Apochromat 63 $\times$ /1.4 N.A. immersion oil objective (Leica Microsystems). We used excitation He/Ne laser beams (Lasos, Jena, Germany) at 633 nm for TO-PRO-3 and 456 nm for Cy3, and a pinhole of 115 µm. Images were captured using LEICA CONFOCAL Software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Images of  $\gamma$ -H2AX foci and nuclei were exported separately as .tif files and processed using IMAGE J software (NIH, Maryland, USA). Images shown were obtained with the Merge Channels command. Total nuclei number was determined by manual counting and  $\gamma$ -H2AX foci were counted with the Find Maxima command. At least 150 cells from five randomly chosen fields of view were counted in each condition, and the average number of P- $\gamma$ -H2AX foci per cell nucleus was calculated.

### mRNA expression

RNA was analysed by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA) using SALSA MLPA KIT R011 Apoptosis mRNA from MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands).

### MTT assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was used to determine cell viability. Cells were seeded into 24-well plates and allowed to grow for 24, 48 or 72 h after siRNA transfection. MTT dissolved in PBS was added to the cultures at a final concentration of 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>. After incubation at 37 °C for 2 h, the medium was carefully removed and formazan crystals were dissolved in 200 µL Isopropanol:HCl 40 mM per well. Triplicates of 50 µL were transferred to a 96-well plate and the absorbance was measured at 570 nm (SunriseTecan plaque reader).

### Staining by Annexin V and propidium iodide

The appearance of apoptotic or necrotic cells was determined with the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (eBioscience Bender MedSystems, eBioscience (San Diego, CA, USA). Cells were seeded into six-well plates and allowed to grow for 72 h after siRNA transfection. Floating and freshly trypsinized cells were pooled, washed twice in binding buffer and processed following manufacturer's instructions. All measurements were made with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled argon ion laser emitting at 488 nm. The barrier filters were 530/30 nm for annexin-FITC, and 670/LP for propidium iodide (PI) fluorescence. A minimum of 10 000 events per sample were analysed using the CELL QUEST PRO software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### Data analysis

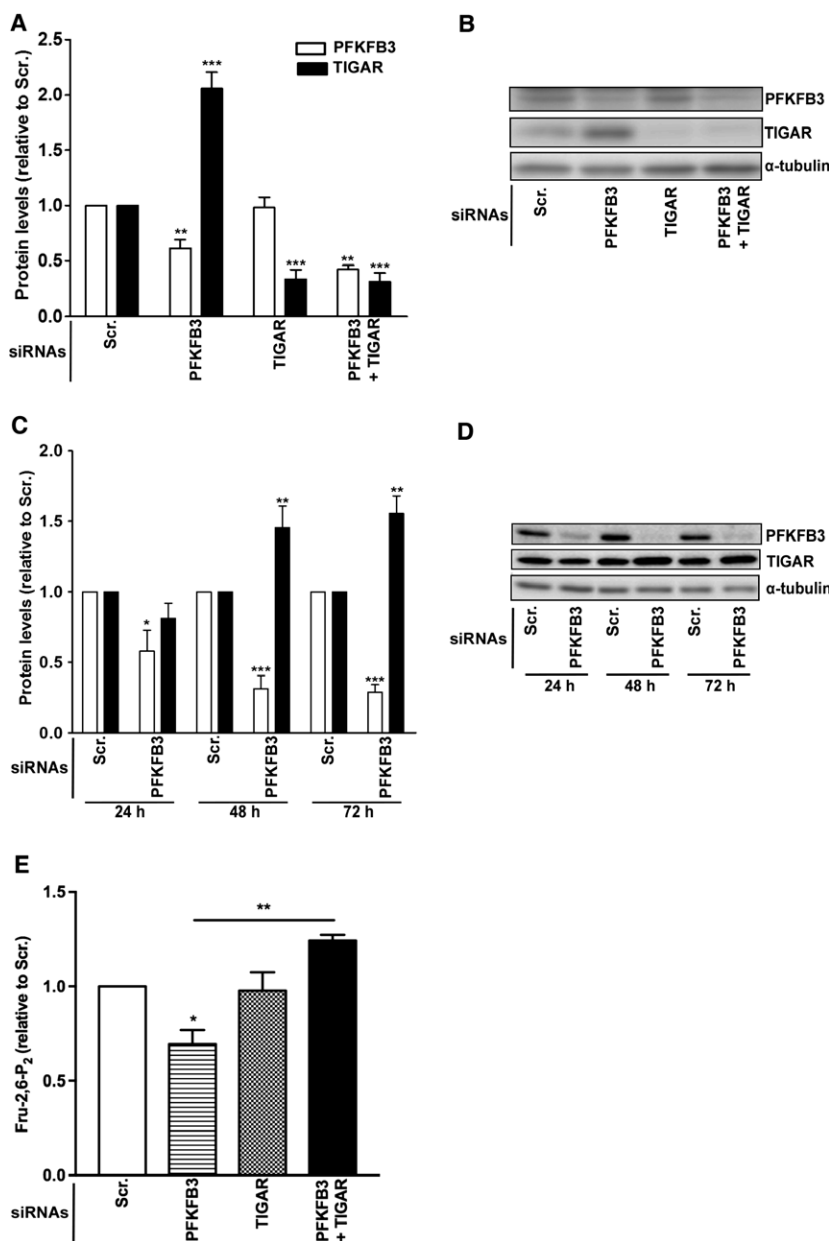
Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the values obtained from the indicated number of independent experiments. Differences between samples were analysed with the Student's *t* test. Significant differences at *P* < 0.05, 0.01, and 0.001 between conditions are indicated by \*, \*\* and \*\*\* respectively. All calculations were performed using the GRAPHPAD PRISM version 4.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## Results

### PFKFB3 inhibition enhances TIGAR protein expression and decreases Fru-2,6-P<sub>2</sub>

We transfected HeLa cells with PFKFB3 and TIGAR-targeted siRNA. siRNA concentration (75 nM) effectively suppressed PFKFB3 and TIGAR protein levels at 72 h after transfection. Interestingly, we observed a significant upregulation of TIGAR protein amount in response to PFKFB3 inhibition (Fig. 1A,B). To further investigate this effect, we performed western blot analysis of HeLa protein extracts from 24 to 72 h after PFKFB3-targeted siRNA transfection. The results obtained showed a significant decrease in PFKFB3 protein from 24 h after siRNA transfection, being abrogated at 72 h. Oppositely, TIGAR protein levels were significantly increased at 48 h after PFKFB3-targeted siRNA transfection, being even higher at 72 h post-transfection, showing a time-dependent induction of TIGAR in response to PFKFB3 removal (Fig. 1C, D). TIGAR silencing does not modify PFKFB3 protein levels (Fig. 1A–D). Fru-2,6-P<sub>2</sub> levels were significantly decreased with PFKFB3-targeted siRNA and this effect was reverted by the inhibition of TIGAR (Fig. 1E).





**Fig. 1.** Analysis of the effects of PFKFB3 and TIGAR inhibition on HeLa cells by western blotting and Fru-2,6-P<sub>2</sub> quantification. (A) Western blot analysis quantification of PFKFB3 (white bars) and TIGAR (black bars) after 72 h of siRNA transfection from three independent experiments. (B) Western blot images representative of three independent blots are shown. (C) Quantification of PFKFB3 (white bars) and TIGAR (black bars) after 24 to 72 h of siRNA transfection from five independent experiments. (D) Western blot images, representative of five independent blots are shown. (E) Quantification of Fru-2,6-P<sub>2</sub> after 72 h of siRNA transfection. All data are presented as the mean fold change relative to the scrambled siRNA (Scr.) of the corresponding time  $\pm$  SEM (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001).

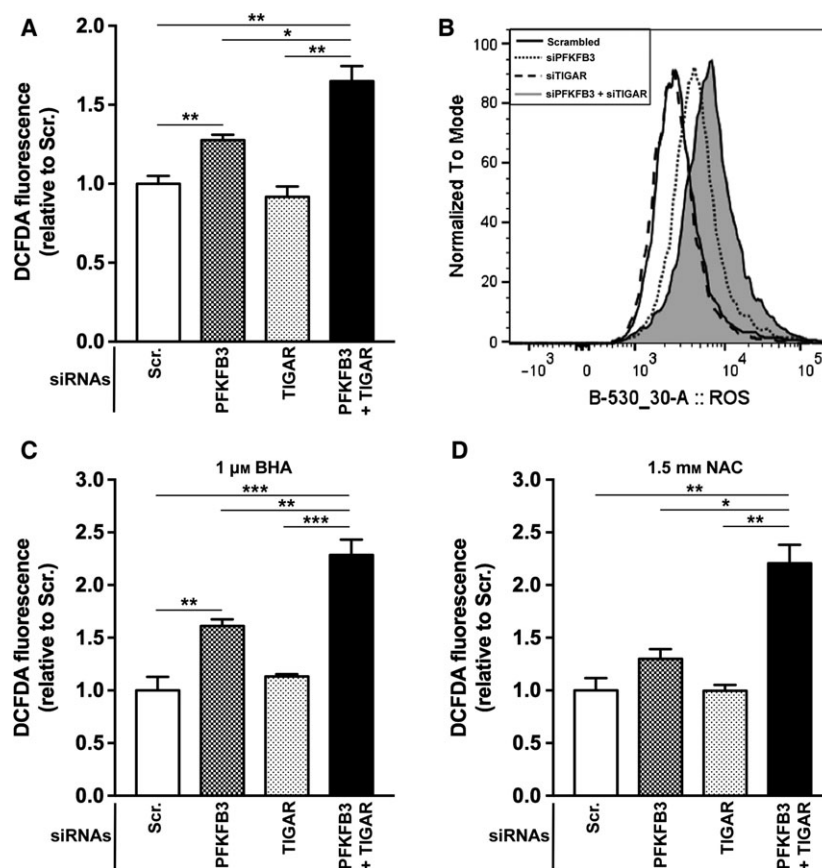
### TIGAR limits ROS production in PFKFB3-inhibited cells

It has been described that glycolysis impairment raises oxidative stress production [32,33]. In order to assess if the same response occurred after PFKFB3 inhibition in our model, we transfected HeLa cells with PFKFB3 and TIGAR-targeted siRNA and quantified ROS levels with the fluorescent probe DCFDA by Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). The inhibition of PFKFB3 alone significantly increased oxidative stress, whereas cells lacking TIGAR did not show any changes in ROS levels. However, TIGAR

silencing in cells lacking PFKFB3 caused a significant increase in oxidative stress (Fig. 2A,B). The antioxidants NAC and BHA significantly reduced basal ROS levels, but the increase in ROS after PFKFB3 and TIGAR inhibition was not prevented by any of them (Fig. 2C,D).

### Akt signalling pathway drives TIGAR induction in response to PFKFB3 silencing

The results obtained described a crosstalk between PFKFB3 and TIGAR (Fig. 1), and thus we wondered which signalling pathway could be orchestrating it.



**Fig. 2.** Reactive oxygen species analysis in HeLa cells 72 h after PFKFB3 and/or TIGAR-targeted siRNA transfection. (A) Quantification of DCFDA fluorescence. (B) Raw data of DCFDA fluorescence peaks of a representative experiment. Quantification of ROS levels after cotreatment with the antioxidant molecules BHA (C) and NAC (D). Data are presented as the mean fold change with respect to scrambled siRNA (Scr.)  $\pm$  SEM of three independent experiments with duplicates, and comparison between conditions is indicated by horizontal bars (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001).

The mTORC2-Akt-mTORC1 axis has been described to control PFKFB3 levels [34,35] and, moreover, this pathway has been found activated in cancer cells under glucose deprivation conditions and oxidants exposure [36,37]. As we have shown, TIGAR limits ROS production after PFKFB3 inhibition (Fig. 2). Thus, we decided to analyse the phosphorylation status of several proteins of the Akt cascade after 72 h of PFKFB3 silencing and found increased amounts of P-Akt (S473), P-mTOR (S2448), P-p70 S6K1 (T389) and P-S6 (S235/236) (Fig. 3A,B). We sought to determine if P-Akt was upstream of TIGAR induction. We found increased phosphorylated Akt levels 72 h after siRNA transfection in both single PFKFB3 and in PFKFB3 and TIGAR-suppressed cells, with no modulation of the total amounts of Akt in any of the assayed conditions (Fig. 3C,D). Next, we treated cells with the Akt inhibitor Akti-1/2, which targets all forms of Akt, and we transfected these cells with scrambled or PFKFB3-targeted siRNA. TIGAR induction in response to PFKFB3 suppression was abolished by this inhibitor, which indicates that Akt Ser-473 phosphorylation is necessary for TIGAR modulation under these conditions (Fig. 3E,F). Akt

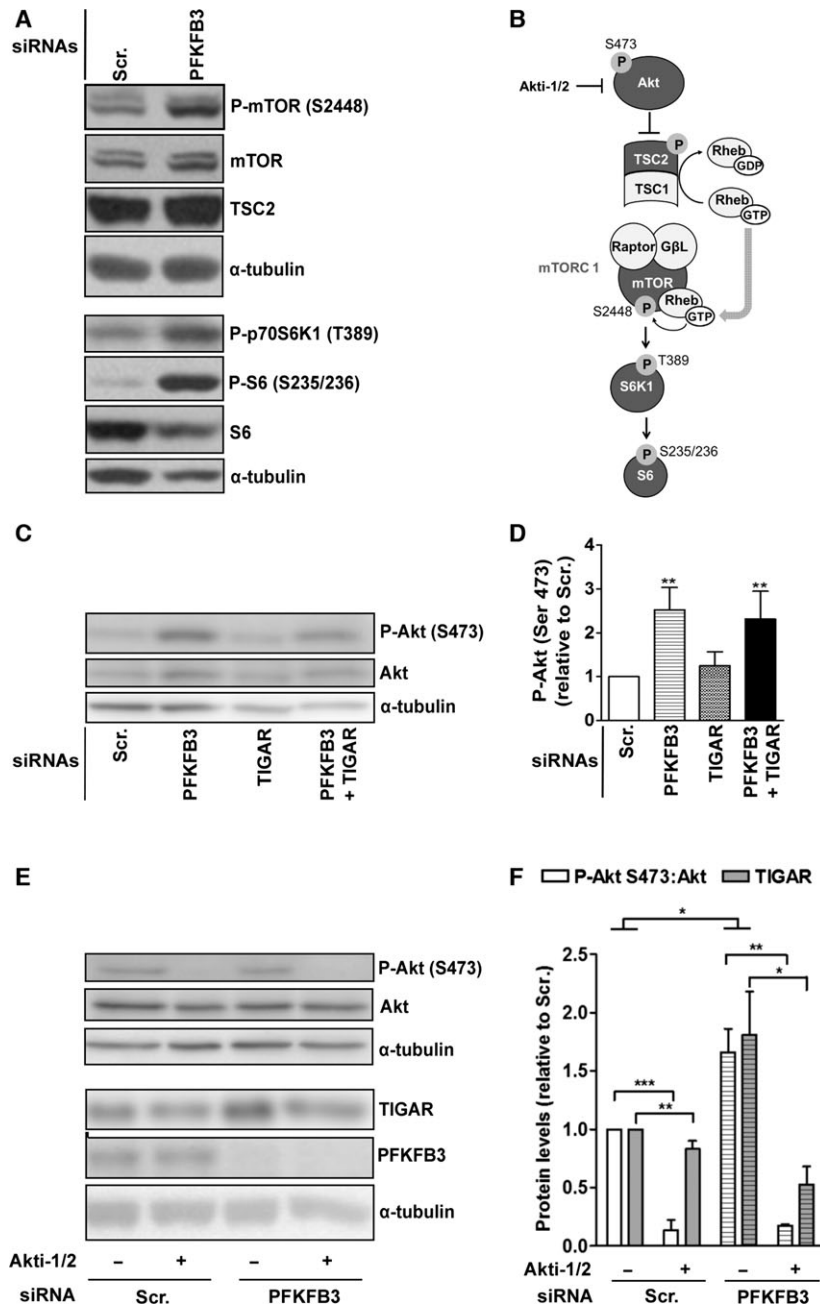
phosphorylation and TIGAR induction in response to PFKFB3 inhibition were not prevented by NAC or BHA (data not shown).

#### PFKFB3 inhibition does not affect autophagy in HeLa cells

Overexpression of TIGAR has been related with the inhibition of autophagy [24]. In contrast, PFKFB3 inhibition has been described to activate autophagy in the HCT116 cell line [32]. In order to investigate whether autophagy was triggered as a survival mechanism in our model of PFKFB3 and TIGAR inhibition, we analysed LC3 cleavage and p62 protein levels by western blot after 72 h of siRNA transfection. No significant changes were observed in the LC3-II/LC3-I ratio nor in p62 total amounts in any of the analysed conditions (Fig. 4).

#### TIGAR deficiency increases DNA damage and cell death

We aimed to investigate the functional relevance of TIGAR upregulation after PFKFB3 inhibition. First, we analysed the effect of TIGAR deficiency on DNA

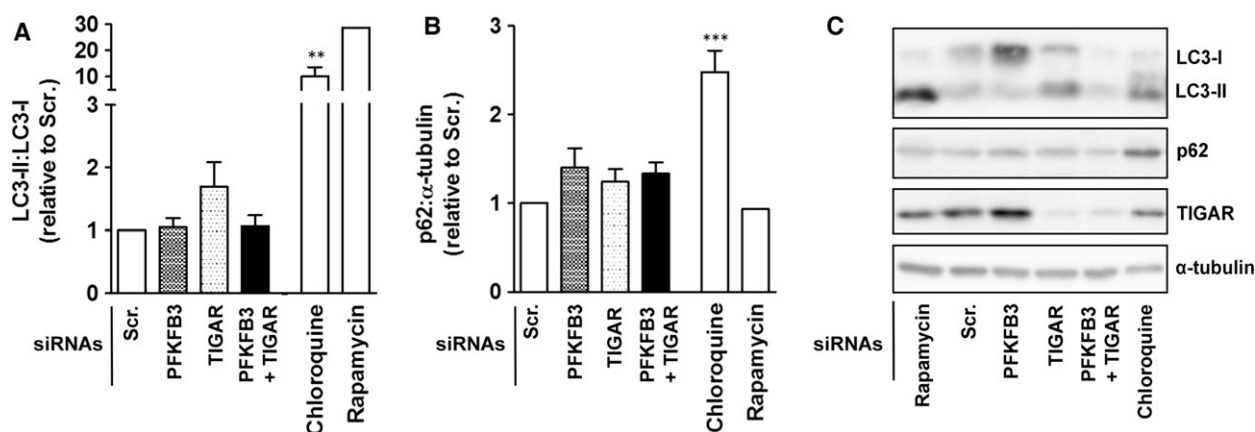


**Fig. 3.** Western Blot analysis of Akt signaling pathway in protein extracts of HeLa cells obtained 72 h after PFKFB3 and/or TIGAR-targeted siRNA transfection. (A) Representative images of phosphorylated targets in the Akt signaling cascade. (B) Scheme of the Akt/mTORC1 signaling pathway. The proteins analysed by western blot are coloured in dark grey. (C) Western blot analysis of Akt phosphorylation at S473 after PFKFB3 and TIGAR-targeted siRNA transfection, representative of four independent blots. (D) Quantification of Akt phosphorylation, calculated as the ratio between phosphorylated Akt at S473 and total amounts of Akt in four independent experiments. Data are presented as the mean fold change relative to the scrambled siRNA (Scr.)  $\pm$  SEM (\*\* $P < 0.01$ ). (E) Western blot analysis of Akt phosphorylation at S473 and TIGAR after PFKFB3-targeted siRNA transfection, in the presence or absence of Akti-1/2, representative of three independent blots. (F) Quantification of Akti-1/2 effects in the mentioned proteins in three independent experiments. Data are presented as the mean fold change relative to scrambled siRNA (Scr.)  $\pm$  SEM, and comparison between conditions is indicated by horizontal bars (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

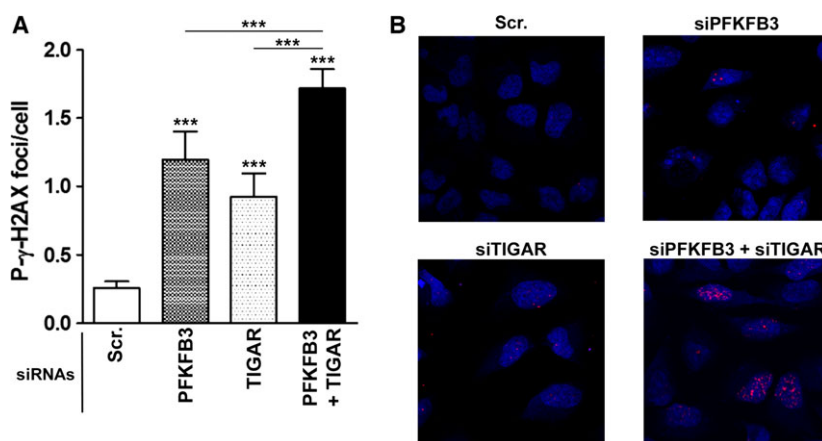
damage. For this, we performed immunostaining of phospho- $\gamma$ -H2AX (Ser 139) foci formation in PFKFB3 and TIGAR-silenced cells. Single inhibition of PFKFB3 or TIGAR was sufficient to increase DNA damage, but the phenotype was even more severe in cells lacking both proteins, with the number of phospho- $\gamma$ -H2AX foci being significantly higher compared to each siRNA alone (Fig. 5).

Furthermore, we wanted to assess if the increased DNA damage observed after TIGAR suppression

occurred in parallel with exacerbated cell death. Firstly, we analysed the effects of PFKFB3 and TIGAR simultaneous inhibition on cell proliferation and viability through an MTT assay. Remarkably, cells in which both PFKFB3 and TIGAR were silenced had significant 40% decreased growth rate compared to controls (Fig. 6A). However, we did not see any significant reduction in MTT signal in cells transfected with either single PFKFB3 or TIGAR-targeted siRNA. To further assess if apoptosis and



**Fig. 4.** Western Blot analysis of LC3 cleavage (LC3-II) and p62 protein levels in HeLa cell extracts 72 h after PFKFB3 and TIGAR-targeted siRNA transfection. Quantification of LC3-II:LC3-I ratio (A) and p62 (B) of four independent blots. Data are presented as the mean fold change relative to scrambled siRNA (Scr.)  $\pm$  SEM (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). (C) Western blot images of a representative experiment are shown.



**Fig. 5.** Effect of PFKFB3 and TIGAR silencing on P-H2AX S139 foci in HeLa cells after 72 h of PFKFB3 and/or TIGAR-targeted siRNA transfection. (A) Quantification of the average number of foci/cell determined with IMAGEJ software from at least 150 cells counted from five randomly chosen fields of view in each condition. Data are presented as mean  $\pm$  SEM, and comparison between conditions is indicated by horizontal bars (\*\*\* $P < 0.001$ ). (B) Images of a representative experiment showing merged channels of P-H2AX S139 (Cy3, in red) and nuclei (TO-PRO-3, in blue).

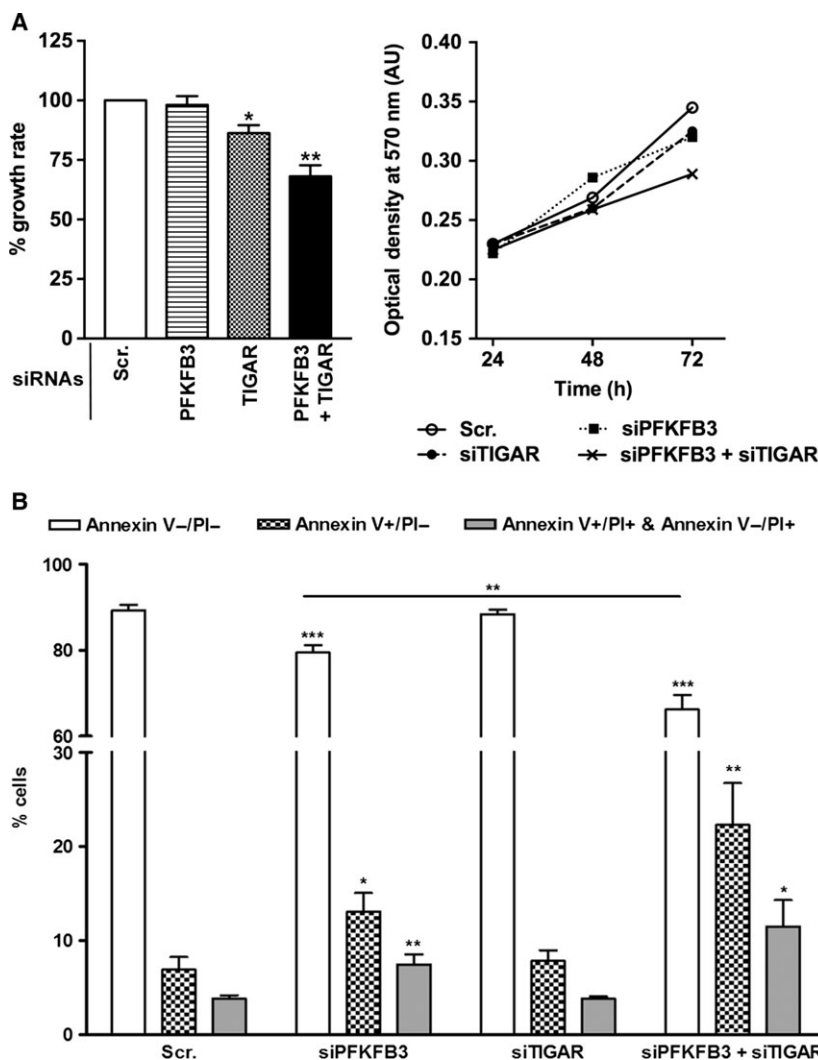
necrosis were triggered in the experimental conditions analysed, an Annexin V/PI assay was performed, showing increased early and late apoptotic and necrotic populations (Annexin V+/PI−, Annexin V+/PI+ and Annexin V−/PI+ cells respectively) after PFKFB3 silencing. TIGAR inhibition alone did not affect viability. However, the combination of PFKFB3 and TIGAR silencing exacerbated the effects of PFKFB3 inhibition alone, causing 15% decreased cell viability compared to PFKFB3-inhibited cells, and leading to double number of apoptotic and necrotic cells (Fig. 6B).

To investigate the mechanism behind these results, the expression of a panel of apoptosis-related genes was analysed by RT-MLPA confirming that apoptosis was

triggered after PFKFB3 inhibition: NOXA was overexpressed at 72 h after PFKFB3-targeted siRNA transfection, whereas Bcl-2 was significantly decreased at the same time point. These results were confirmed at the protein level by western blot (Fig. 7A). On the other hand, there were no significant changes in any of the analysed apoptotic-related genes after TIGAR silencing (Fig. 7B).

## Discussion

It was nearly a century ago when Warburg described that cancer cells show characteristic metabolic alterations which make them highly dependent on glycolysis for survival and spreading [38]. PFKFB3 gene is overexpressed in tumours and codes for the PFKFB3



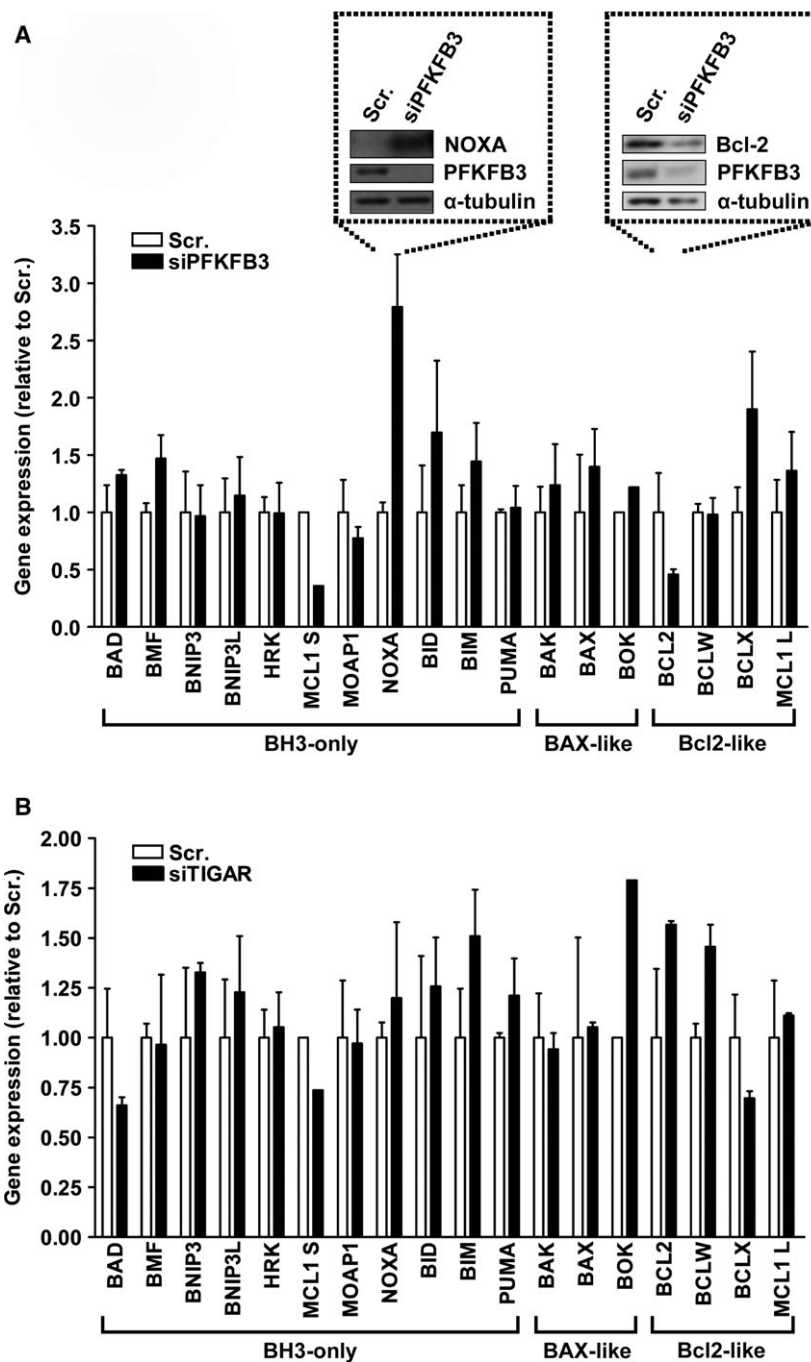
**Fig. 6.** Effect of PFKFB3 and TIGAR silencing on HeLa cells viability. (A) MTT assay was performed 72 h after PFKFB3 and/or TIGAR-targeted siRNA transfection. Data are presented as the mean fold change in growth rate relative to the scrambled siRNA (Scr.)  $\pm$  SEM ( $*P < 0.05$ ) (left panel). Raw data of a single experiment is shown (right panel). (B) Annexin V-FITC/PI staining was performed 72 h after siRNA transfection. Cells AnnexinV-/PI- were considered as viable cells, cells AnnexinV+/PI- were considered as early apoptotic cells, cells AnnexinV+/PI+ were considered as late apoptotic or necrotic cells, and cells AnnexinV-/PI+ were considered as necrotic cells. AnnexinV+/PI+ and AnnexinV-/PI+ populations are represented in a single column. Data are presented as % of cells in each population  $\pm$  SEM of six independent experiments, and comparison between conditions is indicated by horizontal bars ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ).

isoenzyme of PFK-2/FBPase-2, which has the highest kinase/bisphosphatase ratio [10] and maintains a high Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration in tumour cells [14,17]. The inhibition of PFKFB3 causes a glycolytic blockage that results in impaired vessel sprouting [19], cell cycle arrest and cell death, and reduction of anchorage-independent growth of tumour cell colonies [6] and animal tumour burden [20,21]. Since much of the effects of glycolysis inhibition have been attributed to increased oxidative stress [32,33], the study of proteins which contribute to the antioxidant potential of cells under these conditions can elucidate pro-survival mechanisms triggered by cancer cells in response to glycolysis inhibition.

TIGAR, which catalyses the opposite reaction of PFKFB3, limits cellular oxidative stress. This gene is also overexpressed in tumours [22,25–27,29], in which it reduces ROS production, inhibits apoptosis and promotes cell proliferation. Downregulation of the gene

decreases the ratio between reduced and oxidized glutathione levels, which results in increased ROS and apoptosis [24]. Moreover, the inhibition of this gene in combination with radiotherapy has been shown to improve the anticancer effect of this therapy [30]. Additionally, TIGAR has been identified as 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase and this recently described activity points out that this enzyme can have other key effects on cancer cells metabolism beyond PPP enhancement [23].

In this study, we have focused on the potential value of inhibiting both PFKFB3 and TIGAR in HeLa, a cell line in which PFKFB3 inhibition alone has already been shown to impair tumour growth by decreasing Fru-2,6-P<sub>2</sub> [6], as we have confirmed in our model. We demonstrate here that TIGAR is upregulated after PFKFB3 removal in a time-dependent manner, protecting cells from apoptosis and necrosis caused by PFKFB3 inhibition (Fig. 8). Opposite to what was

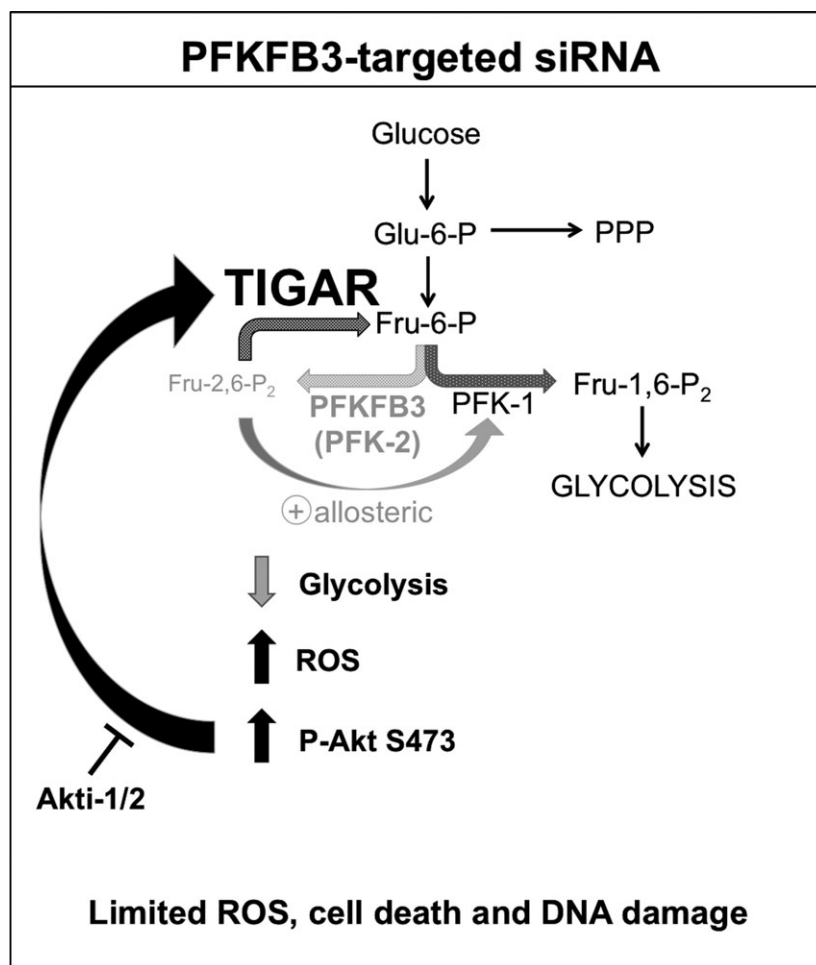


**Fig. 7.** RT-MLPA analysis of apoptotic-related genes in HeLa cells after 72 h of siRNA transfection targeting PFKFB3 (A) or TIGAR (B). Data are presented as the expression of each gene relative to the expression of that gene in the scrambled condition (Scr.) ± SEM. Western blot analysis of NOXA and Bcl-2 protein levels after 72 h of PFKFB3-targeted siRNA transfection was performed to confirm the mRNA expression results (dotted boxes).

shown in other cell lines, PFKFB3 inhibition in HeLa does not trigger autophagy [32]. In fact, TIGAR overexpression has been previously found to inhibit autophagy, which is consistent with the results presented here [39]. The removal of both PFKFB3 and TIGAR increases ROS production and DNA damage measured by phospho-γ-H2AX foci formation. Consequently, it significantly impairs HeLa cancer cell survival compared to PFKFB3 inhibition alone, as we

have proven both by MTT and Annexin V/PI assays. TIGAR direct contribution to DNA repair mechanisms has been described in other models [40].

According to previous publications describing that the mTORC2-Akt-mTORC1 axis links glycolytic metabolism to ROS homeostasis [36,41], here we show that levels of phosphorylated Akt, mTORC, p70S6K and S6 are increased after PFKFB3 silencing. Moreover, Akt inhibition with Akti-1/2 prevents TIGAR induction in



**Fig. 8.** Summary of the main findings of this work. Abbreviations: Glu-6-P, glucose-6-phosphate; PPP, pentose phosphate pathway; Fru-6-P, fructose-6-phosphate; Fru-1,6-P<sub>2</sub>, fructose-1,6-bisphosphate; Fru-2,6-P<sub>2</sub>, fructose-2,6-bisphosphate; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3; PFK-1, phosphofructokinase-1; PFK-2/FBPase-2, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase.

response to PFKFB3 suppression. Thus, we report that Akt activation is necessary for TIGAR modulation in the experimental conditions analysed. These results point out that HeLa cells lacking PFKFB3 trigger the mTORC2-Akt-mTORC1 prosurvival axis in an attempt to rescue glycolysis, since Akt has been widely described to activate GLUT1, Hexokinase, PFK-1 and PFKFB3 [34,35], and be essential for tumour growth [42]. On the contrary, Akt inhibition has been proven to decrease early metabolites in glycolysis and the pentose phosphate pathway [43], which is consistent with the inhibition of TIGAR that we have observed with Akti-1/2. It seems reasonable to hypothesize that the increase in ROS observed after PFKFB3 inhibition is responsible for the induction of the pathway, as it has been described in HeLa cells under glucose deprivation conditions [37]. This is the first time to describe that Akt is necessary for TIGAR modulation, and therefore here we set the basis for considering this gene as part of the Akt-driven prosurvival and growth response of cancer cells, which has been widely described to be one of the

most important pathways for cancer development and progression. It is not clear yet whether TIGAR effects are mainly due to its bisphosphatase activity on Fru-2,6-P<sub>2</sub>, as it has been reported in many other models [22], or to its action on other metabolites such as 2,3-BPG [23]. However, what is clear is that when a stressful stimulus such as PFKFB3 inhibition threatens cells, TIGAR is required to redirect glycolytic intermediates to other pathways for the synthesis of biomolecules, which maintain ROS homeostasis and favour tumour growth. On the other hand, when TIGAR is lacking, both glycolysis and alternative metabolic pathways are blocked, so cells fail to overpass the stress and undergo necrosis. Therefore, strategies based on blocking both PFKFB3 and TIGAR could be more effective in impairing tumour growth than PFKFB3 inhibition alone.

### Acknowledgements

We are grateful to J. Gil and A. Fernandez Santidrian for helping in RT-MLPA analysis; B. Torrejón from

the Microscopy Unit of *Centres Científics i Tecnològics* of the *Universitat de Barcelona* (CCiT-UB) for excellent technical assistance and advice; E. Adanero for skilful technical assistance; and P. Samsó and C. Arnedo for suggestions and helpful comments. This work was supported by Instituto de Salud Carlos III – FIS (PI13/0096) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). With the support of Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya.

## Author contributions

AM and RB conceived and designed the experiments; MC and HS performed the experiments; EC contributed reagents and materials; AM, HS and EC analysed the data; AR, AN and MC critically commented and revised the work; and RB, AM and HS wrote the manuscript.

## References

- 1 Van Schaftingen E (1987) Fructose 2,6-bisphosphate. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **59**, 315–395.
- 2 Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG and Hue L (2004) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* **381**, 561–579.
- 3 Colomer D, Vives-Corrans JL, Pujades A and Bartrons R (1987) Control of phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate in B-lymphocytes and B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Res* **47**, 1859–1862.
- 4 Hue L and Rousseau GG (1993) Fructose 2,6-bisphosphate and the control of glycolysis by growth factors, tumor promoters and oncogenes. *Adv Enzyme Regul* **33**, 97–110.
- 5 Riera L, Manzano A, Navarro-Sabate A, Perales JC and Bartrons R (2002) Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1589**, 89–92.
- 6 Calvo MN, Bartrons R, Castano E, Perales JC, Navarro-Sabate A and Manzano A (2006) PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett* **580**, 3308–3314.
- 7 Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate A, Riera L, Bartrons R and Lange AJ (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci* **26**, 30–35.
- 8 Goren N, Manzano A, Riera L, Ambrosio S, Ventura F and Bartrons R (2000) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase expression in rat brain during development. *Brain Res Mol Brain Res* **75**, 138–142.
- 9 Telang S, Yalcin A, Clem AL, Bucala R, Lane AN, Eaton JW and Chesney J (2006) Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* **25**, 7225–7234.
- 10 Sakakibara R, Uemura M, Hirata T, Okamura N and Kato M (1997) Human placental fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: its isozymic form, expression and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1949–1952.
- 11 Manzano A, Rosa JL, Ventura F, Perez JX, Nadal M, Estivill X, Ambrosio S, Gil J and Bartrons R (1998) Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3). *Cytogenet Cell Genet* **83**, 214–217.
- 12 Navarro-Sabate A, Manzano A, Riera L, Rosa JL, Ventura F and Bartrons R (2001) The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene* **264**, 131–138.
- 13 Bartrons R and Caro J (2007) Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr* **39**, 223–229.
- 14 Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R and Bucala R (2002) High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res* **62**, 5881–5887.
- 15 Chesney J (2006) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**, 535–539.
- 16 Novellademunt L, Navarro-Sabate A, Manzano A, Rodríguez-García A and Bartrons R (2013) PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* **17**, 609–622.
- 17 Obach M, Navarro-Sabate A, Caro J, Kong X, Duran J, Gomez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL and Bartrons R (2004) 6-Phosphofructo-2-kinase (pikfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* **279**, 53562–53570.
- 18 Minchenko OH, Ochiai A, Opentanova IL, Ogura T, Minchenko DO, Caro J, Komisarenko SV and Esumi H (2005) Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie* **87**, 1005–1010.
- 19 De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquiere B, Cauwenberghs S, Eelen G *et al.* (2013) Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* **154**, 651–663.
- 20 Clem B, Telang S, Clem A, Yalcin A, Meier J, Simmons A, Rasku MA, Arumugam S, Dean WL,



- Eaton J *et al.* (2008) Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Mol Cancer Ther* **7**, 110–120.
- 21 Domenech E, Maestre C, Esteban-Martinez L, Partida D, Pascual R, Fernandez-Miranda G, Seco E, Campos-Olivas R, Perez M, Megias D *et al.* (2015) AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat Cell Biol* **17**, 1304–1316.
- 22 Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E and Vousden KH (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* **126**, 107–120.
- 23 Gerin I, Noel G, Bolsée J, Haumont O, Van Schaftingen E and Bommer GT (2014) Identification of TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) as the phosphoglycolate-independent 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase. *Biochem J* **458**, 439–448.
- 24 Lee P, Vousden KH and Cheung EC (2014) TIGAR, TIGAR, burning bright. *Cancer Metab* **2**, 1.
- 25 Won KY, Lim SJ, Kim GY, Kim YW, Han SA, Song JY and Lee DK (2012) Regulatory role of p53 in cancer metabolism via SCO2 and TIGAR in human breast cancer. *Hum Pathol* **43**, 221–228.
- 26 Wanka C, Steinbach JP and Rieger J (2012) Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) protects glioma cells from starvation-induced cell death by up-regulating respiration and improving cellular redox homeostasis. *J Biol Chem* **287**, 33436–33446.
- 27 Cheung EC, Athineos D, Lee P, Ridgway RA, Lambie W, Nixon C, Strathdee D, Blyth K, Sansom OJ and Vousden KH (2013) TIGAR is required for efficient intestinal regeneration and tumorigenesis. *Dev Cell* **25**, 463–477.
- 28 Simon H, Rodríguez-García A, Navarro-Sabate A, Fontova P, Bartrons R and Manzano A (2014) C12orf5 (chromosome 12 open reading frame 5). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* **18**, 500–510.
- 29 Al-Khayal K, Abdulla M, Al-Obeed O, Al Kattan W, Zubaidi A, Vaali-Mohammed MA, Alsheikh A and Ahmad R (2016) Identification of the TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator in various stages of colorectal cancer patients. *Oncol Rep* **35**, 1281–1286.
- 30 Pena-Rico MA, Calvo-Vidal MN, Villalonga-Planells R, Martinez-Soler F, Gimenez-Bonafe P, Navarro-Sabate A, Tortosa A, Bartrons R and Manzano A (2011) TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) knockdown results in radiosensitization of glioma cells. *Radiother Oncol* **101**, 132–139.
- 31 Van Schaftingen E, Lederer B, Bartrons R and Hers HG (1981) A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate. *Eur J Biochem* **129**, 191–195.
- 32 Klarer AC, O'Neal J, Imbert-Fernandez Y, Clem A, Ellis SR, Clark J, Clem B, Chesney J and Telang S (2014) Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) induces autophagy as a survival mechanism. *Cancer Metab* **2**, 2.
- 33 Liu Y, Song XD, Liu W, Zhang TY and Zuo J (2003) Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *J Cell Mol Med* **7**, 49–56.
- 34 Duran J, Obach M, Navarro-Sabate A, Manzano A, Gomez M, Rosa JL, Ventura F, Perales JC and Bartrons R (2009) Pfkfb3 is transcriptionally upregulated in diabetic mouse liver through proliferative signals. *FEBS J* **276**, 4555–4568.
- 35 Trefely S, Khoo PS, Krycer JR, Chaudhuri R, Fazakerley DJ, Parker BL, Sultani G, Lee J, Stephan JP, Torres E *et al.* (2015) Kinome screen identifies PFKFB3 and glucose metabolism as important regulators of the insulin/insulin-like growth factor (IGF)-1 signaling pathway. *J Biol Chem* **290**, 25834–25846.
- 36 Dong-Yun S, Yu-Ru D, Shan-Lin L, Ya-Dong Z and Lian W (2003) Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation. *FEBS Lett* **542**, 60–64.
- 37 Gao M, Liang J, Lu Y, Guo H, German P, Bai S, Jonasch E, Yang X, Mills GB and Ding Z (2014) Site-specific activation of AKT protects cells from death induced by glucose deprivation. *Oncogene* **33**, 745–755.
- 38 Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314.
- 39 Bensaad K, Cheung EC and Vousden KH (2009) Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *EMBO J* **28**, 3015–3026.
- 40 Yu HP, Xie JM, Li B, Sun YH, Gao QG, Ding ZH, Wu HR and Qin ZH (2015) TIGAR regulates DNA damage and repair through pentosephosphate pathway and Cdk5-ATM pathway. *Sci Rep* **5**, 9853.
- 41 Kodiha M, Banski P and Stochaj U (2009) Interplay between MEK and PI3 kinase signaling regulates the subcellular localization of protein kinases ERK1/2 and Akt upon oxidative stress. *FEBS Lett* **583**, 1987–1993.
- 42 Garcia-Cao I, Song MS, Hobbs RM, Laurent G, Giorgi C, de Boer VC, Anastasiou D, Ito K, Sasaki AT, Rameh L *et al.* (2012) Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell* **149**, 49–62.
- 43 Makinoshima H, Takita M, Saruwatari K, Umemura S, Obata Y, Ishii G, Matsumoto S, Sugiyama E, Ochiai A, Abe R *et al.* (2015) Signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/mammalian target of rapamycin (mTOR) axis is responsible for aerobic glycolysis mediated by glucose transporter in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung adenocarcinoma. *J Biol Chem* **290**, 17495–17504.

## Gene Section

### Review

# PFKFB2 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2)

Ana Rodríguez-García, Pere Fontova, Helga Simon, Anna Manzano, Ramon Bartrons, Àurea Navarro-Sabaté

Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain (ARG, PF, HS, AM, RB, ÀNS)

Published in Atlas Database: March 2014

Online updated version : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/PFKFB2ID52100ch1q32.html>  
DOI: 10.4267/2042/54168

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 France Licence. © 2014 Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

## Abstract

Review on PFKFB2, with data on DNA/RNA, on the protein encoded and where the gene is implicated.

## Identity

**Other names:** PFK-2/FBPase-

**2 HGNC (Hugo):** PFKFB2

**Location:** 1q32.2 **Local order**

The human PFKFB2 gene is located on the chromosome 1 at position 1q31-q32.2 (GeneCards) (Fig. 1).

## DNA/RNA

### Description

The human PFKFB2 is composed of 15 exons

spanning 22617 bp (GenBank: AJ005577.1). This gene has 9 transcripts; two of them have been reported to codify a protein and three contain an open reading frame, but no protein has been identified. The transcripts are derived from different promoters and vary only in non-coding sequences at the 5' end. Therefore, the resulting proteins differ in their C-terminal amino acid sequence (Heine-Suñer et al., 1998).

The main products of the gene correspond to mRNAs of 7073 bp and 3529 bp for the variant 1 (isoform a; NM\_006212.2) and variant 2 (isoform b; NM\_001018053.1), respectively (Fig. 2). The isoform b differs in the 3' UTR and the coding region compared to isoform a. The resulting isoform b is shorter and has a distinct C-terminus compared to isoform a. However, it is not known how these different 5' ends are related to the three mRNAs (H1, H2 and H4) that encode the isoform a or the H3 mRNA that encodes the isoform b. None of these mRNAs are strictly heart-specific.

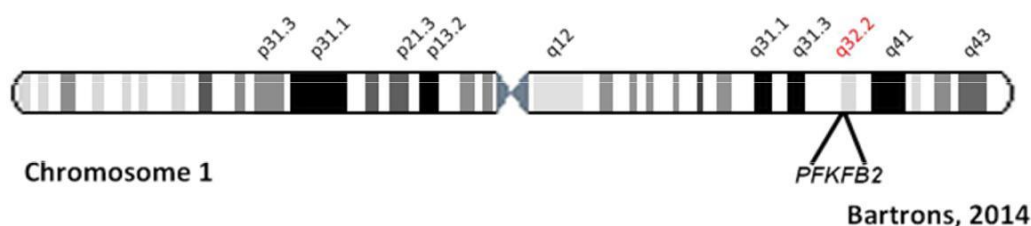
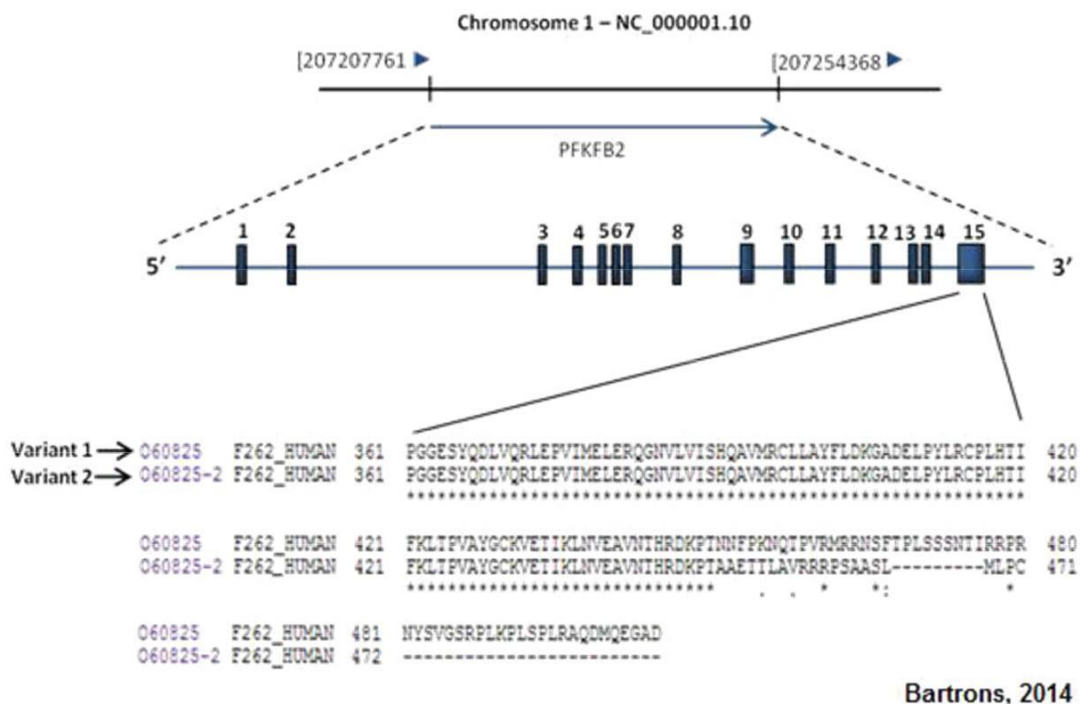


Figure 1. Localization of human PFKFB2 gene.



**Figure 2.** Schematic representation of the location of PFKFB2 gene in chromosome 1 and its structural organization. Description of the exon/intron splice junctions. Exon sequences are shown in vertical bars numbered 1-15. The sequences of O60825 and O60825-2 correspond to variant 1 and variant 2, respectively (NCBI).

The overall gene structure of the human PFKFB2 gene has exons clustered into three groups. The first group contains exons 1 and 2 that are different from those in other PFKFB2 genes and contain the ATG initiation codon in exon 2. The second group contains exons 3-8 coding for the PFK-2 domain and the third group contains exons 8-15 coding for the FBPase-2 domain and a carboxy-terminal regulatory domain. Gene structure, exon-intron organization, as well as intron sizes, are similar to those of the rat and bovine homologous genes.

### Transcription

The human PFKFB2 coding sequence consists of 1518 bp for isoform a and 1416 bp for isoform b from the start codon to the stop codon, although the immature transcript forms contain 7904 bp and 3494 bp, respectively. Multiple alternatively spliced transcript variants have been described for this gene (Ensembl: OTTHUMG00000036033).

### Pseudogene

No pseudogene of PFKFB2 is known.

## Protein

### Description

PFKFB2 is a homodimeric protein of 505 amino acids for isoform a and 471 for isoform b with a deduced molecular mass of 58 kDa and 54 kDa, respectively.

PFKFB2 is an enzyme of PFKFB family, as it shares different structure and function with the others isoenzymes.

PFKFB2 has two distinct catalytic sites in each subunit: one for the 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) activity and the other for the fructose-2,6-bisphosphatase (FBPase-2) activity (El-Maghrabi et al., 1982; Pilkis et al., 1995; Okar et al., 2001).

The sequence of the catalytic core is highly conserved, whereas the N-terminal and C-terminal regions show more divergence (Rider et al., 2004). PFK-2/FBPase-2 activities control fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) synthesis and degradation, regulating the rate of glucose metabolism.

More information about PFKFB2 protein can be found in Uniprot O60825.

### Expression

PFKFB2 protein is expressed mainly in heart, although expression is also found in other tissues at lesser extent (Minchenko et al., 2002). Moreover, it is expressed in different cancer cell lines such as T-lymph Jurkat, K562 erythroleukemia, liver HepG2, lung A549, colon RKO, bone U2OS, brain GAMG, prostate LnCap, cervix HeLa and breast MCF7. All this information can be found in GeneCards (sections proteins and expression).

According to the RNAseq database, this gene can also be expressed in thyroid, brain, kidney, skeletal muscle, ovary, testis and others.

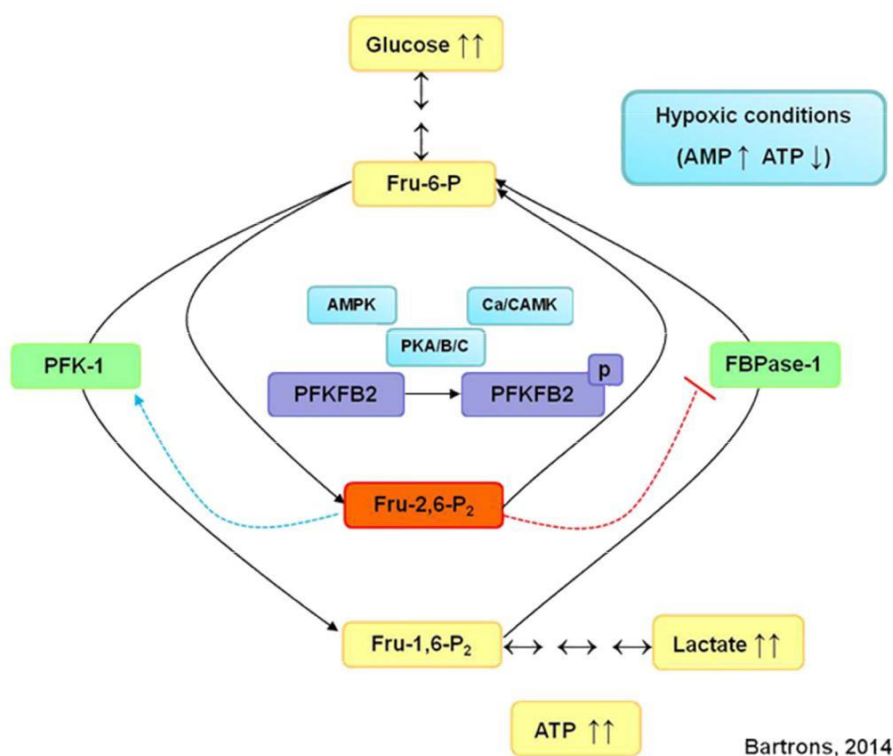


Figure 3. PFKFB2 activities and function in the glycolytic pathway in heart during hypoxia.

### Localisation

PFKFB2 protein is active in the cytosol.

### Function

This enzyme regulates the concentration of Fru-2,6-P<sub>2</sub> through the two catalytic domains. PFK-2 domain catalyzes the synthesis of Fru-2,6-P<sub>2</sub>, using fructose-6-phosphate (Fru-6-P) and adenosine-5-triphosphate (ATP) as substrates; FBPase-2 domain catalyzes the degradation of Fru-2,6-P<sub>2</sub> into Fru-6-P and inorganic phosphate (Pi). These two mutually opposing catalytic activities are controlled by different mechanisms such that each activity is predominant in a given physiological condition. In detail, the reactions catalyzed are:

Kinase catalytic activity:  $\text{ATP} + \text{D-fructose-6-phosphate} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{beta-D-fructose-2,6-bisphosphate}$

Phosphatase catalytic activity:  $\text{Beta-D-fructose-2,6-bisphosphate} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{D-fructose-6-phosphate} + \text{phosphate}$

The rate of glycolytic flux is controlled at different levels and by different mechanisms: substrate availability, enzyme concentrations, allosteric effectors and covalent modifications on regulatory enzymes. One of the critically modulated steps is that catalyzed by 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1), in which Fru-2,6-P<sub>2</sub> is the most powerful allosteric activator (Van Schaftingen, 1987; Okar and Lange, 1999; Rider et al., 2004). Fru-2,6-P<sub>2</sub> relieves ATP inhibition and acts synergistically

with adenosine monophosphate (AMP), inhibiting fructose 1,6-bisphosphatase (Fru-1,6-Pase) (Van Schaftingen, 1987). These properties confer to this metabolite a key role in the control of Fru-6-P/Fru-1,6-P<sub>2</sub> substrate cycle and hence critically regulates carbohydrate metabolism (Fig. 3).

In vertebrates, there are four different PFKFB genes (PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 and PFKFB4), which encode the PFK-2/FBPase-2 isoenzymes. Each of these enzymes has been originally identified in different mammalian tissues: PFKFB1 in liver and skeletal muscle, PFKFB2 in heart, PFKFB3 in brain, adipose tissue and proliferating cells, and PFKFB4 in testis (Okar et al., 2004; Rider et al., 2004). However, all four are widely expressed throughout the adult organism. These isoenzymes show differences in their distribution and kinetic properties in response to allosteric effectors, hormonal, and growth factors signals (Okar et al., 2001). PFKFB2 enzyme is overexpressed in different cancer cells like melanoma, prostate, pancreatic, gastric and mammary gland cells (Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005b; Bobarykina et al., 2006). For more information about PFKFB genes see: PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3) and PFKFB4 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4).

### Regulation

PFKFB2 is an essential enzyme for the regulation of glycolysis in heart. PFKFB2 is multisite-

phosphorylated, integrating signaling from many pathways via protein kinase cascades to a single molecule, Fru-2,6-P<sub>2</sub>, to stimulate glycolysis.

The human PFKFB2 protein contains the Ser 29, Ser 466, Thr 475 and Ser 483 residues that regulate the activity of the enzyme. These residues are located in its C-terminal domain and can be phosphorylated by protein kinases such as AMPK, 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1), cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A; PKA), protein kinase B (PKB; also known as Akt), p70 ribosomal S6 kinase (S6K1), and mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK-1). Phosphorylation of PFKFB2 results in the activation of the enzyme, increasing V<sub>max</sub> of PFK-2 activity. The variations in PFK-2 activity, however, appear to be different with the phosphorylation by the different kinases (Marsin et al., 2000; Rider et al., 2004).

In perfused rat hearts, it has been shown that the concentration of Fru-2,6-P<sub>2</sub> is raised by increasing the work load, after hypoxia or stimulation with adrenalin or insulin (Hue et al., 1982; Rider and Hue, 1984; Depre et al., 1993; Deprez et al., 1997). This activation is probably mediated by the phosphorylation of three conserved residues (Ser 466, Thr 475 and Ser 483) by specific protein kinases (Depre et al., 1993; Deprez et al., 1997).

Insulin stimulates glycolysis in heart by a combination of an increase in glucose transport and activation of PFKFB2 (Depré et al., 1998; Hue et al., 2002). Two serine residues, Ser 466 and Ser 483 can be phosphorylated in vitro by PKB in response to insulin resulting from a 2-fold increase in both V<sub>max</sub> and affinity for Fru-6-P, one of the substrates of PFK-2 (Lefebvre et al., 1996; Deprez et al., 1997).

Rat heart PFKFB2 is activated by insulin in vivo through a 2-fold increase in V<sub>max</sub> with no change in K<sub>m</sub> for Fru-6-P (Rider and Hue, 1984). Moreover, it has been shown that the insulin-induced activation of PFKFB2 was blocked by wortmannin, a PI3K inhibitor, but was insensitive to rapamycin or PD098059, which prevent the activation of p70<sup>S6K</sup> and the MAPK cascade, respectively (Lefebvre et al., 1996). These results suggest that PI3K, but not p70<sup>S6K</sup>, is involved in the activation of PFKFB2 in response to insulin. New in vitro and in vivo experiments show that SGK3 is not required for insulin-induced heart PFK-2 activation and this effect is likely mediated by PKB $\alpha$  (Mouton et al., 2010). Moreover, it has been proposed that 14-3-3s, that have been implicated in promoting cell survival (Masters et al., 2002), bind to PFK-2 at Ser 483 when it is phosphorylated by PKB in vitro in response to insulin or in cells that are stimulated with IGF-1 or transfected with active forms of PKB, mediating the stimulation of glycolysis by growth factors (Pozuelo et al., 2003).

Glycolysis in heart also increases in response to increased the workload (Depre et al., 1993; Beauloye et al., 2002), rising Fru-2,6-P<sub>2</sub> due to the activation of PFKFB2. The increase on workload activates PKB but not p70<sup>S6K</sup> and this increase is blocked by wortmannin and is rapamycin-insensitive. Ca/CAMK (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-activated protein kinase) is which phosphorylates and activates PFKFB2 secondarily to a rise in cytoplasmatic Ca<sup>2+</sup> (Depre et al., 1993; Beauloye et al., 2002).

Adrenalin administration in perfused rat hearts suggests that PKA may be responsible for the activation of PFKFB2, which accounts for the increased Fru-2,6-P<sub>2</sub> levels (Narabayashi et al., 1985). This hormone promotes PFKFB2 phosphorylation by PKA in the residues already described in vitro, which are Ser 466 and Ser 483. These phosphorylations have an impact on PFK-2 activity, decreasing the K<sub>m</sub> for Fru-6-P (Kitamura et al., 1988; Rider et al., 1992a; Rider et al., 1992b).

PFKFB2 mRNA is induced in organs exposed to hypoxic conditions. Activation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) during ischemia or hypoxia leads to phosphorylation of PFKFB2 at Ser 466 which increases the levels of Fru-2,6-P<sub>2</sub> and stimulates glycolysis. PFKFB2 phosphorylation leads to an increase in V<sub>max</sub> with no change in K<sub>m</sub> for Fru-6-P (Marsin et al., 2000). Other studies have described PFKFB2 as a hypoxia-responsive gene in vivo but the regulation of its expression following hypoxic treatments appears to occur in a cell-specific manner. The mechanism underlying the expression of each isoform in different tissues remains unclear (Minchenko et al., 2002).

Moreover, amino acids increase the synthesis of Fru-2,6-P<sub>2</sub> in HeLa and MCF7 cell lines by phosphorylation at PFKFB2 at Ser 483. This activation is mediated by PI3K and PKB. Similar effects on Fru-2,6-P<sub>2</sub> metabolism were observed in freshly isolated rat cardiomyocytes treated with amino acids, which indicates that these effects are not restricted to human cancer cells. In these cardiomyocytes, PFKFB2 phosphorylation increases glucose consumption and the production of lactate and ATP (Novellademunt et al., 2013).

PFKFB2 is also a substrate of PKC which phosphorylates Ser 84, Ser 466 and Thr 475 (Rider and Hue, 1986; Kitamura et al., 1988; Rider et al., 1992a; Rider et al., 1992b). However, the physiological significance of phosphorylation of Ser 84, Ser 466 and Thr 475 of PFKFB2 by PKC is not completely understood. It seems that phosphorylation of Ser 466 or Thr 475 does not change the enzyme activity. This might be due to the fact that the phosphorylation at Ser 84 possibly counteracts the effects of phosphorylation at the activating C-terminal sites (Kitamura et al., 1988; Rider et al., 1992b).

The mechanism of control of PFKFB2 isoenzyme by phosphorylation is also difficult to explain in the absence of a crystal structure of the phosphorylated isoenzyme. Phosphorylation of Ser 466 and Ser 483 at the C-terminal end of the bovine heart isoenzyme by PKA (Kitamura et al., 1988; Rider et al., 1992a; Rider et al., 1992b; Deprez et al., 1997) and insulin-stimulated protein kinases (Deprez et al., 1997) activates PFK-2 by decreasing  $K_m$  for Fru-6-P and by increasing the  $V_{max}$  without affecting FBPase-2. Ser 466 phosphorylation is responsible for the increase in  $V_{max}$  whereas both phosphorylations are necessary to decrease the  $K_m$  for Fru-6-P (Bertrand et al., 1999).

Regulatory sequences that account for some of the mechanisms involved in the long-term hormonal control and tissue-specific expression of PFKFB2 have been identified. The 5' flanking sequence of PFKFB2 contains regions that are conserved between the human, bovine and rat genes. In these regions, several potential binding sites for the Sp1, HNF-1 and BHLH (helix-loop-helix) (E boxes) transcription factors and for the GR have been described (Tsuchiya and Uyeda, 1994; Chikri and Rousseau, 1995; Heine-Suñer et al., 1998), but a factor binding to these sites has not been reported.

**Chromosomal rearrangements: copy number variants**

There are three alterations affecting PFKFB2 genome region described in patients. One of them, the gain of 1:195266734-216326885, shows phenotypic effects such as visual impairment, low-set ears, iris coloboma, intellectual disability, defect in the atrial septum, ventricular septal defect and vertical nystagmus. For more information see DECIPHER.

No syndrome or disease was found in OMIM

database.

**Homology**

Location in the mouse: chromosome 1, 56,89 cM, cytoband E4, 130689043-130729253 bp, complement strand (MGI).

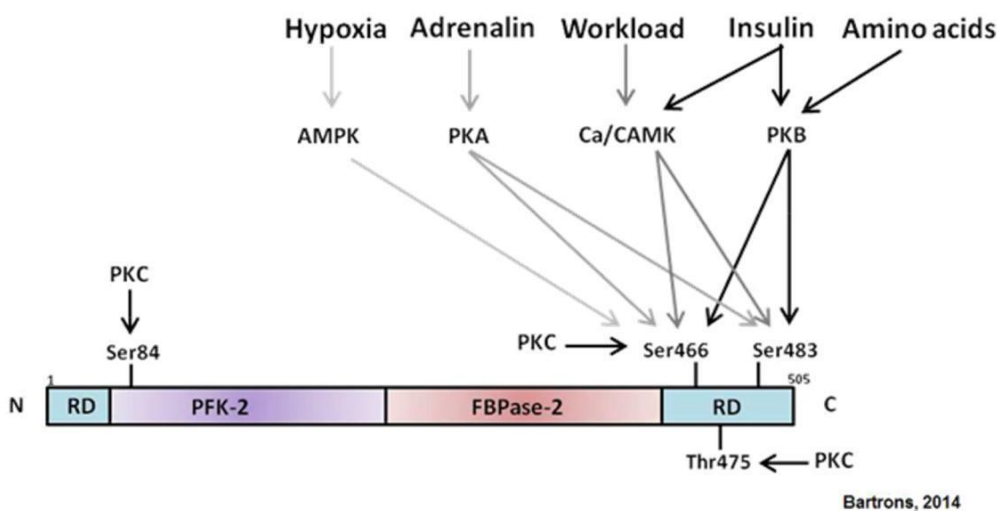
For a comparison of the gene from Homo sapiens, mouse, rat, cattle, chimpanzee, chicken, zebrafish, rhesus macaque and dog see MGI.

Also for all species known gene tree, see Treefam database.

It appears that the use of Fru-2,6-P<sub>2</sub> as a regulatory metabolite is a specifically eukaryotic phenomenon. The most plausible hypothesis for the origin of the PFK-2/FBPase-2 would be the fusion of two ancestral genes coding for a kinase functional unit and a phosphohydrolase/mutase unit, respectively. From protein sequence alignments, it is clear that the bisphosphatase activity located in the C-terminal domain of the PFK-2/FBPase-2, the phosphoglycerate mutases (PGAMs) and the acid phosphatase family diverged from a common ancestor (Jedrzejewski, 2000; Okar et al., 2001). Alignments of the bisphosphatase domain with PGM and acid phosphatase can be obtained at EBI. On the other hand, PFK-2 domain is related to a superfamily of mononucleotide binding proteins including adenylate kinase (AK) of E. coli., p21 Ras, EF-tu, the mitochondrial ATPase-β-subunits and myosin ATPase, all of them contain the Walker A and B motifs and have a similar fold (Rider et al., 2004).

**Orthologs (from BLAST Local Alignment Tool)**

Results from BLAST Local Alignment Tool are shown in Figure 5. Only the annotated proteins are reported, the predicted proteins appearing in the local alignment were excluded.



**Figure 4.** Domain organization and phosphorylation of PFKFB2 isoenzyme. The N-terminal PFK-2 domain is shown in violet, the C-terminal FBPase-2 domain is shown in red and the regulatory domains are shown in blue. Phosphorylation sites, the stimuli and the kinases responsible of their phosphorylation are indicated.

Specie	Gene	Query cover	E value	Identity
Pongo abelii	PFK/FBPase 2	99%	0.0	99%
Bos taurus	PFK/FBPase 2	100%	0.0	94%
Rattus norvegicus	PFK/FBPase 2 isoform a	97%	0.0	95%
Mus musculus	PFK/FBPase 2 isoform 1	99%	0.0	93%
Rattus norvegicus	PFK/FBPase 2 isoform b	97%	0.0	95%
Pan troglodytes	PFK/FBPase 2	89%	0.0	99%
Macaca mulatta	PFK/FBPase 2	89%	0.0	99%
Mus musculus	PFK/FBPase 2 isoform 3	99%	0.0	89%
Xenopus (Silurana) tropicalis	PFK/FBPase 2	95%	0.0	85%
Mus musculus	PFK/FBPase 2 isoform 2	88%	0.0	93%
Rattus norvegicus	PFK/FBPase 2 isoform c	88%	0.0	93%
Macaca fascicularis	LOC101865223 uncharacterized protein	82%	0.0	99%
Danio rerio	PFK/FBPase 2 isoform a	94%	0.0	78%

Figure 5. Orthologs for PFKFB2 gene from BLAST Local Alignment Tool.

Comparison of the PFKFB2 cDNA sequence with the bovine and rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) heart isoforms shows 87-90% nucleotide and 92-95% amino acid identity (Sakata and Uyeda, 1990; Darville et al., 1991).

## Mutations

### Note

#### Genomic variants

There are 647 SNP variants described in PFKFB2 (see GeneCards).

The most SNP are found in non coding regions: 418 are presented in introns, 3 in splice donor variant, 107 in 3' UTR and 25 variant within a half kb of the end of gene and others.

Furthermore, 61 SNP are presented with the coding regions. The most of them are missense (31 variants) and also synonymous variants (19 variants) and only one frameshift.

#### Somatic

49 somatic mutations in the PFKFB2 gene detected

in patient tumor samples are collected in the COSMIC database.

Coding silent substitutions: 20, which represent 40.8% of the mutations described among all patients. Two of them have been found in two patients: c.1008C>G (p.T336T) and c.1419G>A (p.S473S). Nonsense substitutions: 1, located in c.1051C>T (p.R351\*).

Missense substitutions: 23, which represent 46.9% of the mutations described among all patients.

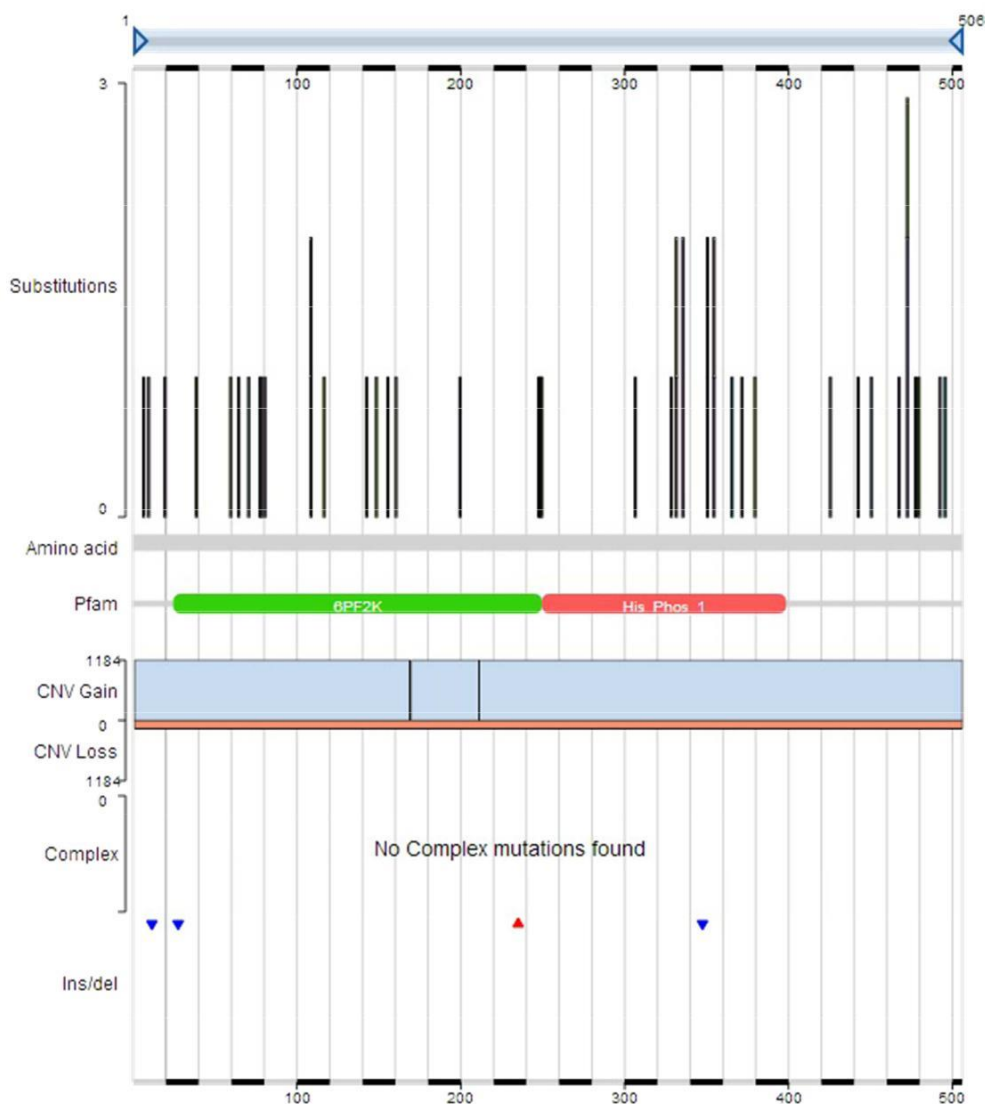
Deletions frameshift: 1, located in c.1044delT (p.F348fs\*66).

Insertion frameshift: 1, located in c.703\_407insT (p.Q235fs\*37).

Deletion inframe: 2, located in c.28\_30delAAC (p.N12delN) and in in c.82\_84delTGT (p.C28delC).

Unknown mutation: 2, one of them located in c.376-2A>T and the other in c.840+1G>A.

No synonymous substitutions or chromosomal fusions in PFKFB2 gene have been described in any tumor sample.



**Figure 6.** Histogram of mutations found among the amino acid sequence of PFKFB2 protein. The maximum number of substitutions at any specific genomic region is represented in Y axis. 6-phosphofructo-2-kinase and histidine phosphatase superfamily domains are represented in green and red respectively. From: COSMIC Database.

## Implicated in

### Various cancers

#### Oncogenesis

Cancer cells energy metabolism is characterized by a high glycolytic rate, which is maintained under aerobic conditions, when compared to non-malignant cells. The concentration of Fru-2,6-P<sub>2</sub> is generally increased due to overexpression and activation of PFK-2. Adrenaline, insulin, hypoxia and workload stimulate heart glycolysis by activating PFKFB2, hence producing a subsequent rise in Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration (Marsin et al., 2000; Rider et al., 2004).

Hypoxia is an important component of the tumor microenvironment. One key mediator of the hypoxic response in animal cells is the hypoxia-inducible factor (HIF) complex, a transcription

factor frequently deregulated in cancer cells that induces the expression of glycolytic genes (Bartrons and Caro, 2007).

In culture cells, hypoxia induces PFKFB2 in HeLa and MCF7 cells. These data demonstrate that PFKFB2 is one of the responsive to hypoxia in vivo, indicating a physiological role in the adaptation of the organism to environmental or localized hypoxia/ischemia. Marsin et al. (2000) showed that AMPK phosphorylates PFKFB2 at Ser 466 in hypoxia conditions and this could contribute to maintain the high glycolytic rate that is a characteristic feature of many tumors.

### Acute lymphoblastic leukemia

#### Note

Alterations in glucose metabolism have been implicated in cell death and survival decisions, particularly in the lymphoid lineage (Plas et al.,



2002) and in transformed cells (Tennant et al., 2010).

PFKFB2 was identified by microarray analysis of lymphoblasts isolated from glucocorticoid-treated children suffering from ALL (acute lymphoblastic leukemia) as one of the most promising candidate genes as a glucocorticoid (GC)-response gene, since it was regulated in the majority of patients. Its deregulation was proposed to entail disturbances in glucose metabolism which, in turn, have been implicated in cell death induction (Schmidt et al., 2006). These data suggest that cellular metabolism and apoptosis might be intertwined with connections between regulation of cellular bioenergetics and apoptosis. Carlet et al. (2010) demonstrated that both splice variants of PFKFB2 are expressed and specifically induced by GC in malignant lymphoid cells, however, functional analysis of this gene in the human T-ALL cell line model CCRF-CEM revealed that its over-expression does not explain the anti-leukemic effects of GC.

### **Prostate cancer**

#### **Note**

In the early stages of prostate cancer, the androgen receptor (AR) is one of the key regulators that mediates tumor growth, promoting glucose uptake and anabolic metabolism, and modulates gene expression. Massie et al. (2011), using multiple metabolomic approaches, demonstrated that PFKFB2 is up-regulated as a consequence of the transcriptional changes by AR, with possible control through the AR-CAMKII-AMPK signaling pathway.

Other studies performing microarray analysis, using total RNA isolated from LNCaP cells treated with or without R1881 (methyltrienolone), a synthetic androgen, showed that androgens induce PFKFB2 expression in LNCaP cells (androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells) by the direct recruitment of the ligand-activated AR to the PFKFB2 promoter. Moreover, depletion of PFKFB2 expression using siRNA (small interfering RNA) or inhibiting the PFK-2 activity with LY294002 (inhibitor of PI3K) treatment resulted in a reduced glucose uptake and lipogenesis, suggesting that the induction of de novo lipid synthesis by androgens requires the transcriptional up-regulation of PFKFB2 in prostate cancer cells (Moon et al., 2011).

### **Gastric cancer**

#### **Note**

PFKFB2 mRNA expression is increased in malignant gastric tumors as well as the expression of known HIF-1-dependent genes, Glut1 (glucose transporter 1) and VEGF (vascular endothelial growth factor), supporting the HIF-dependent

character of the induction of expression of the PFKFB2 (Bobarykina et al., 2006).

### **Hepatocellular cancer**

#### **Note**

In immunohistochemistry samples of hepatocellular carcinoma, it has been recently found that high expression of MACC1 (metastasis associated in colon cancer 1), a key regulator of the HGF/Met-pathway, correlates with high expression of PFKFB2. This correlation has an effect on TNM stage (classification of malignant tumors), overall survival and Edmondson-Steier classification (Ji et al., 2014).

### **Papillary thyroid cancer**

#### **Note**

The extent and presentation of papillary thyroid cancer (PTC) in adolescents and young adults (AYAs) is different than in older patients. This difference may be due to several candidate genes that are differentially expressed and which may have important roles in tumor cell biology. One of these genes is PFKFB2 but future functional genomics studies are needed to shed further light on whether a biologic basis exists to account for the disparity in AYA cancer incidence and outcome (Vriens et al., 2011).

### **Heart diseases**

#### **Note**

In the heart, acute ischemia induces rapid activation of AMPK which phosphorylates Ser 466 leading to a two-fold increase in the  $V_{max}$  of PFKFB2 (Hue et al., 2002). mRNA analysis indicated that PFKFB2 is expressed at high levels not only in the heart but also in the brain and lungs. However, in vivo experiments showed that hypoxia induce moderate expression in the lung and liver and very strong stimulation in the testis. No induction or even mild inhibition was found in the heart, kidney, brain and skeletal muscle. Myocardial ischemia induces a shift to anaerobic metabolism, with a rapid stimulation of glycolysis (Wang et al., 2008).

Tetralogy of Fallot (TOF) is a heart defect in children that results in chronic progressive right ventricular pressure overload and shunt hypoxemia. Western blot, RT-qPCR (real time PCR) and immunohistochemical analysis revealed that PKFB2 expression and mRNA of PFKFB2 increased significantly in TOF patients.

Like tumors, under pathological stress conditions, cardiomyocytes gradually come to rely on glycolysis to satisfy their main energy requirements.

That is why these results suggest that PFKFB2 plays an important role in certain biological processes related to cardiac remodeling, which occurs in response to chronic hypoxia and long-

term pressure overload in TOF patients (Xia et al., 2013).

Glycolysis increases in cognitive heart failure (CHF), cardiac hypertrophy and cardiac ischemia (Neely et al., 1975).

Some studies producing mice with chronic and stable elevation of cardiac Fru-2,6-P<sub>2</sub> showed significant change in cardiac metabolite concentrations, increased glycolysis, reduced palmitate oxidation and protection of isolated myocytes from hypoxia.

Taken together, these results show that PFKFB2 is one of the enzymes that control cardiac glycolysis, producing an increase in Fru-2,6-P<sub>2</sub>, causing detrimental effects and suggesting that the elevation of glycolysis in failing hearts could be injurious to an already compromised heart (Wang et al., 2008).

### **Inflammation**

#### **Note**

It has been shown that purified human CD3+ T cells express PFKFB2 (Telang et al., 2012).

CCL5 (proinflammatory chemokine) treatment of ex vivo activated human CD3+ T cells induced the activation of the nutrient-sensing kinase AMPK and downstream substrates like PFKFB2, suggesting that both glycolysis and AMPK signaling are required for efficient T cell migration in response to CCL5, relating therefore PFKFB2 with T-cell activation and migration (Chan et al., 2012).

### **Mental disorders**

#### **Note**

Schizophrenia presents impaired glucose regulation. Stone et al. (2004), using a genome scan, found that PFKFB2 shows linkage with schizophrenia in a multiple sample of subjects (European-American samples).

However, it is necessary to replicate these results with other samples and if PFKFB2 contributes on the liability for schizophrenia, its influence is likely to be modest, as most cases of schizophrenia are likely to result from multiple factors.

### **Growth restriction and development**

#### **Note**

Infants with intrauterine growth restriction (IUGR) have a low weight at birth as a result of pathologic restriction of fetal growth (Wollmann, 1998). cDNA microarrays, RT-qPCR and Western blot analysis revealed that PFKFB2 expression increases in placentas from pregnancies with IUGR causing hypoglycemia.

However, further studies have to be performed in order to elucidate the role of PFKFB2 in glucose metabolism on IUGR placenta (Lee et al., 2010).

## **References**

- Neely JR, Whitmer JT, Rovetto MJ. Effect of coronary blood flow on glycolytic flux and intracellular pH in isolated rat hearts. *Circ Res.* 1975 Dec;37(6):733-41
- El-Maghrabi MR, Claus TH, Pilkis J, Fox E, Pilkis SJ. Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem.* 1982 Jul 10;257(13):7603-7
- Hue L, Blackmore PF, Shikama H, Robinson-Steiner A, Exton JH. Regulation of fructose-2,6-bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts, and perfused hindlimbs. *J Biol Chem.* 1982 Apr 25;257(8):4308-13
- Rider MH, Hue L. Activation of rat heart phosphofructokinase-2 by insulin in vivo. *FEBS Lett.* 1984 Oct 29;176(2):484-8
- Narabayashi H, Lawson JW, Uyeda K. Regulation of phosphofructokinase in perfused rat heart. Requirement for fructose 2,6-bisphosphate and a covalent modification. *J Biol Chem.* 1985 Aug 15;260(17):9750-8
- Van Schaftingen E. Fructose 2,6-bisphosphate. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1987;59:315-95
- Kitamura K, Kangawa K, Matsuo H, 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.* 1988 Nov 15;263(32):16796-801
- Sakata J, Uyeda K. Bovine heart fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: complete amino acid sequence and localization of phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jul;87(13):4951-5
- Darville MI, Chikri M, Lebeau E, Hue L, Rousseau GG. A rat gene encoding heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* 1991 Aug 19;288(1-2):91-4
- Rider MH, Vandamme J, Lebeau E, Vertommen D, Vidal H, Rousseau GG, Vandekerckhove J, Hue L. The two forms of bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase result from alternative splicing. *Biochem J.* 1992 Jul 15;285 ( Pt 2):405-11
- Rider MH, van Damme J, Vertommen D, Michel A, Vandekerckhove J, 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.* 1992 Sep 28;310(2):139-42
- Depre C, Rider MH, Veitch K, Hue L. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of heart glycolysis. *J Biol Chem.* 1993 Jun 25;268(18):13274-9
- Tsuchiya Y, Uyeda K. Bovine heart fructose 6-P<sub>2</sub>, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase mRNA and gene structure. *Arch Biochem Biophys.* 1994 May 1;310(2):467-74
- Chikri M, Rousseau GG. Rat gene coding for heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: characterization of an unusual promoter region and identification of four mRNAs. *Biochemistry.* 1995 Jul 11;34(27):8876-84
- Pilkis SJ, Claus TH, Kurland IJ, Lange AJ. 6-

- Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:799-835
- Lefebvre V, Méchin MC, Louckx MP, Rider MH, Hue L. Signaling pathway involved in the activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by insulin. *J Biol Chem.* 1996 Sep 13;271(37):22289-92
- Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH. 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.* 1997 Jul 11;272(28):17269-75
- Depré C, Rider MH, Hue L. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem.* 1998 Dec 1;258(2):277-90
- Heine-Suñer D, Díaz-Guillén MA, Lange AJ, Rodríguez Córdoba S. Sequence and structure of the human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase heart isoform gene (PFKFB2). *Eur J Biochem.* 1998 May 15;254(1):103-10
- Wollmann HA. Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Horm Res.* 1998;49 Suppl 2:1-6
- Bertrand L, Alessi DR, Deprez J, Deak M, Viaene E, Rider MH, Hue L. Heart 6-phosphofructo-2-kinase activation by insulin results from Ser-466 and Ser-483 phosphorylation and requires 3-phosphoinositide-dependent kinase-1, but not protein kinase B. *J Biol Chem.* 1999 Oct 22;274(43):30927-33
- Okar DA, Lange AJ. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors.* 1999;10(1):1-14
- Jedrzejas MJ. Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase. *Prog Biophys Mol Biol.* 2000;73(2-4):263-87
- Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol.* 2000 Oct 19;10(20):1247-55
- Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabatè A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci.* 2001 Jan;26(1):30-5
- Beauloye C, Marsin AS, Bertrand L, Vanoverschelde JL, Rider MH, Hue L. The stimulation of heart glycolysis by increased workload does not require AMP-activated protein kinase but a wortmannin-sensitive mechanism. *FEBS Lett.* 2002 Nov 6;531(2):324-8
- Hue L, Beauloye C, Marsin AS, Bertrand L, Horman S, Rider MH. Insulin and ischemia stimulate glycolysis by acting on the same targets through different and opposing signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Sep;34(9):1091-7
- Masters SC, Subramanian RR, Truong A, Yang H, Fujii K, Zhang H, Fu H. Survival-promoting functions of 14-3-3 proteins. *Biochem Soc Trans.* 2002 Aug;30(4):360-5
- Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I, Sang N, Srinivas V, Armstead V, 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.* 2002 Feb 22;277(8):6183-7
- Plas DR, Rathmell JC, Thompson CB. Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications. *Nat Immunol.* 2002 Jun;3(6):515-21
- Pozuelo Rubio M, Peggie M, Wong BH, Morrice N, MacKintosh C. 14-3-3s regulate fructose-2,6-bisphosphate levels by binding to PKB-phosphorylated cardiac fructose-2,6-bisphosphatase kinase/phosphatase. *EMBO J.* 2003 Jul 15;22(14):3514-23
- Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J.* 2004 Aug 1;381(Pt 3):561-79
- Stone WS, Faraone SV, Su J, Tarbox SI, Van Eerdewegh P, Tsuang MT. Evidence for linkage between regulatory enzymes in glycolysis and schizophrenia in a multiplex sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004 May 15;127B(1):5-10
- Minchenko OH, Ogura T, Opentanova IL, Minchenko DO, Ochiai A, Caro J, Komisarenko SV, Esumi H. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in human lung tumor. *Ukr Biokhim Zh.* 2005;77(6):46-50
- Minchenko OH, Opentanova IL, Ogura T, Minchenko DO, Komisarenko SV, Caro J, Esumi H. Expression and hypoxia-responsiveness of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in mammary gland malignant cell lines. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(4):881-8
- Bobarykina AY, Minchenko DO, Opentanova IL, Moenner M, Caro J, Esumi H, Minchenko OH. 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.* 2006;53(4):789-99
- Schmidt S, Rainer J, Riml S, Ploner C, Jesacher S, Achmüller C, Presul E, Skvortsov S, Crazzolara R, Fiegl M, Raivio T, Jänne OA, Geley S, Meister B, Köfler R. Identification of glucocorticoid-response genes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2006 Mar 1;107(5):2061-9
- Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Jun;39(3):223-9
- Wang Q, Donthi RV, Wang J, Lange AJ, Watson LJ, Jones SP, Epstein PN. Cardiac phosphatase-deficient 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase increases glycolysis, hypertrophy, and myocyte resistance to hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Jun;294(6):H2889-97
- Carlet M, Janjetovic K, Rainer J, Schmidt S, Panzer-Grümayer R, Mann G, Prelog M, Meister B, Ploner C, Köfler R. Expression, regulation and function of phosphofructo-kinase/fructose-bisphosphatases (PFKFBs) in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *BMC Cancer.* 2010 Nov 23;10:638
- Lee MH, Jeon YJ, Lee SM, Park MH, Jung SC, Kim YJ. Placental gene expression is related to glucose metabolism and fetal cord blood levels of insulin and insulin-like growth factors in intrauterine growth restriction. *Early Hum Dev.* 2010 Jan;86(1):45-50
- Mouton V, Toussaint L, Vertommen D, Gueuning MA, Maisin L, Havaux X, Sanchez-Canedo C, Bertrand L, Dequiedt F, Hemmings BA, Hue L, Rider MH. Heart 6-phosphofructo-2-kinase activation by insulin requires PKB

(protein kinase B), but not SGK3 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 3). *Biochem J.* 2010 Oct 15;431(2):267-75

Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2010 Apr;10(4):267-77

Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, Boren J, Stark R, Fazli L, Warren A, Scott H, Madhu B, Sharma N, Bon H, Zecchini V, Smith DM, Denicola GM, Mathews N, Osborne M, Hadfield J, Macarthur S, Adryan B, Lyons SK, Brindle KM, Griffiths J, Gleave ME, Rennie PS, Neal DE, Mills IG. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J.* 2011 May 20;30(13):2719-33

Moon JS, Jin WJ, Kwak JH, Kim HJ, Yun MJ, Kim JW, Park SW, Kim KS. Androgen stimulates glycolysis for de novo lipid synthesis by increasing the activities of hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 in prostate cancer cells. *Biochem J.* 2011 Jan 1;433(1):225-33

Vriens MR, Moses W, Weng J, Peng M, Griffin A, Bleyer A, Pollock BH, Indelicato DJ, Hwang J, Kebebew E. Clinical and molecular features of papillary thyroid cancer in adolescents and young adults. *Cancer.* 2011 Jan 15;117(2):259-67

Chan O, Burke JD, Gao DF, Fish EN. The chemokine

CCL5 regulates glucose uptake and AMP kinase signaling in activated T cells to facilitate chemotaxis. *J Biol Chem.* 2012 Aug 24;287(35):29406-16

Telang S, Clem BF, Klarer AC, Clem AL, Trent JO, Bucala R, Chesney J. Small molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase suppresses T cell activation. *J Transl Med.* 2012 May 16;10:95

Novellademunt L, Tato I, Navarro-Sabate A, Ruiz-Meana M, Méndez-Lucas A, Perales JC, Garcia-Dorado D, Ventura F, Bartrons R, Rosa JL. Akt-dependent activation of the heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids. *J Biol Chem.* 2013 Apr 12;288(15):10640-51

Xia Y, Hong H, Ye L, Wang Y, Chen H, Liu J. Label-free quantitative proteomic analysis of right ventricular remodeling in infant Tetralogy of Fallot patients. *J Proteomics.* 2013 Jun 12;84:78-91

Ji D, Lu ZT, Li YQ, Liang ZY, Zhang PF, Li C, Zhang JL, Zheng X, Yao YM. MACC1 expression correlates with PFKFB2 and survival in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(2):999-1003

---

*This article should be referenced as such:*

Rodríguez-García A, Fontova P, Simon H, Manzano A, Bartrons R, Navarro-Sabaté À. PFKFB2 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2014; 18(11):838-848.

---



## Gene Section

### Review

# C12orf5 (chromosome 12 open reading frame 5)

Helga Simon, Ana Rodríguez-García, Àurea Navarro-Sabaté, Pere Fontova,  
Ramon Bartrons, Anna Manzano

Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Feixa  
Llarga s/n, 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain (HS, ARG, ÀNS, PF, RB, AM)

Published in Atlas Database: December 2013

Online updated version : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/C12orf5ID50684ch12p13.html>  
DOI: 10.4267/2042/53971

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 France  
Licence. © 2014 Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

## Abstract

Review on C12orf5, with data on DNA/RNA, on the protein encoded and where the gene is implicated.

## Identity

**Other names:** FR2BP, TIGAR

**HGNC (Hugo):** C12orf5

**Location:** 12p13.32

## DNA/RNA

### Description

The human TIGAR gene is composed of 6 exons spanning genomic region about 50,4 kb (GenBank

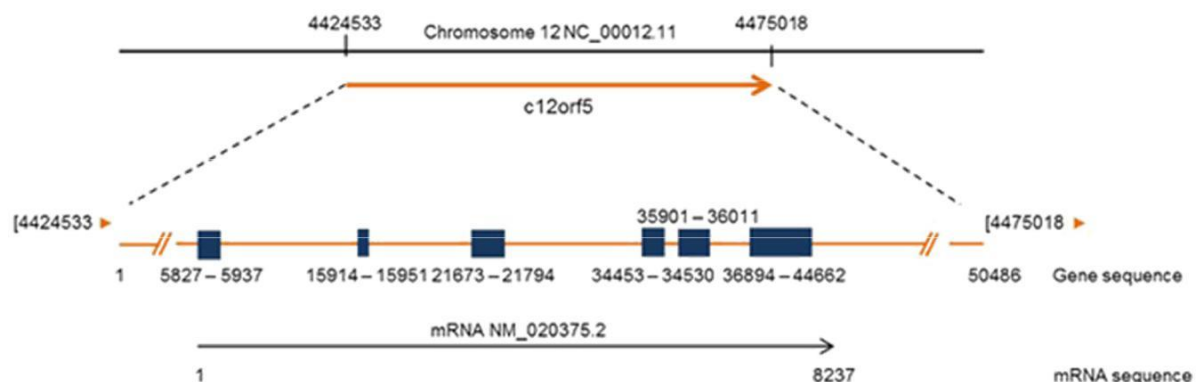
NC\_000012.11). The transcript mRNA is 8,2 kb (GenBank NM\_020375.2) and it is composed by the exon regions 5827..5937, 15914..15951, 21673..21794, 34453..34530, 35901..36011 and 36894..44662.

### Transcription

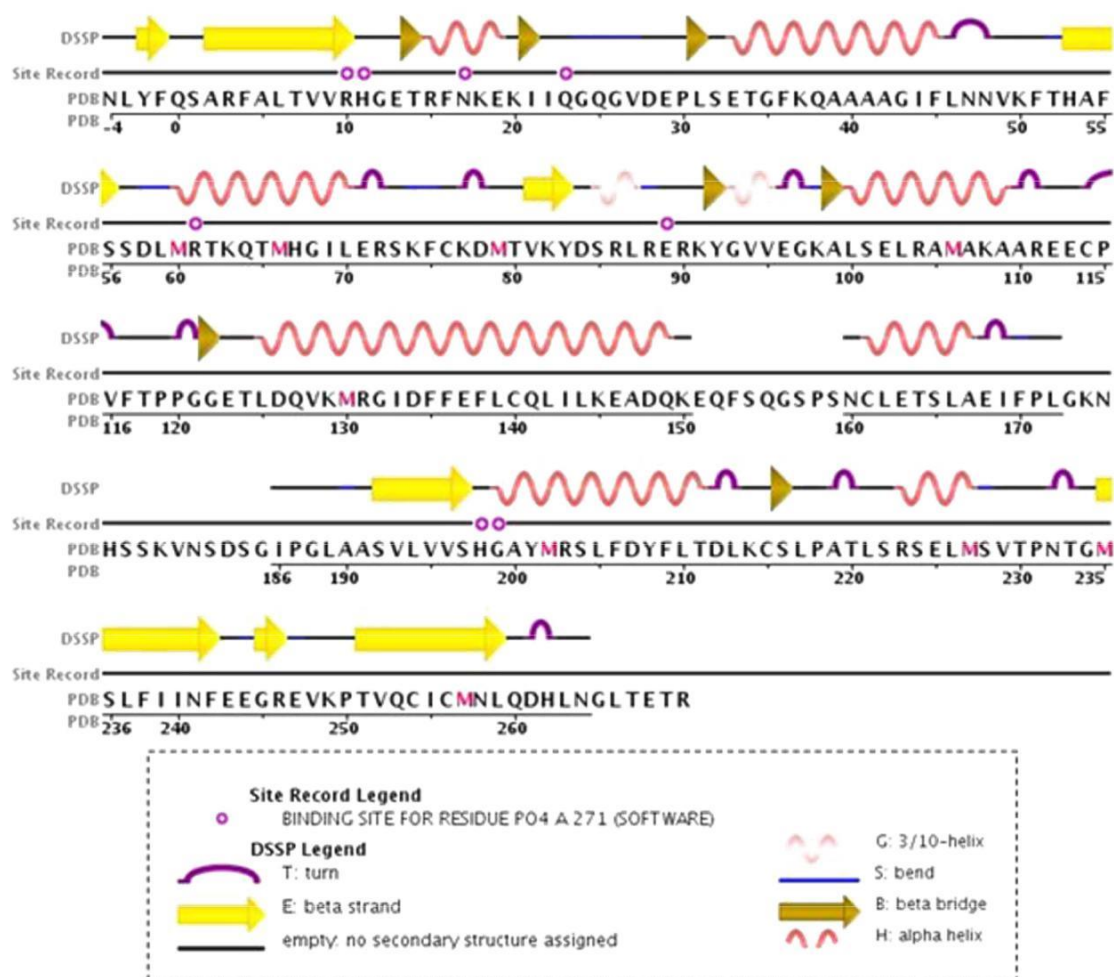
The human TIGAR coding sequence consists of 813 bp from the start codon to the stop codon. There are no splicing variants reported.

### Pseudogene

A pseudogene of the ribosomal protein S15 has been located in the region 8981..9473 by computational analysis using a gene prediction method, but there is not experimental data proving it.



**Figure 1.** Schematic representation of TIGAR location in chromosome 12, gene structure and transcript mRNA. Different numbering has been used considering chromosomal, gene or mRNA sequence.



**Figure 2.** Diagram of TIGAR structure from PDB (entry number: 3DCY). The PDF file does not contain information about the parts of the sequence that are not underlined.

## Protein

### Description

Human TIGAR protein consists of 270 aminoacids, with a molecular weight of 30063 Da.

It is composed of a bisphosphatase active site in which two histidines, His-11 and His-198, and one glutamic acid, Glu-102, are key residues for its function.

TIGAR catalytic domain belongs to the histidine phosphatase superfamily of proteins, a conserved group of proteins which contain a domain with a histidine forming a phosphoenzyme transiently during the catalysis (Rigden, 2008). This domain shares similarity with enzymes of the phosphoglycerate mutase family (PGAM) and with the bisphosphatase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2), in which the three aminoacids in the catalytic domain are conserved.

More information about TIGAR protein can be found in Uniprot Q9NQ88.

Human TIGAR structure contains different motifs as represented in the image below (PDB reference 3DCY).

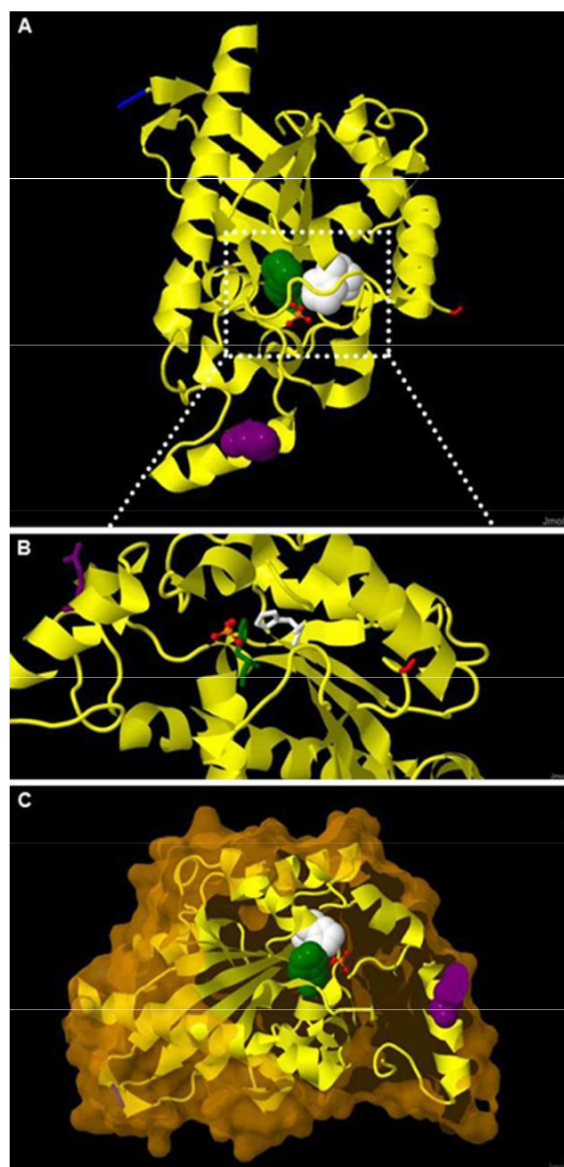
The crystallized structure of *Danio rerio* TIGAR is available in PDB (3E9D reference) and was published by Li and Jogl, 2009.

### Expression

TIGAR mRNA is expressed in all the tissues in which it has been analysed and it is overexpressed in several cancer cell lines such as T-lymph Jurkat cancer, kidney HEK-293, liver HuH-7 and HepG2, lung A549, colon RKO, bone U2OS, brain GAMG, prostate LnCap, cervix HeLa and breast MCF7. All this information can be found in GeneCards (sections proteins and expression).

### Localisation

TIGAR is mainly localized in the cytoplasm. Under hypoxic conditions, a relocalization of the protein linked to HK-2 (hexokinase 2) in the outer mitochondrial membrane has been described (Mathupala et al., 2009; Cheung et al., 2012).



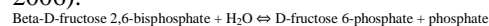
**Figure 3.** Human TIGAR crystalized structure visualization in Jmol software. His-11 is represented in white, Glu-102 is in purple, His-198 is colored green and C and N terminus are represented in red and blue, respectively. **A)** General protein view. **B)** Zoom of the visualization to the catalytic core, with the two histidines represented and the phosphate group painted following the consensus-based coloring of atoms. **C)** Protein surface and inside-core representation. The central core of the protein is composed by a six-stranded mixed  $\beta$  sheet flanked by  $\alpha$  helices on both sides.

### Function

TIGAR was identified by microarray analysis of gene expression after TP53 induction (Bensaad et al., 2006). TIGAR plays a role in the TP53 tumor suppressor program by reducing reactive oxygen species (ROS) levels and preventing DNA damage-induced apoptosis. Their functions are based on glycolysis inhibition and the enhancement of pentose phosphate pathway (PPP).

TIGAR is a bisphosphatase that hydrolyzes Fructose-2,6-bisphosphate to Fructose-6-phosphate, which can enter the PPP to generate NADPH and

ribose-5-phosphate, thus, reducing oxidative stress and generating nucleotide precursors (Bensaad et al., 2006).



The switch from TP53-induced cell-cycle arrest to apoptosis following maintained stress is associated with downregulation of TIGAR and therefore the loss of P53-dependent survival agents could be the cause of the apoptotic response. It has been proposed that TP53-dependent metabolism regulation could be orchestrated by different mechanisms other than the ones that regulate TP53-induced apoptosis. TIGAR antiapoptotic effects are oxidative-stress dependent. The apoptosis induction by other mechanisms is not affected by TIGAR, as it was shown in IL-3-dependent apoptosis FL5.12 cell line, and in anti-Fas induced apoptosis in U2OS cells, suggesting that TIGAR can modulate apoptosis in a cell-dependent manner (Bensaad et al., 2006).

As described previously, under hypoxic conditions TIGAR is localized in outer mitochondrial membrane. In this situation, it binds together with HK2 to mitochondria (Mathupala et al., 2009) in a HIF1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) dependent manner, and limits ROS levels.

If HK2 is not present, oxidative stress reduction by TIGAR is lower. It has been shown that mutant TIGAR TM (Triple Mutant without enzymatic activity: H11A/E102A/H198A) is able to relocate to mitochondria in response to hypoxia and, indeed, is able to bind to HK2 in the outer mitochondrial membrane.

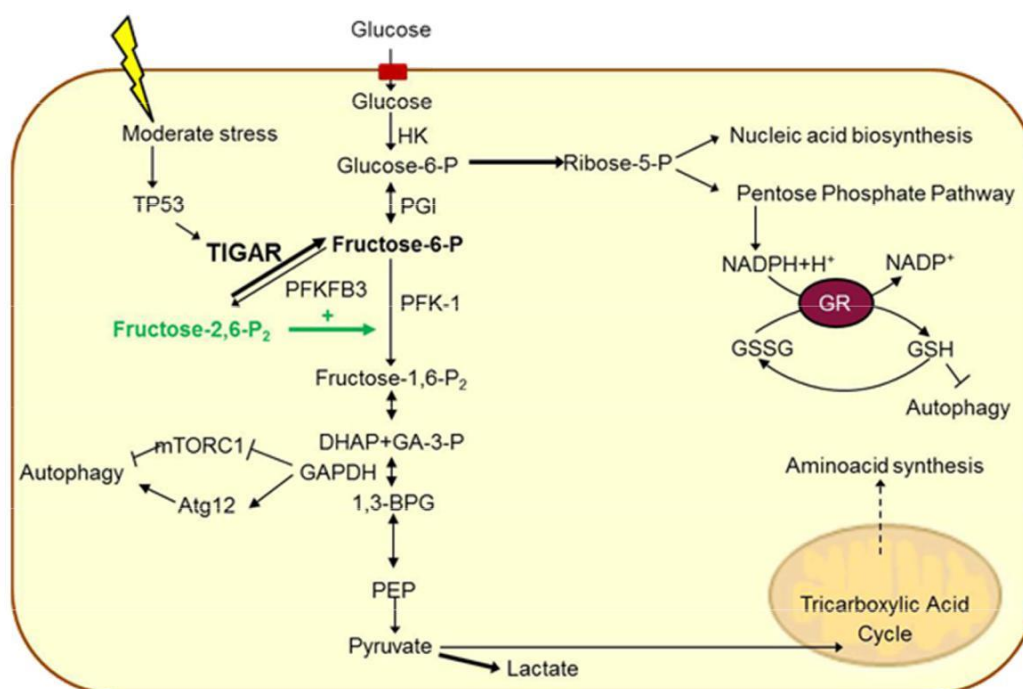
Therefore, the maintenance of mitochondrial membrane potential by TIGAR is independent of its bisphosphatase activity. However, the single deletion of four aminoacids in the C-terminus (258-261) avoided TIGAR mobilization to the mitochondria after hypoxia, although its bisphosphatase activity remained unaltered.

The double mutant TM TIGAR/258-261 was not able to reduce ROS levels (Bensaad et al., 2006; Cheung et al., 2012). In conclusion, TIGAR lowers ROS levels both by inhibiting glycolysis and by enhancing an adequate mitochondrial function coupling to HK2.

TIGAR effects have also been related to autophagy as an inhibition of this cell process was described when cells were exposed to stress conditions such as nutrient starvation or metabolic stress, in parallel with an overexpression of TIGAR and a decrease in ROS cell levels. After TIGAR suppression, autophagy was induced to moderate apoptotic response by restraining ROS levels (Bensaad et al., 2009).

The relation between autophagy and apoptosis can be modulated differently depending on the stimulus and cell type.





**Figure 4.** Schematic representation of TIGAR in metabolic pathways. The main enzymes involved in glycolysis are shown, as well as the substrates and products of TIGAR activity. The pentose phosphate pathway and mitochondrial metabolic pathways have been summarized. HK: hexokinase, PGI: phosphoglucose isomerase, PFKFB3: phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3, PFK-1: phosphofructokinase-1, DHAP: dihydroxyacetone phosphate, GA-3-P: glyceraldehyde 3-phosphate, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, 1,3-BPG: 1,3-bisphosphoglycerate, mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1, PEP: phosphoenolpyruvate, GSH: glutathione.

D-galactose (D-gal) treatment of neuroblastoma cells induced necroptosis and autophagy, as shown by upregulation of Bmf, Bnip3, Atg5 and TIGAR, but there were no changes in expression in genes related to apoptosis (Li et al., 2011).

Recently, it has been described a decrease in steady-state mRNA levels of TIGAR when the human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line was exposed to high oxidative stress conditions induced by the superoxide radical-generating menadione, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or nutrient starvation, in parallel with a down-regulation of the damage-regulated autophagy modulator (DRAM). mRNA levels of both genes were recovered when cells were treated with antioxidants such as GSH or N-acetylcysteine, suggesting a complex regulation of tumor suppressor genes by ROS levels (Kim et al., 2013). In front of a disruption in the homeostasis balance of the cell, TIGAR would provide cytoprotection by its antioxidant properties rather than its ability to inhibit autophagy. After a threatening stimulus, a rapid increase in the autophagic flux occurs mostly regulated by post-translational modifications, followed by a transcriptionally-mediated delayed autophagic response phase, in which TP53 would be activated. In this context, TIGAR would be rapidly transactivated and would mediate its antioxidant

response, while autophagy is enhanced by other transcriptionally activated targets, such as DRAM (Pietrocola et al., 2013). Some authors have proposed a TP53-orchestrated mechanism by which this protein would regulate stress-induced autophagy by balancing two proteins with opposite effects: TIGAR and DRAM (Dewaele et al., 2010; Zhang et al., 2010).

In TP53 knock-out mice (TP53<sup>-/-</sup>) cardioprotection against ischemic injury and resistance to cardiac remodeling were observed, and a significant TIGAR overexpression was described. The TIGAR knock-out (TIGAR<sup>-/-</sup>) had the same effects and a TP53-dependent mechanism of autophagy inhibition through the mitophagy enhancer Bnip3 was described. Double knock-out of TP53 and TIGAR mice exposed to ischemia responded with an increase in ROS levels, followed by an overexpression of Bnip3 that lead to mitophagy and, thus, cardioprotection. The activation of Bnip3 and mitophagy was recovered by NAC, confirming that TIGAR-mediated mitophagy inhibition is mediated by ROS. Ventricular remodeling after myocardial infarction is a consequence of both impaired mitochondrial integrity and enhanced apoptosis, whereas mitophagy helps cells to undergo mitochondrial damage and avoid apoptosis, resulting in a diminished initial infarct

size, less ventricular remodeling and restored homeostasis in ischemic myocardium (Kimata et al., 2010; Hoshino et al., 2012).

The analysis of lung tissues from idiopathic pulmonary fibrosis patients revealed decreased autophagy activity, evidenced by less LC3 and p62 expression. When these cells were treated with TGF $\beta$  in vitro, impairment in autophagy was observed, in parallel with an increase in TIGAR expression, although the possible mechanism connecting TGF $\beta$  and TIGAR was not described (Patel et al., 2012).

In a co-culture system, Martinez-Outschoorn et al. showed that oxidative stress-induced autophagy correlated with Cav-1 downregulation in cancer associated fibroblasts, and with overexpression of TIGAR in adjacent cancer cells. Consequently, autophagy cancer associated fibroblasts provide recycled nutrients for cancer cell metabolism and, moreover, prevent cancer cells death by upregulating TIGAR and thus conferring resistance to apoptosis and autophagy (Martinez-Outschoorn et al., 2010). Further studies by the same group demonstrated that the metabolic coupling between cancer cells and fibroblasts can explain tamoxifen resistance as cancer associated fibroblasts enhance the activity of TIGAR in cancer cells, providing protection against tamoxifen-induced apoptosis, which was much higher in monocultures of cancer cells alone (Martinez-Outschoorn et al., 2011). In another study, glutamine was described as a needed factor for Cav-1 downregulation in cancer associated fibroblasts and for the decrease in autophagy mediators and markers in cancer cells, establishing a model in which autophagy fibroblasts may serve as a source of glutamine to fuel cancer cell mitochondrial activity. Therefore, a cycle between catabolic tumor stroma cells and anabolic tumor cells has been proposed to explain the relations between cells in tumor environment (Ko et al., 2011).

Besides, TIGAR has also been proposed to be an anticancer therapy target gene considering that autophagy inhibition in cancer cells would probably increase cell death (Dodson et al., 2013).

All these studies confirm that TIGAR functions are not only restricted to glycolysis regulation, as this protein plays key roles in different cell processes involving oxidative stress restriction.

#### **Activation and regulation**

TIGAR belongs to that group of TP53 target genes that become rapidly activated by low levels of stress. There are two possible TP53 binding sites in TIGAR gene: one upstream of the first exon (BS1) and one within the 1<sup>st</sup> intron (BS2), which is the most efficient one and has been validated by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis (Bensaad et al., 2006).

In an experimental approach, TIGAR was induced by Actinomycin D and Adriamycin (Bensaad et al., 2006), two well-known activators of TP53, and also by Nutlin-3a, an antagonist of Mdm2 (Hasegawa et al., 2009). Other stimuli that have been described to trigger TIGAR expression are radiotherapy (Peña-Rico et al., 2011), glutamine (Ko et al., 2011), chemotherapy (Madan et al., 2012), UV light (Madan et al., 2012), TNF $\alpha$  and radiotherapy mimetics (Sinha et al., 2013).

When DNA damage occurs, TP53 is expressed either to repair DNA or lead the cell towards apoptosis. High ROS levels can compromise DNA stability which, in turn, could help cells to accumulate mutations and become tumorigenic. As TIGAR reduces ROS levels, it has been proposed as a tumor suppressor gene, although it should be taken into account that, as TIGAR can help tumor cells survival, it could act as an oncogene in some situations. TP53 is able to suppress tumor development when mechanisms of apoptosis, senescence and cell-cycle arrest are impeded. This supports the idea that metabolism, and thereby TIGAR, has a key role in cancer development (Li et al., 2012; Valente et al., 2013).

TIGAR expression can also be modulated in a TP53 independent manner, as results from studies with the TP53 null T98G and H1299 cell lines suggest (Bensaad et al., 2006; Peña-Rico et al., 2011). The mechanisms implicated in the regulation of TIGAR expression in the absence of TP53 are unclear. The CRE-binding protein (CREB) has been described to regulate TIGAR expression through a CRE-binding site at the TIGAR promoter, which was first annotated by bioinformatic analysis and then confirmed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and ChIP. CREB knockdown reduced enhanced promoter activity and TIGAR expression; whereas CREB overexpression resulted in enhanced promoter activity and TIGAR expression levels (Zou et al., 2013).

Another transcription factor, SP1, was found to bind to TIGAR promoter in a SP1-binding site located in a very short region (-56/-4) both in vitro and in vivo, and was considered a key factor for proper basal activity of TIGAR promoter (Zou et al., 2012).

Recently, some authors have identified HIF-1 $\alpha$  as a potential regulator of SCO2 and TIGAR gene expression suggesting the involvement of P300/CBP-associated factor (PCAF) in differential recruitment of HIF-1 $\alpha$  and p53 to the promoter of TIGAR and/or SCO2 genes in response of hypoxia in tumoral cells (Rajendran et al., 2013).

#### **Chromosomal rearrangements: copy number variants**

Some alterations affecting TIGAR genome region have been described in patients, some of them showed phenotypic effects.

Gain of 12:189578-34178209 resulted in hydronephrosis, micrognathia, edema, depressed nasal bridge, tricuspid regurgitation and diaphragmatic eventration.

Patients with gain of 12:189561-41878937 suffered global developmental delay.

The ones with gain of 12:230361-20643702 showed intellectual disability and electroencephalogram with localized low amplitude activity, whereas gain of 12:191619-8327369 resulted in macrocephaly, visual impairment, intellectual disability, muscular

hypotonia, and seizures. For more information, see DECIPHER.

**Homology**

Location in the mouse: chromosome 6, 61.92 cM, 127085116-127109550 bp, complement strand (MGI). For a comparison of the gene among Homo sapiens, mouse, rat, chimpanzee, cattle, rhesus macaque, dog, chicken and zebrafish see MGI.

For all species known gene tree, see: Treefam database.

Specie	Gene	Query cover	E value	Identity
Pan troglodytes	BAC clone CH251-597E5	32%	0.0	93%
Pongo abelii	BAC clone CH276-457P6	27%	0.0	94%
Gorilla gorilla	BAC clone CH277-211C13	26%	0.0	93%
N. leucogenys	CH271-261A22	28%	0.0	93%
Mus musculus	RIKEN library, F630005B03	5%	0.0	93%
Gallus gallus	Ribosomal protein S15	0%	6e-123	86%
Danio rerio	Ribosomal protein S15	0%	2e-80	80%

Figure 5. Orthologs (adapted from BLAST Local Alignment Tool).

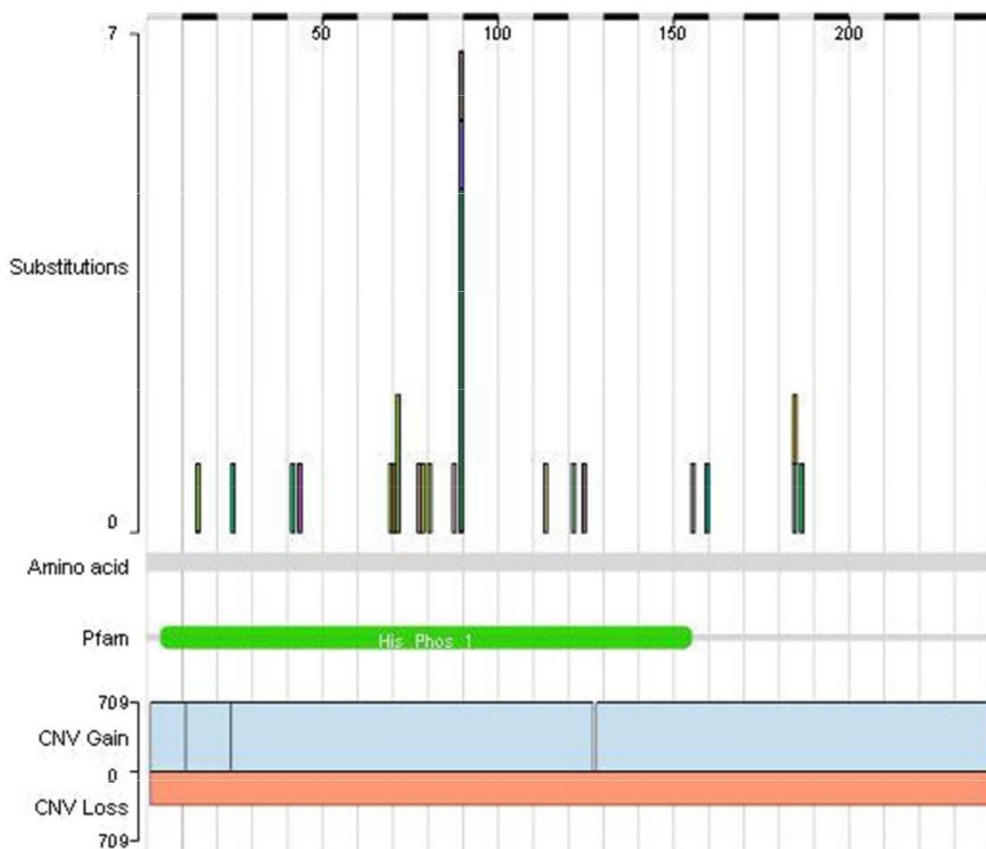


Figure 6. Histogram of mutations found among the aminoacid sequence of TIGAR protein. The maximum number of substitutions at any specific genomic region is represented in Y axis. R90G is the most common aminoacid substitution, caused by 5 different genomic mutations. Histidine phosphatase family homolog domain is represented in green and copy number variants are represented in blue (gain of function) and red (loss of function). Adapted from: COSMIC Database.

## Mutations

### Note

There have been observed 22 somatic mutations in patient tumor samples collected in the COSMIC database.

Nonsense substitutions: 1, located in c.466G>T (p.G156\*).

Missense substitutions: 16, which represent 82% of the mutations described among all patients. Only two missense substitutions have been found in more than one patient: c.268A>G (p.R90G) was found in 5 patients and c.215G>T (p.R72I) was found in 2 patients.

Synonymous substitutions: 4.

No deletions, insertions or chromosomal fusions in TIGAR gene have been described in any tumor sample.

### Genomic variants

There are 878 SNP variants described but none of them have clinical significance described (GeneCards).

## Implicated in

### Various cancers

#### Prognosis

Despite that little is known about the implication of TIGAR in cancer, there are some authors that point out about the importance of p53 targets such as cytochrome c oxidase 2 (SCO2) or TIGAR in the prognosis of breast cancer patients. Some studies indicated that p53, the most commonly mutated tumor suppressor gene, may have important functions in the regulation of energy-generating metabolic pathways that switch from oxidative phosphorylation to glycolysis via the synthesis of SCO2 and TIGAR (Won et al., 2012).

#### Oncogenesis

The p53 tumor suppressor pathway coordinates DNA repair, cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence to preserve genomic stability and prevent tumor formation. TIGAR has been identified as a p53-inducible gene. TIGAR expression lowers fructose-2,6-bisphosphate levels in cells, resulting in an inhibition of glycolysis and an overall decrease in ROS levels. These functions of TIGAR correlate with an ability to protect cells from ROS-associated apoptosis, and consequently, knockdown of endogenous TIGAR expression sensitizes cells to p53-induced death. Expression of TIGAR may therefore modulate the apoptotic response to p53, allowing survival in the face of mild or transient stress signals that may be reversed or repaired. The decrease of intracellular ROS levels in response to TIGAR may also play a role in the ability of p53 to protect from the accumulation of genomic damage (Bensaad et al., 2006). In an in

vitro model of nasopharyngeal cancer, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl) cytosine (ECyd), a RNA-nucleoside anti-metabolite with potent anticancer activity, acts by downregulating TIGAR and depleting NADPH. The overexpression of TIGAR was able to rescue cells from ECyd-induced growth inhibition, demonstrating a novel mechanistic action of ECyd on TIGAR. This study suggests a novel link between RNA metabolism and TIGAR regulation (Lui et al., 2010). In human cervical carcinoma cells, RNAi-mediated citrate synthase knockdown accelerated cancer cell metastasis and proliferation being these effects related to deregulation of the p53/TIGAR and SCO2 pathways (Lin et al., 2012). In other studies, TIGAR also mediates de-phosphorylation of RB (retinoblastoma) and stabilisation of RB-E2F1 complex thus delaying the entry of cells in S phase of the cell cycle. Thus, TIGAR inhibits proliferation of cancer cells and increases drug-mediated tumour regression by promoting p53-mediated cell-cycle arrest (Madan et al., 2011; Madan et al., 2012).

### Hepatic cancer

#### Note

Silencing TIGAR by RNAi induces apoptotic and autophagy cell death in HepG2 cells, and this data raise hope for the future successful application of TIGAR siRNA in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) (Ye et al., 2013).

### Breast cancer

#### Note

In a model of MCF7 breast cancer cells co-cultured with non-transformed fibroblasts, glutamine protects MCF7 cells against apoptosis, via the upregulation of the anti-apoptotic and anti-autophagic protein TIGAR (Martinez-Outschoorn et al., 2011). The authors showed that glutamine cooperates with stromal fibroblasts to confer tamoxifen-resistance in MCF7 cancer cells (Ko et al., 2011). Moreover, Won et al. (2012) have analysed the expression of p53, SCO2, TIGAR, and COX in 113 cases of invasive breast cancer using immunohistochemistry. A high expression of p53, SCO2, TIGAR, and COX was noted in 27,5% (31 cases), 84,1% (95 cases), 74,3% (84 cases), and 73,4% (83 cases) of the breast tumors, respectively. A high p53 expression was significantly associated with low expression levels of SCO2 (P = .008), COX (P < .0001), and TIGAR (P = .007). These results suggest that p53 can modulate the metabolic pathways via the proteins SCO2 and TIGAR in human breast cancer. TIGAR and p53 can lower the cellular sensitivity to ROS-associated apoptosis, and this potentially contributes to the survival of cells undergoing mild, reversible stress by different anti-tumoral drugs (Won et al., 2012).

## **Head and neck cancer**

### **Note**

In a nasopharyngeal cancer, the onco-protein kinase c-Met maintains TIGAR expression. Inhibition of c-Met resulted in significant downregulation of TIGAR and subsequent depletion of intracellular NADPH. The results provide the first evidence linking c-Met, TIGAR and NADPH regulation in human cancer cells suggesting that inhibition of a tyrosine kinase/TIGAR/NADPH cascade may have therapeutic applicability in human cancers (Lui et al., 2011).

## **Lung cancer**

### **Note**

Sinthupibulyakit et al. (2010) have shown that a glycolytic inhibitor, 2-deoxy-D-glucose (2DG), exhibits a cytotoxic effect on non-small cell lung cancer in a p53-dependent manner. 2DG significantly inhibits ATP production in p53-deficient lung cancer cells (H358) but not in p53-wt cells (A549). This effect is explained by the ROS increase from OXPHOS that induces the expression of p53 antioxidant targets such as cytochrome c oxidase 2 (SCO2) and TIGAR. Therefore, killing of cancer cells by this inhibitor of glycolysis is more efficient in cancer cells without functional p53 that protects against metabolic stress by up-regulation of TIGAR (Sinthupibulyakit et al., 2010).

Other authors point out the importance of autophagy as a cellular homeostatic process to determine cell fate decisions under conditions of stress. Deregulation of autophagy impacts numerous human diseases including cancer and chronic lung diseases. TIGAR could be implicated in the impairment of autophagy by TGF- $\beta$ (1) and may represent a mechanism for the promotion of fibrogenesis in idiopathic pulmonary fibrosis (Patel et al., 2012).

## **Intestinal cancer and ulcerative colitis**

### **Note**

The ability of TIGAR to contribute to the growth and survival of cells in rapidly proliferating tissue suggested a possible contribution of TIGAR to the development or progression of malignancies. In a mouse model of intestinal tumor induced by deletion of APC in the intestinal stem cells, TIGAR expression was increased and a reduction in tumor development and an enhancement of survival in TIGAR<sup>-/-</sup> mice were described. Furthermore, using an in vitro organoid culture model, impaired growth of TIGAR<sup>-/-</sup> cells derived from the crypt of the small intestine was rescued by supplementation with nucleosides and the antioxidant N-acetyl cysteine. In the other hand, in a mouse model of ulcerative colitis TIGAR plays an important role in

tissue regeneration and that lack of TIGAR results in a failure to repair damaged intestinal epithelium. TIGAR is overexpressed in crypts during the recovery of proliferation in WT mice. The lack of TIGAR results in a failure to repair damaged intestinal epithelium and increase in oxidative damage. In these systems, therefore, TIGAR expression is necessary to maintain normal healthy tissues following stress or damage. Therefore, while loss of TIGAR is deleterious to the recovery from intestinal damage, lack of TIGAR becomes advantageous under conditions where enhanced proliferation occurs in the context of tumor development and progression of malignancies. In conclusion, TIGAR is not required for normal tissue growth and development but becomes important in supporting rapid proliferation in adult intestinal epithelium (Cheung et al., 2013).

## **Multiple myeloma**

### **Note**

Multiple myeloma cells present problems in the expression of oncoprotein MUC1-C. The inhibition of MUC1-C increases ROS and is also associated with down-regulation of TIGAR, resulting in the decrease in NADPH and glutathione (GSH) levels. The suppression of TIGAR and NADPH levels contributes to ROS-mediated apoptosis/necrosis of multiple myeloma cells. These findings indicate that multiple myeloma cells are dependent on MUC1-C and TIGAR for maintenance of redox balance and that targeting MUC1-C activates a cascade involving TIGAR suppression that contributes to multiple myeloma cell death (Yin et al., 2012).

## **Chronic lymphocytic leukemia**

### **Note**

In chronic lymphocytic leukemia a correlation between sensitivity to fludarabine and TIGAR induction mediated by p53 was described. The sensitivity of fludarabine was variable despite all patients analysed had wild type p53 (López-Guerra et al., 2008).

## **Cervix carcinoma**

### **Note**

In human cervical carcinoma cells, RNAi-mediated citrate synthase inhibition accelerated cancer cell proliferation and metastasis in in vitro assays and in vivo tumor xenograft models. The main effects of this knockdown are related with severe defects in respiratory activity and marked decreases in ATP production, but increases in glycolytic metabolism, resulted from deregulation of the p53/TIGAR and SCO2 pathways. This phenotypic change was completely reversed by p53 reactivation suggesting the implication of TIGAR in this malignant proliferation (Lin et al., 2012).

## **Glioblastoma**

### **Note**

Wanka et al. (2012) have shown in glioblastoma that TIGAR is overexpressed and its expression reduces cell death induced by glucose and oxygen restriction. Metabolic analyses reveal that TIGAR inhibits glycolysis and promotes respiration. Further, generation of ROS is reduced whereas levels of reduced GSH are elevated in TIGAR-expressing cells (Wanka et al., 2012). These results agree with the potential of TIGAR as an antitumoral target demonstrated by Peña-Rico et al. (2011), who analysed the effects of TIGAR knockdown in U87MG and T98G glioblastoma-derived cell lines and concluded that TIGAR abrogation provides a novel adjunctive therapeutic strategy against glial tumors by increasing radiation-induced cell impairment, thus allowing the use of lower radiotherapeutic doses. Gliomas are resistant to radiation therapy, as well as to TNF $\alpha$  induced killing. Radiation-induced TNF $\alpha$  triggers Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B)-mediated radioresistance. The existence of ATM-NF $\kappa$ B axis that regulates the metabolic modulator TIGAR suggests its implication in the mechanisms through which inflammation could affect resistance and adaptation to radiomimetics despite concurrent induction of death (Sinha et al., 2013).

Recently, in a neuroblastoma SH-SY5Y cell model a novel sonodynamic therapy has been assayed. This noninvasive modality for cancer treatment is based on the selective activation of a sonosensitizer agent by acoustic cavitation. The activated sonosensitizer agent might generate reactive oxygen species leading to cancer cell death. This therapy showed a significant decrease in SH-SY5Y cell proliferation in vitro in two and three-dimensional neuroblastoma models and this effect was accompanied by a significant decrease in the TIGAR mRNA expression 24 hours after sonodynamic treatment (Canaparo et al., 2013).

## **Alzheimer's disease and neurodegeneration**

### **Note**

Some authors reported that TIGAR protein levels were decreased in various stages of Alzheimer's disease dementia severity, suggesting diminishing effect of ATM-p53 signalling in counteracting cell death induced by glycolysis/OXPHOS. The progressive decrease of TIGAR expression reported agrees with the findings of altered post-translational modification of TP53, which result in increased formation of functionally inactive TP53 monomers and dimers, but not functionally active TP53 tetramers in Alzheimer's disease patients' brains (Di Domenico et al., 2009; Katsel et al., 2013). Moreover, the reported elevated expression of

conformationally altered unfolded TP53 in peripheral blood cells from patients with Alzheimer's disease (Uberti et al., 2008) raises the question of the impact of protein structural changes on the TP53 activity during progression of dementia. TP53 activates TIGAR under low levels of stress. However, following extended exposure to stress and the induction of the TP53-mediated apoptotic response, TIGAR expression is reduced, suggesting that the induction of the apoptotic response may reflect the loss of protection by the TP53-inducible survival signals (Bensaad et al., 2006). Therefore, TIGAR may play a critical role in the switch of TP53-induced responses to stress and a decrease in its expression may have negative consequences for the survival of cells during progression of dementia (Madan et al., 2012).

## **Diabetes and obesity**

### **Note**

Studies performed in rats with diabetes mellitus to evaluate the potential role of p53 and its transcriptional targets in exercise-induced mitochondrial adaptation in skeletal muscle showed a decrease in p53 and TIGAR protein levels, indicating that exercise training can attenuate oxidative stress and increase mitochondrial DNA content in skeletal muscle. Agreeing with these results, suppression of p53 and TIGAR expression could play a role in preventing oxidative stress in insulin resistance (Qi et al., 2011).

In the same direction Dardak et al. (2011) reported that susceptibility to ethanol-induced liver damage in different rat strains and the promotion of insulin resistance is correlated with p53 activation and the activation of TIGAR.

## **To be noted**

**Conclusion:** In summary, since TIGAR was discovered in 2006 as a p53 target activated in response to moderated stress, several functions related to its fructose2,6-bisphosphatase activity have been described. TIGAR has become a key protein in the regulation of cell processes such as apoptosis, autophagy, DNA repair and control of oxidative stress, determining the fate of the cell in response to different insults. The role of TIGAR in maintaining tumor cell survival is highlighted by the fact that some tumor types have elevated levels of TIGAR expression (Wanka et al., 2012; Won et al., 2012) and the inhibition of different therapeutic targets is associated with a decrease of TIGAR expression. TIGAR can help to support tumorigenesis by limiting ROS and providing precursors for nucleotide synthesis. These data predict that inhibition of TIGAR may carry therapeutic advantage in cancer treatments as demonstrated in different cancer models (Peña et

al., 2011; Martinez-Outschoorn et al., 2011; Cheung et al., 2013).

## References

- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):107-20
- López-Guerra M, Trigueros-Motos L, Molina-Arcas M, Villamor N, Casado FJ, Montserrat E, Campo E, Colomer D, Pastor-Anglada M. Identification of TIGAR in the equilibrative nucleoside transporter 2-mediated response to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2008 Dec;93(12):1843-51
- Rigden DJ. The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *Biochem J*. 2008 Jan 15;409(2):333-48
- Uberti D, Lanni C, Racchi M, Govoni S, Memo M. Conformationally altered p53: a putative peripheral marker for Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2008;5(3-4):209-11
- Bensaad K, Cheung EC, Vousden KH. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *EMBO J*. 2009 Oct 7;28(19):3015-26
- Di Domenico F, Cenini G, Sultana R, Perluigi M, Uberti D, Memo M, Butterfield DA. Glutathionylation of the proapoptotic protein p53 in Alzheimer's disease brain: implications for AD pathogenesis. *Neurochem Res*. 2009 Apr;34(4):727-33
- Hasegawa H, Yamada Y, Iha H, Tsukasaki K, Nagai K, Atogami S, Sugahara K, Tsuruda K, Ishizaki A, Kamihira S. Activation of p53 by Nutlin-3a, an antagonist of MDM2, induces apoptosis and cellular senescence in adult T-cell leukemia cells. *Leukemia*. 2009 Nov;23(11):2090-101
- Li H, Jogl G. Structural and biochemical studies of TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator). *J Biol Chem*. 2009 Jan 16;284(3):1748-54
- Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol*. 2009 Feb;19(1):17-24
- Dewaele M, Maes H, Agostinis P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy*. 2010 Oct;6(7):838-54
- Kimata M, Matoba S, Iwai-Kanai E, Nakamura H, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Mita Y, Okigaki M, Ikeda K, Tatsumi T, Matsubara H. p53 and TIGAR regulate cardiac myocyte energy homeostasis under hypoxic stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Dec;299(6):H1908-16
- Lui VW, Lau CP, Cheung CS, Ho K, Ng MH, Cheng SH, Hong B, Tsao SW, Tsang CM, Lei KI, Yamasaki Y, Mita A, Chan AT. An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyD), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation. *Biochem Pharmacol*. 2010 Jun 15;79(12):1772-80
- Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Zhou J, Wang C, Pavlides S, Martinez-Cantarín MP, Capozza F, Witkiewicz AK, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Caro J, Lisanti MP, Sotgia F. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFkB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle*. 2010 Sep 1;9(17):3515-33
- Sinthupibulyakit C, Ittarat W, St Clair WH, St Clair DK. p53 Protects lung cancer cells against metabolic stress. *Int J Oncol*. 2010 Dec;37(6):1575-81
- Zhang XD, Qin ZH, Wang J. The role of p53 in cell metabolism. *Acta Pharmacol Sin*. 2010 Sep;31(9):1208-12
- Derdak Z, Lang CH, Villegas KA, Tong M, Mark NM, de la Monte SM, Wands JR. Activation of p53 enhances apoptosis and insulin resistance in a rat model of alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2011 Jan;54(1):164-72
- Ko YH, Lin Z, Flomenberg N, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE. Glutamine fuels a vicious cycle of autophagy in the tumor stroma and oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells: implications for preventing chemotherapy resistance. *Cancer Biol Ther*. 2011 Dec 15;12(12):1085-97
- Li N, He Y, Wang L, Mo C, Zhang J, Zhang W, Li J, Liao Z, Tang X, Xiao H. D-galactose induces necroptotic cell death in neuroblastoma cell lines. *J Cell Biochem*. 2011 Dec;112(12):3834-44
- Lui VW, Wong EY, Ho K, Ng PK, Lau CP, Tsui SK, Tsang CM, Tsao SW, Cheng SH, Ng MH, Ng YK, Lam EK, Hong B, Lo KW, Mok TS, Chan AT, Mills GB. Inhibition of c-Met downregulates TIGAR expression and reduces NADPH production leading to cell death. *Oncogene*. 2011 Mar 3;30(9):1127-34
- Madan E, Gogna R, Bhatt M, Pati U, Kuppusamy P, Mahdi AA. Regulation of glucose metabolism by p53: emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget*. 2011 Dec;2(12):948-57
- Martinez-Outschoorn UE, Goldberg A, Lin Z, Ko YH, Flomenberg N, Wang C, Pavlides S, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2011 Nov 15;12(10):924-38
- Mor I, Cheung EC, Vousden KH. Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:211-6
- Peña-Rico MA, Calvo-Vidal MN, Villalonga-Planells R, Martínez-Soler F, Giménez-Bonafé P, Navarro-Sabaté À, Tortosa A, Bartrons R, Manzano A. TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) knockdown results in radiosensitization of glioma cells. *Radiother Oncol*. 2011 Oct;101(1):132-9
- Qi Z, He J, Zhang Y, Shao Y, Ding S. Exercise training attenuates oxidative stress and decreases p53 protein content in skeletal muscle of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Free Radic Biol Med*. 2011 Apr 1;50(7):794-800
- Cheung EC, Ludwig RL, Vousden KH. Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Dec 11;109(50):20491-6
- Hoshino A, Matoba S, Iwai-Kanai E, Nakamura H, Kimata M, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Ariyoshi M, Mita Y, Ikeda K, Ueyama T, Okigaki M, Matsubara H. p53-TIGAR axis attenuates mitophagy to exacerbate cardiac damage after ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Jan;52(1):175-84
- Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, Baer R, Gu W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated

- cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1269-83
- Lin CC, Cheng TL, Tsai WH, Tsai HJ, Hu KH, Chang HC, Yeh CW, Chen YC, Liao CC, Chang WT. Loss of the respiratory enzyme citrate synthase directly links the Warburg effect to tumor malignancy. *Sci Rep*. 2012;2:785
- Madan E, Gogna R, Kuppusamy P, Bhatt M, Pati U, Mahdi AA. TIGAR induces p53-mediated cell-cycle arrest by regulation of RB-E2F1 complex. *Br J Cancer*. 2012 Jul 24;107(3):516-26
- Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, Rosas IO, Morse D. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2012;7(7):e41394
- Wanka C, Steinbach JP, Rieger J. Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) protects glioma cells from starvation-induced cell death by up-regulating respiration and improving cellular redox homeostasis. *J Biol Chem*. 2012 Sep 28;287(40):33436-46
- Won KY, Lim SJ, Kim GY, Kim YW, Han SA, Song JY, Lee DK. Regulatory role of p53 in cancer metabolism via SCO2 and TIGAR in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2012 Feb;43(2):221-8
- Yin L, Kosugi M, Kufe D. Inhibition of the MUC1-C oncoprotein induces multiple myeloma cell death by down-regulating TIGAR expression and depleting NADPH. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):810-6
- Zou S, Gu Z, Ni P, Liu X, Wang J, Fan Q. SP1 plays a pivotal role for basal activity of TIGAR promoter in liver cancer cell lines. *Mol Cell Biochem*. 2012 Jan;359(1-2):17-23
- Berkers CR, Maddocks OD, Cheung EC, Mor I, Vousden KH. Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metab*. 2013 Nov 5;18(5):617-33
- Canaparo R, Varchi G, Ballestri M, Foglietta F, Sotgiu G, Guerrini A, Francovich A, Civera P, Frairia R, Serpe L. Polymeric nanoparticles enhance the sonodynamic activity of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin in an in vitro neuroblastoma model. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4247-63
- Cheung EC, Athineos D, Lee P, Ridgway RA, Lambie W, Nixon C, Strathdee D, Blyth K, Sansom OJ, Vousden KH. TIGAR is required for efficient intestinal regeneration and tumorigenesis. *Dev Cell*. 2013 Jun 10;25(5):463-77
- Dai Q, Yin Y, Liu W, Wei L, Zhou Y, Li Z, You Q, Lu N, Guo Q. Two p53-related metabolic regulators, TIGAR and SCO2, contribute to oroxilin A-mediated glucose metabolism in human hepatoma HepG2 cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Jul;45(7):1468-78
- Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J. Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2013 Oct;63:207-21
- Katsel P, Tan W, Fam P, Purohit DP, Haroutunian V. Cycle checkpoint abnormalities during dementia: a plausible association with the loss of protection against oxidative stress in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013;8(7):e68361
- Kim SJ, Jung HJ, Lim CJ. Reactive oxygen species-dependent down-regulation of tumor suppressor genes PTEN, USP28, DRAM, TIGAR, and CYLD under oxidative stress. *Biochem Genet*. 2013 Dec;51(11-12):901-15
- Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, Kroemer G. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol*. 2013 Oct;23(5):310-22
- Rajendran R, Garva R, Ashour H, Leung T, Stratford I, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. Acetylation mediated by the p300/CBP-associated factor determines cellular energy metabolic pathways in cancer. *Int J Oncol*. 2013 Jun;42(6):1961-72
- Sinha S, Ghildiyal R, Mehta VS, Sen E. ATM-NFkB axis-driven TIGAR regulates sensitivity of glioma cells to radiomimetics in the presence of TNF $\alpha$ . *Cell Death Dis*. 2013 May 2;4:e615
- Valente LJ, Gray DH, Michalak EM, Pinon-Hofbauer J, Egle A, Scott CL, Janic A, Strasser A. p53 efficiently suppresses tumor development in the complete absence of its cell-cycle inhibitory and proapoptotic effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Rep*. 2013 May 30;3(5):1339-45
- Ye L, Zhao X, Lu J, Qian G, Zheng JC, Ge S. Knockdown of TIGAR by RNA interference induces apoptosis and autophagy in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jul 26;437(2):300-6
- Zou S, Wang X, Deng L, Wang Y, Huang B, Zhang N, Fan Q, Luo J. CREB, another culprit for TIGAR promoter activity and expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 4;439(4):481-6

---

*This article should be referenced as such:*

Simon H, Rodríguez-García A, Navarro-Sabaté À, Fontova P, Bartrons R, Manzano A. C12orf5 (chromosome 12 open reading frame 5). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2014; 18(7):500-510.

---





# Gene Section

## Review

# PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3)

Laura Novellademunt, Àurea Navarro-Sabaté, Anna Manzano, Ana Rodríguez-García, Ramon Bartrons

Departament de Ciències Fisiològiques, Campus de Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, E-08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain (LN, ÀNS, AM, ARG, RB)

Published in Atlas Database: March 2013

Online updated version : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/PFKFB3ID45932ch10p15.html>  
DOI: 10.4267/2042/51425

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 France Licence.  
© 2013 Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

## Identity

**Other names:** IPFK2, PFK2

**HGNC (Hugo):** PFKFB3

**Location:** 10p15.1

**Note:** The human PFKFB3 gene is located on the short arm of chromosome 10 at position 10p15.1

(Manzano et al., 1998) (Figure 1).

Location in the mouse: chromosome 2, 8,73 cM, 11471430-11502101 bp, complement strand (MGI).

For a comparison of the gene of Homo sapiens, mouse, rat, cattle, chimpanzee and domestic dog see: (MGI). Also for all species known gene tree, see: Treefam database.

Figure 1

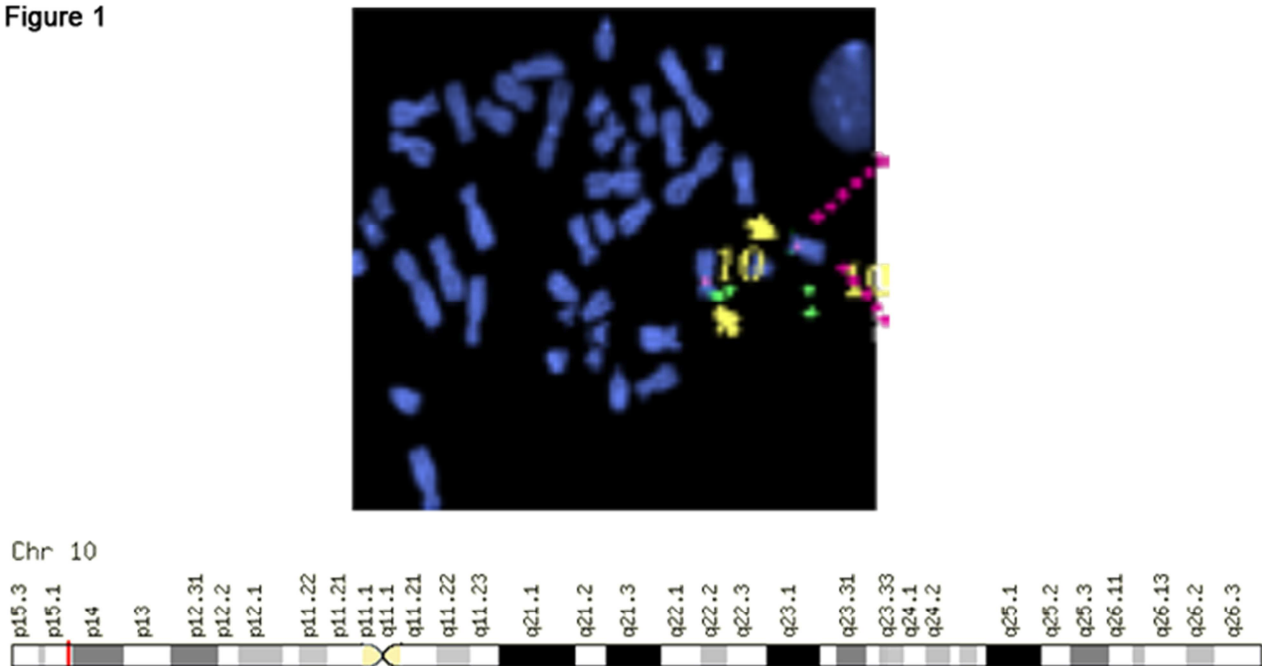


Figure 1. Localization of human PFKFB3 gene by in situ hybridization.

Figure 2

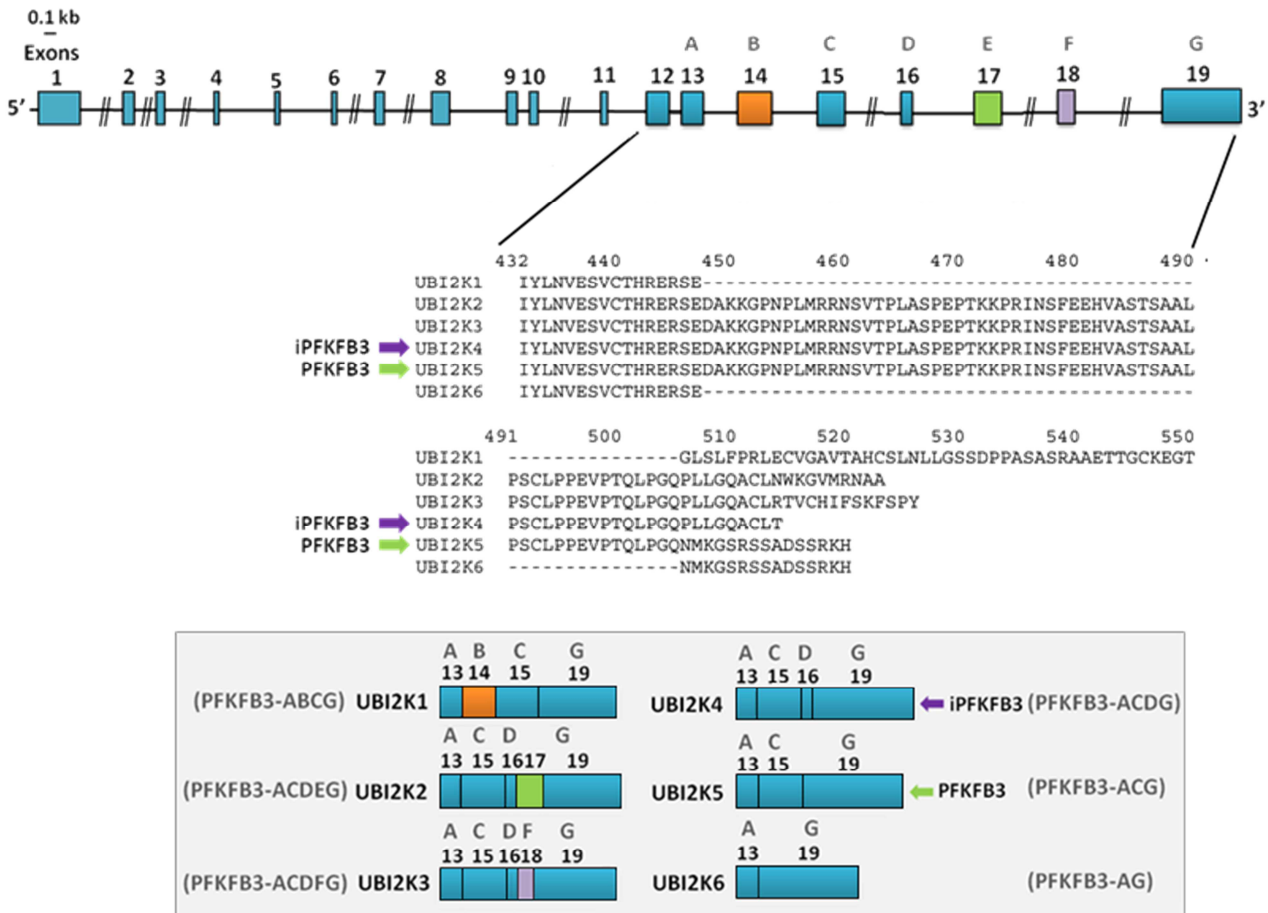


Figure 2. Splicing pattern of the human PFKFB3 gene. Schematic organization of the human PFKFB3 gene generated by alternative splicing and the protein sequence derived. The sequences of UBI2K4 and UBI2K5 isoforms corresponds to iPFKFB3 and uPFKFB3, respectively.

## DNA/RNA

### Description

The human PFKFB3 is composed of 19 exons spanning genomic region about 90,6 Kb (GenBank).

Alternative splicing variants have been reported. The main variants corresponding to mRNAs of 4453 bp and 4224 bp for the variant 1 u-PFK2 (NM\_004566.3) and variant 2 i-PFK2 (NM\_001145443.1), respectively (Figure 2).

### Transcription

The human PFKFB3 coding sequence consists of 1503 bp for i-PFK2 and 1563 bp for u-PFK2 from the start codon to the stop codon.

Multiple alternatively spliced transcript variants have been found for this gene. (Entrez Gene) (OTTMUSG00000011314).

### Pseudogene

No pseudogene of PFKFB3 known.

## Protein

### Description

PFKFB3 protein consists of two homodimeric subunits of 520 amino acids, with a molecular weight of 59609 Da for each subunit.

The monomer structure is divided into two functional domains within the same polypeptidic chain (El-Maghrabi et al., 1982; Okar et al., 2001; Pilkis et al., 1995).

The finding of mutations that affect kinase activity of the enzyme (Kurland et al., 1995; Li et al., 1992b; Rider et al., 1994), and the localization of ATP $\gamma$ S in the structure, lead to the identification of the N-terminal domain as the kinase domain, which catalyses the synthesis of Fru-2,6-P $_2$ , using fructose-6-phosphate and adenosine-5-triphosphate (ATP) as substrates (Figure 3).

On the other hand, structural and sequence homology with yeast phosphoglycerate mutase (Winn et al., 1981) and rat acid phosphatase (Schneider et al., 1993), along with the location of

mutations that affect Fru-2,6-Pase activity (Li et al., 1992a; Li et al., 1992c; Lin et al., 1992; Tauler et al., 1990) suggested the C-terminal domain to contain the bisphosphatase activity of the enzyme.

This domain is responsible for the hydrolytic degradation of Fru-2,6-P<sub>2</sub> into fructose-6-P and inorganic phosphate (Pi).

These two mutually opposing catalytic activities are controlled by different mechanisms such that either activity is predominant in a given physiological condition.

Ultimately, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) activities control Fru-2,6-P<sub>2</sub> synthesis and degradation, regulating the rate of glucose metabolism.

Different PFK-2/FBPase-2 isoenzymes have been described, sharing high sequence similarity (85%). PFKFB3 isoenzyme has some structural differences with the other isoforms.

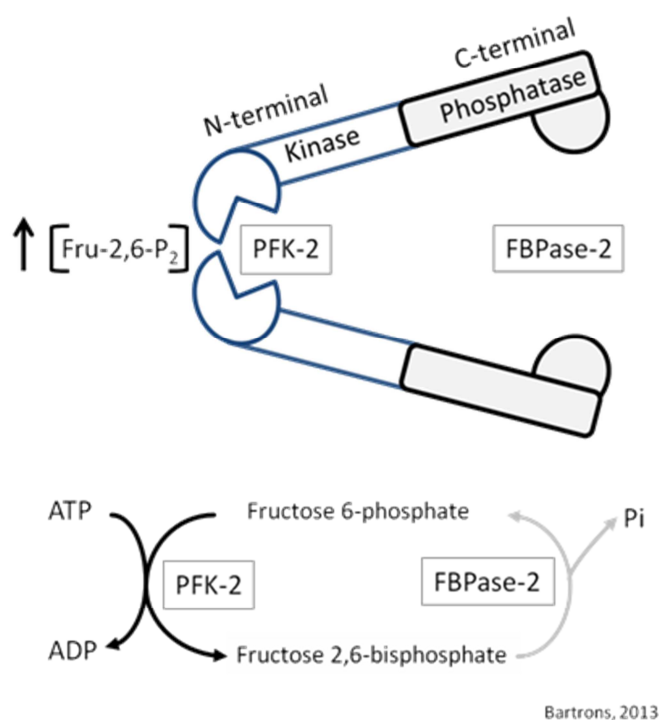
The conformations of the substrate loops in the kinase domain are different from those of other isoforms (Hasemann et al., 1996; Lee et al., 2003), giving a structural explanation for the higher kinase activity. Moreover, the N-terminus binds to the bisphosphatase domain to produce a conformational change in the active pocket to enhance inhibitory binding of product (Kim et al., 2006). Residues 4-15 of the kinase domain form a  $\beta$ -hairpin structure and the rest is used as an arm connecting the hairpin

to the bisphosphatase domain. Additionally, the contacting area of the bisphosphatase domain is functionally very sensitive due to the residues critical for binding of both product and substrate are located very close (Kim et al., 2006). The low bisphosphatase activity of PFKFB3, which is lower than that of other isoforms by an order of magnitude, is due to the presence of a serine at residue 302 instead of an arginine as conserved in the other isoforms. This residue is said to interact with the 2-phosphate and further stabilizes the transitions state (Cavalier et al., 2012; Kim et al., 2006).

### Expression

The PFKFB3 gene product is present in proliferating tissues (Duran et al., 2008a; Duran et al., 2009; Goren et al., 2000; Manzano et al., 1998; Sakai et al., 1996) and transformed cells (Calvo et al., 2006; Chesney et al., 1999; Hamilton et al., 1997; Minchenko et al., 2002; Novellademunt et al., 2012; Obach et al., 2004; Riera et al., 2002) and various tumors (Atsumi et al., 2002; Fleischer et al., 2011; Kessler et al., 2008). The high kinase/ bisphosphatase activity ratio of this isoenzyme can explain the high Fru-2,6-P<sub>2</sub> found in the cells where it is present, which in turn sustains high glycolytic rates and it is crucial in supporting growing and proliferant cell metabolism.

Figure 3



**Figure 3. Scheme of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) activity.** PFKFB3 protein consists of two homodimeric subunits of 59,6 KDa. The monomer structure contains two functional domains; kinase and bisphosphatase, located at N-terminal and C-terminal regions, respectively. PFKFB3 has the highest Kinase/Bisphosphatase activity ratio (K/B=700) which promotes high concentrations of Fru-2,6-P<sub>2</sub>.

PFKFB3 gene has been found to be expressed in different cell systems. During C2C12 myogenic cell differentiation, the 6-phosphofructo-2-kinase isoenzyme, product of the PFKFB3 gene, is downregulated, being the PFKFB3 isoenzyme degraded through the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway (Riera et al., 2003). In neurons, PFKFB3 is constantly subjected to proteasome degradation after ubiquitylation by the E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1. The activity of this complex is determinant in controlling the protein levels of PFKFB3 and hence the rate of glucose consumption through glycolysis. The function of APC/C is strictly dependent on the presence of Cdh1, which is very abundant in these cells. In contrast, astrocytes express very low Cdh1 levels and therefore APC/C activity is negligible. Accordingly, PFKFB3 protein levels are high and glycolysis is active in astrocytes owing to the low levels of Cdh1. In fact, overexpression of Cdh1 in astrocytes destabilizes PFKFB3 and concomitantly decreases the rate of glycolysis (Fernandez-Fernandez et al., 2012). The later finding that the activity of the PFKFB3 isoenzyme is regulated in cancer cells by APC/C-Cdh1 (Almeida et al., 2010) led to the identification of the role of this ubiquitin ligase in the metabolic regulation of the cell cycle and therefore of cell proliferation (Moncada et al., 2012).

The regulatory component of this complex, Cdh1, has been shown to be downregulated during malignant progression and tumor formation. A decrease in the activity of APC/C-Cdh1 in mid-to-late G1 phase, that has been described as the nutrient-sensitive restriction point and is responsible for the transition from G1 to S, leads to the accumulation of PFKFB3 and enhances the glycolytic flux in malignant cells. PFKFB3 is also a substrate at the onset of S-phase for the ubiquitin ligase SCF (Skp1/cullin/F-box)- $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -transducin repeat-containing protein), so that the activity of PFKFB3 is short-lasting, coinciding with a peak in glycolysis in mid-to-late G1, demonstrating that proliferation and the induction of aerobic glycolysis are both essential components of neoplastic transformation (Moncada et al., 2012).

PFKFB3 has also been found in testis. In adult testes both PFKFB3 and PFKFB4 isoenzymes are present. PFKFB3 is located across the seminiferous epithelium, whereas expression of PFKFB4 is restricted to the spermatogenic cells, being the only one present in mature spermatozoa (Gomez et al.,

2005). This differential distribution supports the idea that the cell-specific isoenzymes are able to adapt their kinetic and regulatory enzymatic properties to the metabolic demand of a particular tissue or cell status. Thus, in parallel with spermatogenesis and spermiogenesis, PFKFB isoenzyme expression switches from PFKFB3, which is required during the proliferative phase, to the testis isoform PFKFB4, which is germ cell specific (Gomez et al., 2012; Gomez et al., 2009).

In mouse hypothalami, PFKFB3 mRNA levels are increased by 10-fold in response to re-feeding. In the hypothalamus, re-feeding also decreases the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) (Thr172) and the mRNA levels of agouti-related protein (AgRP), and increases the mRNA levels of cocaine-amphetamine-related transcript (CART).

In addition, knockdown of PFKFB3 in N-43/5 neurons causes a decrease in rates of glycolysis, which is accompanied by increased AMPK phosphorylation, increased AgRP mRNA levels and decreased CART mRNA levels. In contrast, overexpression of PFKFB3 in N-43/5 neurons causes an increase in glycolysis, which was accompanied by decreased AMPK phosphorylation and decreased AgRP mRNA levels and increased CART mRNA levels. Together, these results suggest that PFKFB3 responds to re-feeding, which in turn stimulates hypothalamic glycolysis and decreases hypothalamic AMPK phosphorylation and alters neuropeptide expression in a pattern that is associated with suppression of food intake (Li et al., 2012).

Recent results have shown that the tumour suppressor PTEN promotes APC/C-Cdh1 activity (Song et al., 2011) and that cells from mice overexpressing PTEN exhibit reduced glucose and glutamine uptake and are resistant to oncogenic transformation (Garcia-Cao et al., 2012). Studies on the possible connection between APC/C-Cdh1 and the metabolic effects of other tumour suppressors such as p53 (Feng and Levine, 2010) or known proto-oncogenes such as c-Myc (Morrish et al., 2008) and Akt (Matheny and Adamo, 2009) are also likely to be highly relevant.

### **Localisation**

PFKFB3 protein is predominantly cytoplasmic but it has been found also into the nucleus. PFKFB3 overexpression produces a marked increase in cell proliferation.

Figure 4

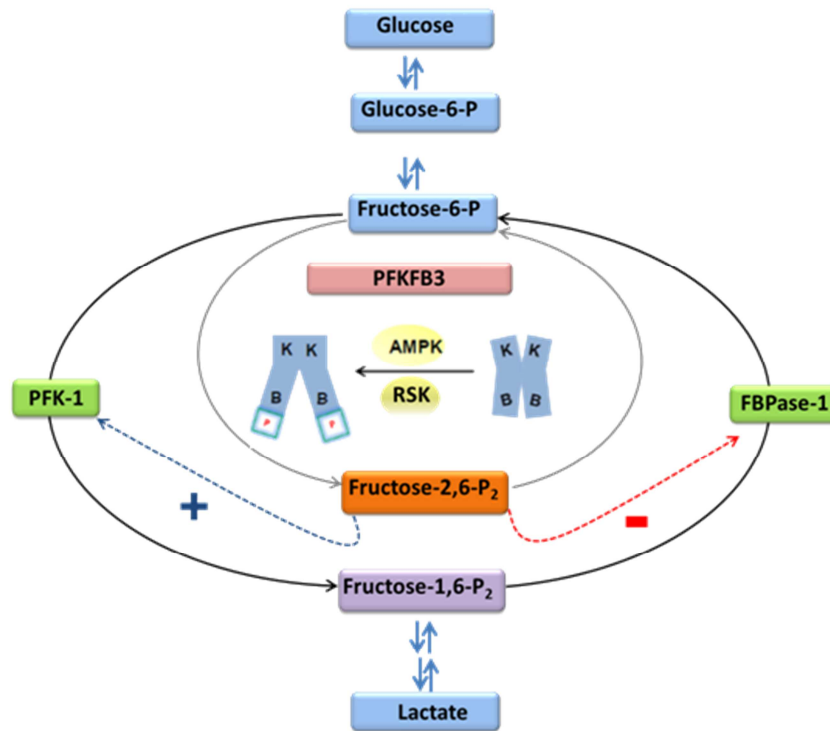


Figure 5

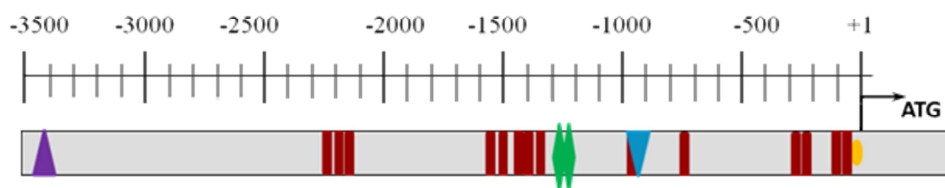


Table I

Gen	Localization		Ratio Kinase: Bisphosphatase	Isoenzymes	Regulation by kinases
	Human	Rat			
<i>PFKFB1</i>	Xq27-q28	Xq22-q31	2,5 (rat liver) 0,4 (rat muscle)	IPFK-2 (liver) mPFK-2 (muscle) fPFK-2 (foetal)	PKA
<i>PFKFB2</i>	1q31	13q24-q25	1,8 (bovine heart)	hPFK-2 (heart)	PKA, PKC, PKB, AMPK
<i>PFKFB3</i>	10p14-p15		710 (human placenta) 3,1 (bovine brain)	uPFK-2 (brain, placenta) iPFK-2 (inducible)	AMPK, PKC, PKA, RSK, MK2
<i>PFKFB4</i>	3p22-p21		0,9 (human testis) 4,9 (rat testis)	tPFK-2 (testis)	

Figure 4. PFKFB3 activities and function in the glycolytic pathway.

Figure 5. Analysis of the 5' PFKFB3 human gene promoter region. Putative regulatory elements in the PFKFB3 gene promoter.

Table I. Properties of PFKFB genes.

## Function

These effects on proliferation were completely abrogated by mutating either the active site or nuclear localization residues of PFKFB3, demonstrating a requirement for nuclear delivery of Fru-2,6-P<sub>2</sub> which produced an increase in the expression of several key cell cycle proteins, including cyclin-dependent kinase Cdk1, Cdc25C, and cyclin D3 and decreased the expression of the cell cycle inhibitor p27, a universal inhibitor of Cdk-1 and the cell cycle, indicating that Fru-2,6-P<sub>2</sub> may couple the activation of glucose metabolism with cell proliferation (Yalcin et al., 2009a).

Synthesis and degradation of fructose-2,6-bisphosphate:

- **Kinase catalytic activity:** ATP + D-fructose-6-phosphate = ADP + beta-D-fructose-2,6-bisphosphate

- **Phosphatase catalytic activity:** Beta-D-fructose-2,6-bisphosphate + H<sub>2</sub>O = D-fructose-6-phosphate + phosphate

The rate of glycolytic flux is controlled at different levels and by different mechanisms: substrate availability, enzyme concentrations, allosteric effectors and covalent modification on regulatory enzymes. One of the critically modulated steps is that catalysed by 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1), with fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) being its most powerful allosteric activator (Okar and Lange, 1999; Rider et al., 2004; Van Schaftingen, 1987).

Fru-2,6-P<sub>2</sub> relieves ATP inhibition and acts synergistically with AMP, and in addition it inhibits fructose 1,6-bisphosphatase (Van Schaftingen, 1987). These properties confer to this metabolite a key role in the control of fructose-6-P/fructose-1,6-P<sub>2</sub> substrate cycle and hence critically regulate carbohydrate metabolism (Figure 4).

PFKFB genes

In mammals, there are four PFKFB genes (PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 and PFKFB4) which code for the different PFK-2/FBPase-2 isoenzymes, characterized by their cellular expression patterns. These isoforms share highly conserved core catalytic domains (85%) but differ greatly in their kinetic properties and responses to regulatory signals (Okar et al., 2001). These differences are mostly due to highly divergent N- and C-terminal regulatory domains; however, a few but significant sequence differences in the catalytic domains that constitute the secondary residue shells surrounding the active sites also contribute to the kinetic differences (Cavalier et al., 2012).

These isoforms show differences in their distribution and kinetic properties in response to allosteric effectors, hormonal, and growth factor signals (Okar et al., 2001). The expression of these genes is dependent on tissue and on development stage (Goren et al., 2000). Importantly, tissue- and cell-specific isoenzymes are not totally exclusive and several cells express more than one isoenzyme (Calvo et al., 2006; Minchenko et

al., 2005a; Minchenko et al., 2005b; Telang et al., 2006).

This pattern of expression suggests that each isoenzyme plays a key role under different physiological conditions or in response to different stimuli.

Although the PFKFB isoenzymes have the same enzymatic activities and share the same substrates, indicating functional redundancy, their biological function and regulation is different in the specific cells (Table I).

PFKFB1 is mainly expressed in liver and skeletal muscle, PFKFB2 in heart tissue, PFKFB3 is expressed ubiquitously in several tissue and proliferating cells, and PFKFB4 was originally found in testis (Okar et al., 2001).

PFKFB3 has a uniquely large 6-phosphofructo-2-kinase to fructose-2,6-bisphosphatase activity ratio compared to other isoforms (Sakakibara et al., 1997).

This isoform, which has a native activity ratio of roughly 700-fold kinase-to-phosphatase activity, dramatically increases upon phosphorylation of Ser461 by protein kinase A (PKA), AMP-dependent protein kinase (AMPK) or other kinases.

The low bisphosphatase activity of PFKFB3, which is lower than that of other isoforms by an order of magnitude, is solely due to the presence of a serine at residue 302 instead of an arginine as conserved in the other isoforms (Cavalier et al., 2012; Kim et al., 2006). PFKFB3 gene was cloned from a fetal brain library (Manzano et al., 1998; Ventura et al., 1995), human placenta (Sakai et al., 1996) and breast cancer cells (Hamilton et al., 1997).

PFKFB3 is expressed ubiquitously and it is present in proliferating tissues, transformed cells and in tumours (Almeida et al., 2010; Atsumi et al., 2002; Bando et al., 2005; Calvo et al., 2006; Chesney et al., 1999; Duran et al., 2008a; Duran et al., 2009; Kessler et al., 2008; Novellademunt et al., 2012; Riera et al., 2002; Yalcin et al., 2009b). An inducible PFK-2/FBPase-2 (iPFK-2) with proto-oncogenic features was cloned from cancer cell lines (Chesney et al., 1999).

The iPFK-2 represents a splice product of the PFKFB3 gene, as does the ubiquitous PFK-2/FBPase-2 (uPFK-2) (Navarro-Sabate et al., 2001). In human brain, have been demonstrated the occurrence of six alternatively spliced PFKFB3 transcripts, designated UBI2K1-6 splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (Kessler and Eschrich, 2001).

Regulation:

PFKFB3 gene is regulated by different mechanisms. Induction of its expression has been reported in response to different stimuli, amongst these are hypoxia (Bartrons and Caro, 2007; Minchenko et al., 2002; Obach et al., 2004) and progestins (Hamilton et al., 1997; Novellademunt et al., 2012), through HIF (Hypoxia Inducible Factor) and PR (progesterone

receptor) interactions within their binding to the consensus HRE (Hypoxia response element) and PRE (progesterone response element) sites located at PFKFB3 promoter, respectively. Growth factors such as insulin (Riera et al., 2002) and pro-inflammatory molecules (Chesney et al., 1999) such as IL-6 (Ando et al., 2010), LPS and adenosine (Ruiz-Garcia et al., 2011) or in response to stress stimuli (NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV radiation or anisomycin) through SRF (Serum Response Factor) and its binding to SRE (Serum response element) site (Novellademunt et al., 2013) (Figure 5). The proinflammatory cytokine interleukin (IL-6) enhances glycolysis through activation of PFKFB3 as a consequence of the STAT3 activation (Ando et al., 2010). PFKFB3 is also a target gene of PPAR $\gamma$ . Additionally, PFKFB3 is involved in the antidiabetic effect of PPAR $\gamma$  activation, at least, by suppressing excessive fatty acid oxidation-related reactive oxygen species (ROS) production and inflammatory responses in adipose tissue/adipocytes (Huo et al., 2010).

The product of the PFKFB3 gene, the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase, is also controlled by different mechanisms. In addition to the gene expression regulation, the C-terminal domain can be phosphorylated at Ser461 by different protein kinases, such as AMP-activated protein kinase (AMPK) (Bando et al., 2005; Marsin et al., 2002), RSK (Novellademunt et al., 2012) and MK2 (Novellademunt et al., 2013) (Figure 6).

Ser461 can also be phosphorylated by PKC and PKA making it responsive to multiple external signals (Okamura and Sakakibara, 1998). Phosphorylated PFKFB3 kinetics shows an increase in V<sub>max</sub> of the kinase activity and a decreased K<sub>m</sub> for Fru-6-P (Marin et al., 2002; Novellademunt et al., 2012). Furthermore, the PFKFB3 isoenzyme was found to be regulated through the PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway, turning it into a target of growth factors signalling (Duran et al., 2009; Garcia-Cao et al., 2012) (Figure 7).

Furthermore, the mRNAs of all PFKFB3 isoforms contain multiple copies of the AUUUA instability motif in its 3' untranslated region (3'UTR) (Chesney et al., 1999). AU-rich elements (AREs) target them RNAs of proto-oncogenes and pro-inflammatory cytokines for rapid degradation and regulate the efficiency of their translation into proteins (Chen and Shyu, 1995).

Also, PFKFB3 isoenzyme is regulated by modulation of its protein stability. Thus, it is degraded through the ubiquitin/proteasome proteolytic pathway (Riera et al.,

2003). PFKFB3 but not the other isoenzymes, contains a recognition signal composed of a K-E-N box (KENXXXN), where K is lysine, E is glutamate and N is asparagine, that is recognized by the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/Cdh1), an E3 ubiquitin ligase complex that plays an essential role in G1 phase and mitosis through the degradation of several cell cycle proteins and PFKFB3 (Almeida et al., 2010).

### Homology

It appears that the use of Fru-2,6-P<sub>2</sub> as a regulatory metabolite is a specifically eukaryotic phenomenon. The most plausible hypothesis for the origin of the PFK-2/FBPase-2 would be the fusion of two ancestral genes coding for a kinase functional unit and a phosphohydrolase/mutase unit, respectively. From protein sequence alignments, it is clear that the bisphosphatase activity located in the C-terminal domain of the PFK-2/FBPase-2 is homologous to the phosphoglyceratmutases (PGMs) and the acid phosphatase family (Jedrzejewski, 2000; Okar et al., 2001). Alignments of the bisphosphatase domain with PGM and acid phosphatase can be accessed at InterPro. The N-terminal PFK-2 domain is sequentially and structurally homologous to several nucleotide binding proteins, primarily that of adenylate kinase of *E. coli*.

### Mutations

#### Note

No PFKFB mutations have been collected in the COSMIC database. A lot of SNPs have been described, but they are not affecting to coding sequences. 2319 NCBI SNPs in PFKFB3 are shown (GeneCard).

#### Germinal

No germinal mutations of PFKFB3 have been described.

#### Somatic

Loss of heterozygosity (LOH) of PFKFB3 has been found in 55% of glioblastomas. The allelic deletion of PFKFB3 resulted in a decrease of PFKFB3 mRNA level accompanied by a lower PFKFB3 protein level. The expression of growth-inhibiting splice variant UBI2K4 was effectively reduced in glioblastomas with PFKFB3 LOH and a positive correlation with overall PFKFB3 expression was observed. The PFKFB3 LOH as well as the resulting low UBI2K4 expression level was associated with a poor prognosis of glioblastoma patients. It was concluded that LOH on 10p14-p15 in glioblastomas targets PFKFB3 and in particular splice variant UBI2K4, a putative tumor suppressor protein in glioblastomas (Fleischer et al., 2011).



Figure 6

PFK-2/FBPasa-2 ubiq/induible	AKKGNPLMRRN <b>S</b> VTPLASPEPTKKPRIN <b>S</b> FEEHVASTS
PFK-2/FBPasa-2 cor	PKNQTPVRRMRN <b>S</b> FTPPLSSSNTIRRPKN <b>S</b> VGSR-----
PFK-2/FBPasa-2 fetge	VD-----ITREPEEALDT-----
PFK-2/FBPasa-2 testicle	VD-----ISRPEEALVT-----

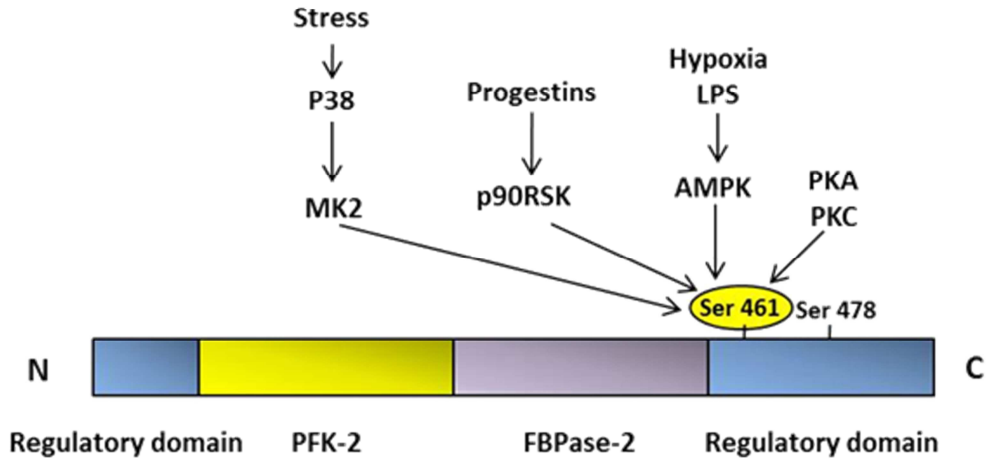
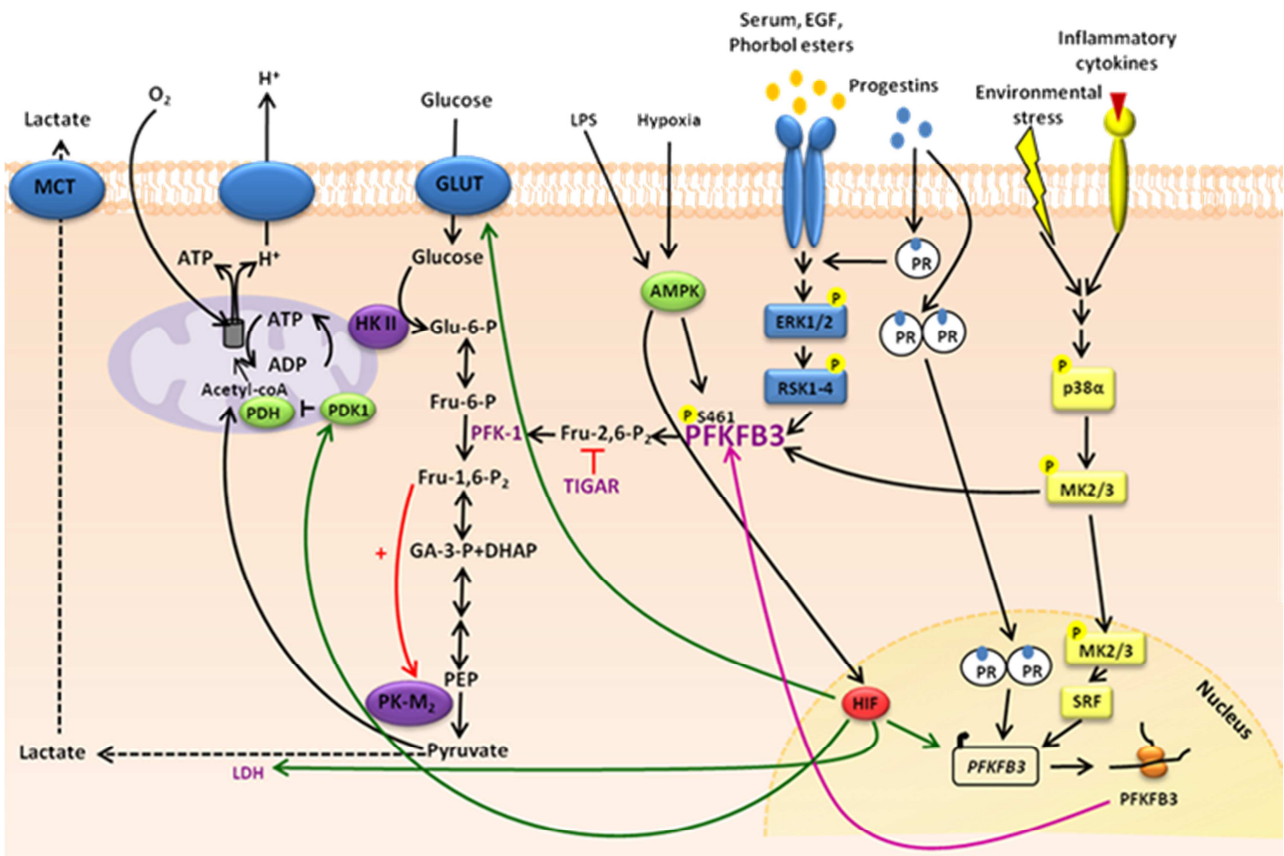


Figure 7



Novellasdemunt, 2013

**Figure 6. PFKFB3 phosphorylation sites.** The residues Ser461 and Ser478 correspond to PFKFB3 isoenzyme and are equivalent to Ser466 and Ser483 of the PFKFB2 isoenzyme. The colours represent the phosphorylation residues (red), residues fully conserved in all or at least one of the isoforms (green), similar residues (yellow) and different residues (black).

**Figure 7.** Differential physiological factors regulate PFKFB3 gene expression and its isoenzyme activity through phosphorylation of Ser461.

## Implicated in

### Various cancers

#### Prognosis

At least 6 alternatively spliced variants of PFKFB3 mRNA are known in humans (UBI2K1-6) (Figure 2). Thus, each might have a different contribution to prognosis of tumors. UBI2K5 and UBI2K6 are the predominant splice variants found in rapidly proliferating high-grade astrocytomas while the expression of UBI2K3 and UBI2K4 is mainly restricted to low-grade astrocytomas and non-neoplastic brain tissue (Zscharnack, 2009).

#### Oncogenesis

Enhanced glycolysis is important for oncogenesis and for the survival and proliferation of cancer cells in the tumor microenvironment. Neoplastic cells metabolize abundant glucose relative to normal cells in order to satisfy the increased energetic and anabolic needs of the transformed state. Moreover, most of tumours are subjected to hypoxic conditions due to the abnormal vasculature that supply them with oxygen and nutrients. A key step in controlling glycolytic rate is Fru-2,6-P<sub>2</sub> levels. This is controlled, in tumoral cells, mainly by PFKFB3 which, in turn, is activated by mitogenic, inflammatory and hypoxic stimuli, and is found to be constitutively expressed by several human leukemias and solid tumor cells (Bartrons and Caro, 2007; Chesney, 2006).

### Thyroid and ovarian cancer

#### Note

Increments in the expression of PFKFB3 mRNA and protein were reported in ovarian and thyroid carcinomas using *in situ* hybridization and immunohistochemistry analysis (Atsumi et al., 2002).

### Breast cancer

#### Note

PFKFB3 was firstly identified as a progesterone responding gene (PRG1) in human breast cancer cell lines (Hamilton et al., 1997). Afterwards, overexpression of PFKFB3 in T47D and MCF7 cells has been probed and the regulatory mechanism of the protein and gene regulation have been described (Novellasedemunt et al., 2012; Obach et al., 2004).

PFKFB3 has also been identified, using loss-of-function screen, as a gene required for cell growth and proliferation in CD44+CD24- human breast cancer cells (Marotta et al., 2011).

### Lung cancer

#### Note

Heterozygotic genomic deletion of the inducible PFKFB3 gene in ras-transformed mouse lung fibroblasts suppresses Fru-2,6-P<sub>2</sub> production, glycolytic flux to lactate, and growth as soft agar colonies or

tumors in athymic mice (Atsumi et al., 2002; Telang et al., 2006).

### Gastric and pancreas cancer

#### Note

The expression of PFKFB3 mRNA was observed in normal human gastric tissue and was increased in malignant gastric tumors. PFKFB3 gene is also expressed in gastric (MKN45, NUGC3) and pancreatic cancer cells (Panc1) which strongly respond to hypoxia via a HIF-1alpha dependent mechanism (Bobarykina et al., 2006).

### Colorectal cancer

#### Note

PFKFB3 gene expression is controlled by insulin in the human colon adenocarcinoma HT29 cell line (Riera et al., 2002). Overexpression of PFKFB3 isoenzyme and particularly the phosphorylated form (phospho-PFKFB3 (Ser461)) has also been described in the human colon malignant tumors (Bando et al., 2005).

### Glioblastoma

#### Note

PFKFB3 protein levels were markedly elevated in high-grade astrocytomas relative to low-grade astrocytomas and corresponding non-neoplastic brain tissue, whereas no significant increase of PFKFB3 mRNA was observed in high-grade astrocytomas when compared with control tissue. In the group of glioblastomas the PFKFB3 protein inversely correlates with EGFR expression. The findings demonstrate that PFKFB3 up-regulation is a hallmark of high-grade astrocytomas offering an explanation for high glycolytic flux and lactate production in these tumors (Kessler et al., 2008).

The study of the different PFKFB3 isoenzymes showed that the splice variant UBI2K4 impeded the tumour cell growth and might serve as a tumour suppressor in astrocytic tumours (Zscharnack, 2009). In this sense, loss of heterozygosity on 10p14-p15 was detected in 55% of glioblastomas and the allelic deletion of PFKFB3 splice variant UBI2K4 was associated with a poor prognosis (Fleischer et al., 2011).

### Neuronal diseases

#### Note

Strong evidence of linkage to late-onset Alzheimer disease (LOAD) has been observed on chromosome 10, which implicates a wide region and at least one disease-susceptibility locus. Although significant associations with several biological candidate genes, such as PFKFB3, on chromosome 10 have been reported, these findings have not been consistently replicated, and they remain controversial (Grupe et al., 2006).

Increased expression of HIF-1 $\alpha$ , as well as its target genes, VEGF, and PFKFB3 in both major depressive and bipolar disorder patients have been found in a

depressive state compared to healthy control subjects. The data suggest that altered expression of HIF-1 and its target genes mRNA in peripheral blood cells are associated - mainly in a state-dependent manner - with mood disorders. In addition, altered expression of HIF-1 and its target genes may be associated with the pathophysiology of depression (Shibata et al., 2013).

### **Diabetes and obesity**

#### **Note**

Expression of PFKFB3 gene has been demonstrated in adipocytes (Atsumi et al., 2005). Single nucleotide polymorphism rs1064891, located in the 3' UTR of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) gene, was nominally associated with obesity in combined analysis of human cohorts (Jiao et al., 2008). In addition, it has been found that disruption of PFKFB3 gene ameliorates diet-induced adiposity but exacerbates systemic insulin resistance and adipose tissue inflammatory response (Huo et al., 2010).

In contrast, overexpression of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase in the liver of transgenic mice results in weight gain (Duran et al., 2008b).

Pfkfb3 gene expression is increased in streptozotocin-induced diabetic mouse liver. During streptozotocin-induced diabetes, phosphorylation of both p38 mitogen-activated protein kinase and Akt was detected, together with the overexpression of the proliferative markers cyclin D and E2F.

These findings indicate that PFKFB3 induction is coupled to enhanced hepatocyte proliferation in streptozotocin-induced diabetic mouse liver. Expression decreased when hepatocytes were treated with either rapamycin or LY 294002, suggesting that PFKFB3 regulation is phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin dependent (Duran et al., 2009).

### **Inflammatory diseases (arthritis and coeliac disease)**

#### **Note**

Rheumatoid arthritis (RA) and coeliac disease (CD) are two autoimmune disorders which have similarities in their pathogenesis. In a meta-analysis of Dutch and UK data sets, shared association with six loci, one of them being PFKFB3 (Coenen et al., 2009). The proinflammatory cytokine interleukin (IL)-6 enhanced glycolysis in mouse embryonic fibroblasts and human cell lines through STAT3 activation which enhanced the expression of the glycolytic PFKFB3 isoenzyme (Ando et al., 2010). Furthermore, cooperation of adenosine with macrophage Toll-4 receptor agonists leads to increased glycolytic flux through the enhanced expression of PFKFB3 gene, showing that, in macrophages, endogenously generated adenosine cooperates with bacterial components to increase PFKFB3 isoenzyme activity, resulting in greater Fru-2,6-P<sub>2</sub> accumulation. This process enhances the glycolytic flux and favours ATP generation helping to

develop and maintain the long term defensive and reparative functions of the macrophages (Ruiz-Garcia et al., 2011).

### **Osteoporosis**

#### **Note**

PFKFB3 has been also associated with osteoclast differentiation by the immune system response or to various stimuli (Xiao et al., 2012).

### **Targeting PFKFB3 for cancer therapy**

#### **Note**

PFKFB3 plays an important role in cancer cell metabolism and it has been considered as a potential target for cancer therapy. Different authors reported that PFKFB3 isoforms suppression inhibited anchorage-independent growth and induced cell-cycle delay, proposing that PFKFB3 protein product may serve as an essential downstream metabolic mediator of oncogenic ras (Calvo et al., 2006; Telang et al., 2006). The JAK2V617F oncogene requires expression of PFKFB3 for cell growth and increased metabolic activity. JAK2V617F as well as active STAT5 increases the expression of PFKFB3, which is required for JAK2V617F-dependent lactate production, oxidative metabolic activity and glucose uptake. Targeted Knockdown of PFKFB3 limited cell growth under normoxic and hypoxic conditions and blocked in vivo tumor formation in mice (Reddy et al., 2012).

Clinical development of PFKFB3 inhibitors as chemotherapeutic agents has been published (Clem et al., 2008, Seo et al., 2011).

For example, a cell-permeable dipyrindinyl-propenone (3PO) compound that selectively blocks PFK-2 (6-phosphofructo-2-kinase) activity has been found (Telang et al., 2006). 3PO decreases Fru-2,6-P<sub>2</sub> and lactate production, arresting proliferation of transformed cells and suppressing tumor growth in several xenograft mouse models (Telang et al., 2006, Clem et al., 2008).

In addition, other small molecule inhibitors (N4A, YN1) have been identified. When tested on cultured cancer cells both, N4A and YN1, inhibited PFKFB3, decreasing Fru-2,6-P<sub>2</sub> concentration and glycolysis and, ultimately, led to cell death (Seo et al., 2011).

### **KO and transgenic animals**

#### **Note**

Models of KO and transgenic animals have been developed showing that after disruption of the mouse PFKFB3 gene, no homozygous PFKFB3 (-/-) embryos were detected after 8 days of embryogenesis, indicating that the loss of PFKFB3 activity via targeted disruption of the gene leads to loss of embryonic cell proliferation, differentiation, and/or implantation.

Serial analysis of gene expression has indicated that the mouse PFKFB3 mRNA becomes detectable during the blastocyst stage of embryogenesis.

In contrast, normal phenotype is observed in PFKFB3 (+/-) mice despite the 50% reduction in PFKFB3 expression and activity (Chesney et al., 2005).

Using PFKFB3-disrupted (PFKFB3<sup>+/-</sup>) mice, it has been shown that the animals are protected against diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammatory response (Huo et al., 2010).

A transgenic mouse model that overexpressed pfkfb3 and which was subjected to diet-induced obesity revealed production of high Fru-2,6-P<sub>2</sub> levels and changes in hepatic gene expression profiles of key gluconeogenic and lipogenic enzymes, as well as an accumulation of lipids in periportal cells, and weight gain (Duran et al., 2008b).

## References

- Winn SI, Watson HC, Harkins RN, Fothergill LA.. Structure and activity of phosphoglycerate mutase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1981 Jun 26;293(1063):121-30. (REVIEW)
- El-Maghrabi MR, Claus TH, Pilkis J, Fox E, Pilkis SJ.. Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem.* 1982 Jul 10;257(13):7603-7.
- Van Schaftingen E.. Fructose 2,6-bisphosphate. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1987;59:315-95.
- Tauler A, Lin K, Pilkis SJ.. Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Use of site-directed mutagenesis to evaluate the roles of His-258 and His-392 in catalysis. *J Biol Chem.* 1990 Sep 15;265(26):15617-22.
- Li L, Lin K, Correia JJ, Pilkis SJ.. Lysine 356 is a critical residue for binding the C-6 phospho group of fructose 2,6-bisphosphate to the fructose-2,6-bisphosphatase domain of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem.* 1992a Aug 15;267(23):16669-75.
- Li L, Lin K, Kurland IJ, Correia JJ, Pilkis SJ.. Site-directed mutagenesis in rat liver 6-phosphofructo-2-kinase. Mutation at the fructose 6-phosphate binding site affects phosphate activation. *J Biol Chem.* 1992b Mar 5;267(7):4386-93.
- Li L, Lin K, Pilkis J, Correia JJ, Pilkis SJ.. Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. The role of surface loop basic residues in substrate binding to the fructose-2,6-bisphosphatase domain. *J Biol Chem.* 1992c Oct 25;267(30):21588-94.
- Lin K, Li L, Correia JJ, Pilkis SJ.. Glu327 is part of a catalytic triad in rat liver fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem.* 1992 Apr 5;267(10):6556-62.
- Schneider G, Lindqvist Y, Vihko P.. Three-dimensional structure of rat acid phosphatase. *EMBO J.* 1993 Jul;12(7):2609-15.
- Rider MH, Crepin KM, De Cloedt M, Bertrand L, Hue L.. Site-directed mutagenesis of rat muscle 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: role of Asp-130 in the 2-kinase domain. *Biochem J.* 1994 May 15;300 ( Pt 1):111-5.
- Chen CY, Shyu AB.. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 1995 Nov;20(11):465-70. (REVIEW)
- Kurland I, Chapman B, Lee YH, Pilkis S.. Evolutionary reengineering of the phosphofructokinase active site: ARG-104 does not stabilize the transition state in 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Aug 15;213(2):663-72.
- Pilkis SJ, Claus TH, Kurland IJ, Lange AJ.. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:799-835. (REVIEW)
- Ventura F, Ambrosio S, Bartrons R, el-Maghrabi MR, Lange AJ, Pilkis SJ.. Cloning and expression of a catalytic core bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Apr 26;209(3):1140-8.
- Hasemann CA, Istvan ES, Uyeda K, Deisenhofer J.. The crystal structure of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase reveals distinct domain homologies. *Structure.* 1996 Sep 15;4(9):1017-29.
- Sakai A, Kato M, Fukasawa M, Ishiguro M, Furuya E, Sakakibara R.. Cloning of cDNA encoding for a novel isozyme of fructose 6-phosphate, 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase from human placenta. *J Biochem.* 1996 Mar;119(3):506-11.
- Hamilton JA, Callaghan MJ, Sutherland RL, Watts CK.. Identification of PRG1, a novel progestin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Mol Endocrinol.* 1997 Apr;11(4):490-502.
- Sakakibara R, Uemura M, Hirata T, Okamura N, Kato M.. Human placental fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: its isozymic form, expression and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997 Nov;61(11):1949-52.
- Manzano A, Rosa JL, Ventura F, Pérez JX, Nadal M, Estivill X, Ambrosio S, Gil J, Bartrons R.. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3). *Cytogenet Cell Genet.* 1998;83(3-4):214-7.
- Okamura N, 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. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998 Oct;62(10):2039-42.
- Chesney J, Mitchell R, Benigni F, Bacher M, Spiegel L, Al-Abed Y, Han JH, Metz C, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):3047-52.
- Okar DA, Lange AJ.. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors.* 1999;10(1):1-14. (REVIEW)
- Goren N, Manzano A, Riera L, Ambrosio S, Ventura F, Bartrons R.. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase expression in rat brain during development. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000 Jan 10;75(1):138-42.
- Jedrzejewski MJ.. Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase. *Prog Biophys Mol Biol.* 2000;73(2-4):263-87. (REVIEW)
- Kessler R, Eschrich K.. Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Mar 5;87(2):190-5.
- Navarro-Sabate A, Manzano A, Riera L, Rosa JL, Ventura F, Bartrons R.. The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene.* 2001 Feb 7;264(1):131-8.

- Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabat A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ.. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci.* 2001 Jan;26(1):30-5. (REVIEW)
- Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R, Bucala R.. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res.* 2002 Oct 15;62(20):5881-7.
- Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, 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.* 2002 Aug 23;277(34):30778-83. Epub 2002 Jun 13.
- Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I, Sang N, Srinivas V, Armstead V, 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.* 2002 Feb 22;277(8):6183-7. Epub 2001 Dec 14.
- Riera L, Manzano A, Navarro-Sabate A, Perales JC, Bartrons R.. Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Apr 3;1589(2):89-92.
- Lee YH, Li Y, Uyeda K, Hasemann CA.. Tissue-specific structure/function differentiation of the liver isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3;278(1):523-30. Epub 2002 Oct 11.
- Riera L, Obach M, Navarro-Sabate A, Duran J, Perales JC, Vinals F, Rosa JL, Ventura F, Bartrons R.. Regulation of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway during myogenic C2C12 cell differentiation. *FEBS Lett.* 2003 Aug 28;550(1-3):23-9.
- Obach M, Navarro-Sabate A, Caro J, Kong X, Duran J, Gomez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL, 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.* 2004 Dec 17;279(51):53562-70. Epub 2004 Oct 5.
- Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L.. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J.* 2004 Aug 1;381(Pt 3):561-79. (REVIEW)
- Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Takeuchi J, Bando H, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T.. Expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation. *Diabetes.* 2005 Dec;54(12):3349-57.
- Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T.. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5784-92.
- Chesney J, Telang S, Yalcin A, Clem A, Wallis N, Bucala R.. Targeted disruption of inducible 6-phosphofructo-2-kinase results in embryonic lethality. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 May 27;331(1):139-46.
- Gomez M, Manzano A, Navarro-Sabate A, Duran J, Obach M, Perales JC, Bartrons R.. Specific expression of pfkfb4 gene in spermatogonia germ cells and analysis of its 5'-flanking region. *FEBS Lett.* 2005 Jan 17;579(2):357-62.
- Minchenko OH, Ogura T, Opentanova IL, Minchenko DO, Ochiai A, Caro J, Komisarenko SV, Esumi H.. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in human lung tumor. *Ukr Biokhim Zh.* 2005a;77(6):46-50.
- Minchenko OH, Opentanova IL, Ogura T, Minchenko DO, Komisarenko SV, Caro J, Esumi H.. Expression and hypoxia-responsiveness of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in mammary gland malignant cell lines. *Acta Biochim Pol.* 2005b;52(4):881-8. Epub 2005 Jul 11.
- Bobarykina AY, Minchenko DO, Opentanova IL, Moenner M, Caro J, Esumi H, Minchenko OH.. 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.* 2006;53(4):789-99. Epub 2006 Dec 4.
- Calvo MN, Bartrons R, Castano E, Perales JC, Navarro-Sabate A, Manzano A.. PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett.* 2006 May 29;580(13):3308-14. Epub 2006 May 8.
- Chesney J.. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006 Sep;9(5):535-9. (REVIEW)
- Grupe A, Li Y, Rowland C, Nowotny P, Hinrichs AL, Smemo S, Kauwe JS, Maxwell TJ, Cherny S, Doil L, Tacey K, van Luchene R, Myers A, Wavrant-De Vrieze F, Kaleem M, Hollingworth P, Jehu L, Foy C, Archer N, Hamilton G, Holmans P, Morris CM, Catanese J, Sninsky J, White TJ, Powell J, Hardy J, O'Donovan M, Lovestone S, Jones L, Morris JC, Thal L, Owen M, Williams J, Goate A.. A scan of chromosome 10 identifies a novel locus showing strong association with late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet.* 2006 Jan;78(1):78-88. Epub 2005 Nov 15.
- Kim SG, Manes NP, El-Maghrabi MR, Lee YH.. 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.* 2006 Feb 3;281(5):2939-44. Epub 2005 Nov 29.
- Telang S, Yalcin A, Clem AL, Bucala R, Lane AN, Eaton JW, Chesney J.. Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene.* 2006 Nov 23;25(55):7225-34. Epub 2006 May 22.
- Bartrons R, Caro J.. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Jun;39(3):223-9. (REVIEW)
- Clem B, Telang S, Clem A, Yalcin A, Meier J, Simmons A, Rasku MA, Arumugam S, Dean WL, Eaton J, Lane A, Trent JO, Chesney J.. Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 2008 Jan;7(1):110-20. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0482.
- Duran J, Gomez M, Navarro-Sabate A, Riera-Sans L, Obach M, Manzano A, Perales JC, Bartrons R.. Characterization of a new liver- and kidney-specific pfkfb3 isozyme that is downregulated by cell proliferation and dedifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008a Mar 21;367(4):748-54. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.005. Epub 2008 Jan 10.
- Duran J, Navarro-Sabate A, Pujol A, Perales JC, Manzano A, Obach M, Gomez M, Bartrons R.. Overexpression of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase in the liver of transgenic mice results in weight gain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008b Jan 11;365(2):291-7. Epub 2007 Nov 6.
- Jiao H, Kaaman M, Dungen E, Kere J, Arner P, Dahlman I.. Association analysis of positional obesity candidate genes

- based on integrated data from transcriptomics and linkage analysis. *Int J Obes (Lond)*. 2008 May;32(5):816-25. doi: 10.1038/sj.ijo.0803789. Epub 2008 Jan 8.
- Kessler R, Bleichert F, Warnke JP, Eschrich K.. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol*. 2008 Feb;86(3):257-64. Epub 2007 Sep 6.
- Morrish F, Neretti N, Sedivy JM, Hockenbery DM.. The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell Cycle*. 2008 Apr 15;7(8):1054-66. Epub 2008 Feb 8.
- Coenen MJ, Trynka G, Heskamp S, Franke B, van Diemen CC, Smolonska J, van Leeuwen M, Brouwer E, Boezen MH, Postma DS, Platteel M, Zanen P, Lammers JW, Groen HJ, Mali WP, Mulder CJ, Tack GJ, Verbeek WH, Wolters VM, Houwen RH, Mearin ML, van Heel DA, Radstake TR, van Riel PL, Wijmenga C, Barrera P, Zhernakova A.. Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease. *Hum Mol Genet*. 2009 Nov 1;18(21):4195-203. doi: 10.1093/hmg/ddp365. Epub 2009 Jul 31.
- Duran J, Obach M, Navarro-Sabate A, Manzano A, Gomez M, Rosa JL, Ventura F, Perales JC, Bartrons R.. Pfkfb3 is transcriptionally upregulated in diabetic mouse liver through proliferative signals. *FEBS J*. 2009 Aug;276(16):4555-68. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07161.x. Epub 2009 Jul 18.
- Gomez M, Navarro-Sabatž A, Manzano A, Duran J, Obach M, Bartrons R.. Switches in 6-phosphofructo-2-kinase isoenzyme expression during rat sperm maturation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Sep 18;387(2):330-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.021. Epub 2009 Jul 10.
- Matheny RW Jr, Adamo ML.. Current perspectives on Akt activation and Akt-ions. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Nov;234(11):1264-70. doi: 10.3181/0904-MR-138. Epub 2009 Jul 13. (REVIEW)
- Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane A, Nelson K, Clem AL, Brock E, Siow D, Wattenberg B, Telang S, Chesney J.. Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*. 2009a Sep 4;284(36):24223-32. doi: 10.1074/jbc.M109.016816. Epub 2009 May 27.
- Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J.. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol*. 2009b Jun;86(3):174-9. doi: 10.1016/j.yexmp.2009.01.003. Epub 2009 Jan 14. (REVIEW)
- Zscharnack K, Kessler R, Bleichert F, Warnke JP, Eschrich K.. The PFKFB3 splice variant UBI2K4 is downregulated in high-grade astrocytomas and impedes the growth of U87 glioblastoma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009 Dec;35(6):566-78. doi: 10.1111/j.1365-2990.2009.01027.x. Epub 2009 Apr 15.
- Almeida A, Bolanos JP, Moncada S.. E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 12;107(2):738-41. doi: 10.1073/pnas.0913668107. Epub 2009 Dec 22.
- Ando M, Uehara I, Kogure K, Asano Y, Nakajima W, Abe Y, Kawachi K, Tanaka N.. Interleukin 6 enhances glycolysis through expression of the glycolytic enzymes hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3. *J Nippon Med Sch*. 2010 Apr;77(2):97-105.
- Feng Z, Levine AJ.. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol*. 2010 Jul;20(7):427-34. doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.004. (REVIEW)
- Huo Y, Guo X, Li H, Wang H, Zhang W, Wang Y, Zhou H, Gao Z, Telang S, Chesney J, Chen YE, Ye J, Chapkin RS, Wu C.. Disruption of inducible 6-phosphofructo-2-kinase ameliorates diet-induced adiposity but exacerbates systemic insulin resistance and adipose tissue inflammatory response. *J Biol Chem*. 2010 Feb 5;285(6):3713-21. doi: 10.1074/jbc.M109.058446. Epub 2009 Nov 30.
- Fleischer M, Kessler R, Klammer A, Warnke JP, Eschrich K.. LOH on 10p14-p15 targets the PFKFB3 gene locus in human glioblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Dec;50(12):1010-20. doi: 10.1002/gcc.20914. Epub 2011 Aug 30.
- Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, Bloushtain-Qimron N, Kim JJ, Choudhury SA, Maruyama R, Wu Z, Gonen M, Mulvey LA, Bessarabova MO, Huh SJ, Silver SJ, Kim SY, Park SY, Lee HE, Anderson KS, Richardson AL, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Liu XS, Root DE, Hahn WC, Frank DA, Polyak K.. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2723-35. doi: 10.1172/JCI44745.
- Ruiz-Garcia A, Monsalve E, Novellademunt L, Navarro-Sabate A, Manzano A, Rivero S, Castrillo A, Casado M, Laborda J, Bartrons R, D'az-Guerra MJ.. Cooperation of adenosine with macrophage Toll-4 receptor agonists leads to increased glycolytic flux through the enhanced expression of PFKFB3 gene. *J Biol Chem*. 2011 Jun 3;286(22):19247-58. doi: 10.1074/jbc.M110.190298. Epub 2011 Apr 4.
- Seo M, Kim JD, Neau D, Sehgal I, Lee YH.. Structure-based development of small molecule PFKFB3 inhibitors: a framework for potential cancer therapeutic agents targeting the Warburg effect. *PLoS One*. 2011;6(9):e24179. doi: 10.1371/journal.pone.0024179. Epub 2011 Sep 21.
- Song MS, Carracedo A, Salmena L, Song SJ, Egia A, Malumbres M, Pandolfi PP.. Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell*. 2011 Jan 21;144(2):187-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.12.020.
- Cavalier MC, Kim SG, Neau D, Lee YH.. Molecular basis of the fructose-2,6-bisphosphatase reaction of PFKFB3: transition state and the C-terminal function. *Proteins*. 2012 Apr;80(4):1143-53. doi: 10.1002/prot.24015. Epub 2012 Jan 31.
- Fernandez-Fernandez S, Almeida A, Bolanos JP.. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J*. 2012 Apr 1;443(1):3-11. doi: 10.1042/BJ20111943.
- Garcia-Cao I, Song MS, Hobbs RM, Laurent G, Giorgi C, de Boer VC, Anastasiou D, Ito K, Sasaki AT, Rameh L, Carracedo A, Vander Heiden MG, Cantley LC, Pinton P, Haigis MC, Pandolfi PP.. Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell*. 2012 Mar 30;149(1):49-62. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.030. Epub 2012 Mar 6.
- Gomez M, Manzano A, Figueras A, Vinals F, Ventura F, Rosa JL, Bartrons R, Navarro-Sabate A.. Sertoli-secreted FGF-2 induces PFKFB4 isozyme expression in mouse spermatogenic cells by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Sep 15;303(6):E695-707. doi: 10.1152/ajpendo.00381.2011. Epub 2012 Jul 17.
- Moncada S, Higgs EA, Colombo SL.. Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *Biochem J*. 2012 Aug 15;446(1):1-7. doi: 10.1042/BJ20120427. (REVIEW)
- Novellademunt L, Obach M, Millan-Arino L, Manzano A, Ventura F, Rosa JL, Jordan A, Navarro-Sabate A, Bartrons R.. Progestins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) in breast cancer cells. *Biochem J*. 2012 Mar 1;442(2):345-56. doi: 10.1042/BJ20111418.

Reddy MM, Fernandes MS, Deshpande A, Weisberg E, Inguilizian HV, Abdel-Wahab O, Kung AL, Levine RL, Griffin JD, Sattler M.. The JAK2V617F oncogene requires expression of inducible phosphofructokinase/fructose-bisphosphatase 3 for cell growth and increased metabolic activity. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):481-9. doi: 10.1038/leu.2011.225. Epub 2011 Aug 23.

Xiao H, Shan L, Zhu H, Xue F.. Detection of significant pathways in osteoporosis based on graph clustering. *Mol Med Rep*. 2012 Dec;6(6):1325-32. doi: 10.3892/mmr.2012.1082. Epub 2012 Sep 13.

Li H, Guo X, Xu H, Woo SL, Halim V, Morgan C, Wu C.. A role for inducible 6-phosphofructo-2-kinase in the control of neuronal glycolysis. *J Nutr Biochem*. 2013 Jun;24(6):1153-8. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.08.016. Epub 2012 Dec 14.

Novellademunt L, Bultot L, Manzano A, Ventura F, Rosa JL, Vertommen D, Rider MH, Navarro-Sabate A, Bartrons R.. PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli. *Biochem J*. 2013 Jun 15;452(3):531-43. doi: 10.1042/BJ20121886.

Shibata T, Yamagata H, Uchida S, Otsuki K, Hobara T, Higuchi F, Abe N, Watanabe Y.. The alteration of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes in mood disorder patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013 Jun 3;43:222-9. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.01.003. Epub 2013 Jan 16.

---

*This article should be referenced as such:*

Novellademunt L, Navarro-Sabaté À, Manzano A, Rodríguez-García A, Bartrons R. PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2013; 17(9):609-622.

---